
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Cercetări microbiologice,
anatomo-patologice și clinice
privind etiopatogeneza
rinosinuzitei cronice și a virozei
COVID-19**

Doctorand: Ionuț Isaia Jeican

Conducător de doctorat: Prof. univ. dr. Lia Monica Junie



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Etiopatogeneza rinosinuzitei cronice a adultului - repere actuale	17
1.1. Cadrul general	17
1.2. Factorul microbial	19
1.3. Rolul chirurgiei sinusale endoscopice funcționale (FESS) în raport cu etiopatogeneza rinosinuzitei cronice	20
2. Etiopatogeneza virozei COVID-19 - repere generale	23
2.1. Cadrul general	23
2.2. Implicarea sferei O.R.L. în patogeneza virozei COVID-19	24
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru	29
2. Studiul 1 Cercetări microbiologice prin tehnica spectrometriei de masă cu ionizare prin desorbție laser asistată de o matrice (MALDI-TOF) și prin microscopie electronică privind etiologia rinosinuzitei cronice la adult	31
2.1. Introducere	31
2.2. Obiectivele studiului	31
2.3. Material și metodă	32
2.4. Rezultate	34
2.5. Discuții	40
2.6. Concluzii	42
3. Studiul 2 Cercetări clinice privind recuperarea pacienților cu rinosinuzită cronică după cura operatorie prin chirurgie sinusală endoscopică funcțională (FESS)	43
3.1. Introducere	43
3.2. Obiectivele studiului	43
3.3. Material și metodă	44
3.4. Rezultate	46
3.5. Discuții	48
3.6. Concluzii	53

4. Studiul 3 Cercetări microbiologice, anatomo-patologice și biochimice privind modificările mucoasei sino-nazale în rinozinuzita cronică cu polipi nazali versus COVID-19	55
4.1. Introducere	55
4.2. Obiectivele studiului	56
4.3. Material și metodă	56
4.4. Rezultate	60
4.5. Discuții	76
4.6. Concluzii	81
5. Studiul 4 Cercetări microbiologice de virusologie moleculară și microscopie electronică privind prezența virusului SARS-CoV-2 în urechea medie a pacienților cu COVID-19	83
5.1. Introducere	83
5.2. Obiectivele studiului	83
5.3. Material și metodă	83
5.4. Rezultate	85
5.5. Discuții	89
5.6. Concluzii	92
6. Studiul 5 Coinfecția pulmonară COVID-19-<i>Pneumocystis jirovecii</i> - primul primul caz confirmat prin autopsie	
6.1. Introducere	93
5.2. Obiectivele studiului	93
5.3. Prezentarea cazului clinic	94
5.4. Discuții	102
5.5. Concluzii	105
7. Concluzii generale	107
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	109
REFERINȚE	111

Cuvinte -cheie: COVID-19, SARS-CoV-2, *Pneumocystis jirovecii*, mucoasă nazală, polipi nazali, rinosinuzită cronică, biofilm, chirurgie sinusală endoscopică funcțională, MALDI-TOF MS, ureche medie

INTRODUCERE

Etiopatogeneza rinosinuzitei cronice rămâne un subiect de mare interes pentru otorinolaringologi, interes determinat atât de formele refractare de boală, cât și de evoluția tehnicilor de laborator. Recuperarea pacienților cu rinosinuzită cronică după cura operatorie prin chirurgie sinusală endoscopică funcțională constituie un alt subiect de interes, strâns legat de etiopatogeneza afecțiunii. Abordarea acestor subiecte în cadrul primelor trei studii din teză a fost posibilă grație numărului mare de intervenții rino-sinusale realizate în Clinica O.R.L.-Chirurgie cervico-facială II din Cluj.

Apariția pandemiei de COVID-19 a mobilizat forțele de cercetare științifică în întreaga lume. Angrenați în lupta cu acest virus necunoscut, am năzuit să ne aducem și noi aportul, la cel mai înalt nivel tehnic de care am dispus, studiind mecanismele patogenetice ale acestei infecții la nivelul sferei otorinolaringologice.

Cu dorința și speranța că această teză, prin modestele sale rezultate, va contribui la sănătatea semenilor noștri, îmi exprim gratitudinea în fața Atotputernicului Dumnezeu pentru puterea de muncă și pentru dascălii pe care mi I-a dăruit: Prof. Dr. Lia Monica Junie, Prof. Dr. Silviu Albu, Conf. Dr. Iulian Opincariu. Îi mulțumesc din toată inima echipei care și-a adus aportul la desfășurarea cercetărilor cuprinse în această teză de doctorat: Prof. Dr. Adrian Florea, Prof. Dr. Horea Matei, Conf. Dr. Dan Gheban, Conf. Dr. Lucian Barbu-Tudoran, Conf. Dr. Maria Aluaș, Șef lucr. Dr. Costel Siserman, Șef lucr. Dr. Monica Muntean, Șef lucr. Dr. Veronica Trombitaș, Dr. Mirela Flonta, Dr. Mihaela Lazăr, Dr. Patricia Inișca, Dr. Camelia Albu, Farm. Dr. Maria Ilieș, Asist. med. Monica Laza, Asist. med. Daniela Cuiubș, Autopsier Remus Adam.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

În prima parte a tezei sunt sintetizate cele mai relevante aspecte actuale privind etiopatogeneza celor două afecțiuni studiate, fiind argumentat contextul care a generat ipoteza de lucru.

Rinosinuzita cronică a adultului (CRS), cu (CRS_{NP}) sau fără polipi nazali (CRS_{NP}), reprezintă un spectru de procese infecto-inflamatorii care afectează mucoasa nasului și a sinusurilor paranasale. CRS este una din cele mai răspândite boli cronice, având un impact financiar semnificativ asupra sistemelor de sănătate. Deși eforturile științifice au extins cunoștințele despre CRS, etiopatogeneza acesteia este încă incomplet înțeleasă. Studiul interacțiunii dintre factorii etiopatogenetici ai CRS este indispensabil identificării unor strategii terapeutice noi, care să vizeze în special formele refractare de CRS.

Noul ARN β -coronavirus, numit după principala afecțiune pe care o provoacă - sindromul respirator acut sever-CoronaVirus-2 (SARS-CoV-2) - este agentul etiologic pentru CoronaVirus Disease 19 (COVID-19). La nivelul mucoasei nazale are loc prima etapă a procesului infecțios, aceasta fiind și un rezervor important în procesul de transmitere a bolii. Studiul prezenței SARS-CoV-2 și al modificărilor pe care acesta le produce la nivelul sferei O.R.L. este necesar atât pentru elucidarea primei etape patogenetice a infecției COVID-19, cât și pentru evaluarea corectă a riscului epidemiologic existent în timpul procedurilor otorinolaringologice.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Studiul 1. Cercetări microbiologice prin tehnica spectrometriei de masă cu ionizare prin desorbție laser asistată de o matrice (MALDI-TOF) și prin microscopie electronică privind etiologia rinosinuzitei cronice la adult

Introducere și obiective. Interesul pentru microbiologia CRS este actual, datorându-se atât variației genurilor, speciilor și virulenței acestora, cât și tehnicilor moderne de diagnostic microbiologic. În acest studiu am cercetat spectrul etiologic microbial al CRS utilizând tehnica MALDI-TOF MS și microscopia electronică.

Material și metodă. Studiu observațional prospectiv pe un lot de 32 de pacienți internați în Clinica O.R.L. II, Spitalul Clinic Universitar C.F.R. Cluj-Napoca, în perioada februarie 2018-decembrie 2019, cu diagnostic de CRS (conform criteriilor EPOS), supuși FESS după eșecul tratamentului conservator. Studiul s-a desfășurat cu avizul nr. 87/2018 al Comisiei de Etică a Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca.

Probe de secreție sinusală și fragmente bioptice de mucoasă sinusală au fost prelevate intraoperator. Toate tipurile de colonii microbiene izolate din secreția sinusală au fost identificate prin tehnica MALDI-TOF (aparatură Biotyper Bruker, Bremen, Germania). Susceptibilitatea la antibiotice a speciilor izolate a fost determinată prin metoda difuzimetrică (Kirby-Bauer) cu discuri Oxoid (Basingstoke, Hampshire, Anglia).

Pentru microscopie electronică de baleiaj (SEM), fragmentele de mucoasă sinusală au fost fixate în glutaraldehidă, uscate, acoperite cu aur (Agar Automatic Sputter Coater, Agar Scientific Ltd, Stansted, Essex, Marea Britanie) și examinate la un microscop electronic de baleiaj Hitachi SU8230 (Tokyo, Japonia). Pentru bacteriile cultivate, probele au fost preparate prin metoda amprentei și fixate în vapori de tetroxid de osmiu.

Pentru microscopie electronică de transmisie (TEM), fragmentele au fost fixate în glutaraldehidă, postfixate în tetraoxid de osmiu, deshidratate, infiltrate cu rășină. Secțiunile ultrafine au fost obținute cu ajutorul unui ultramicrotom Leica-UC7, cu un cuiț diamantat Diateome (Leica Microsystems, Bensheim, Austria), colorate cu acetat de uraniu - citrat de plumb și examinate la un microscop electronic de transmisie Jeol 1010 (Tokyo, Japonia).

Rezultate. Dintre formele de CRS, cea odontogenă a fost întâlnită cel mai frecvent (40,6%), urmată de CRSwNP (34,4%), CRSsNP (15,6%) și de sinuzita sfenoidală (9,4%).

Am obținut rezultat microbiologic pozitiv în 62,5% din probele de secreție sinusală: CRSsNP/CRSwNP/odontogenă - 40%/81,8%/69,2% din probele subgrupului respectiv. În 28% din probe au fost evidențiate asocieri bacteriene (CRS polimicrobială), în special la pacienții cu CRS odontogenă. Au fost izolate 17 specii bacteriene, dintre care 9 Gram pozitive (52,9%) și 8 Gram negative (47,1%). *Staphylococcus aureus* și *Streptococcus constellatus ssp faringis* au fost speciile cel mai frecvent izolate.

În toate cazurile am identificat la SEM elemente microbiene pe suprafața mucoasei. Biofilmul microbial a fost identificat în 43,7% din probe, din care 15,6% provenite de la pacienți cu un diagnostic microbiologic negativ.

Concluzii. Tehnica MALDI-TOF permite identificarea unor specii bacteriene dificil de diagnosticat prin metodele clasice. În acest studiu am identificat

Corynebacterium aurimucosum și *Eggerthia cateniformis* ca patogeni implicați în CRS, specii neraportate anterior în etiologia acestei boli.

De asemenea, studiul prezintă importanța actuală a germeilor oportuniști în etiologia CRS, precum și diferențele de spectru etiologic între tipurile de CRS în regiunea noastră geografică.

Studiul 2. Cercetări clinice privind recuperarea pacienților cu rinosinuzită cronică după cura operatorie prin chirurgie sinusală endoscopică funcțională (FESS)

Introducere și obiective. FESS reprezintă standardul de aur în tratamentul chirurgical al CRS, întrerupând lanțul patogenetic al bolii.

Recuperarea pacienților după FESS este influențată de procedurile perioperatorii, de apariția complicațiilor postoperatorii, de stress-ul perioperator al pacientului și de factorii particulari individuali. În acest studiu, am cercetat recuperarea postoperatorie după FESS la pacienții noștri.

Material și metodă. Studiul observațional retrospectiv pe un lot de 74 de pacienți din Clinica O.R.L. II, Spitalul Clinic Universitar C.F.R. Cluj-Napoca, în perioada ianuarie 2017-decembrie 2019, cu diagnostic de CRS (conform criteriilor EPOS), supuși FESS după eșecul tratamentului conservator. Studiul s-a desfășurat cu avizul nr. 87/2018 al Comisiei de Etică a Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, iar publicarea a fost avizată de Comisia de Etică a Spitalului Clinic Universitar C.F.R. Cluj-Napoca (aviz nr. 10/2020).

Pacienții au fost identificați în baza de date a spitalului după codul de diagnostic la externare. Pentru alcătuirea bazei statistice, din fiecare foaie de observație clinică au fost colectate următoarele date: vârstă, sex, lista diagnosticelor la externare, protocol operator, evoluție clinică postoperatorie, tratament medicamentos asociat, rezultatul examenului rinologic la externare, rapoartele de evaluare postoperatorie a recuperării la o lună, respectiv 6 luni postoperator.

Rezultate. Durerea facială postoperatorie a fost cel mai frecvent simptom raportat de pacienți în ziua intervenției și în ziua 1 postoperator (72.9%). Greața a fost al doilea simptom ca frecvență raportat în ziua intervenției și în ziua 1 postoperator, de 41.8% din pacienți, iar emeza, de 8.8%.

În ziua intervenției și în ziua 1 postoperator, 9.4% din pacienți au prezentat epistaxis postoperator. Efectuarea unui nou tamponament nazal anterior a fost necesară pentru 2.7% din pacienți.

La o lună postoperator, 41.8% din pacienți au apreciat îmbunătățirea calității vieții în general, iar după 6 luni - 71.6%; 10.8% din pacienți au raportat durere facială, iar după șase luni - 4%. Îmbunătățirea mirosului (observație subiectivă) a fost raportată de 31% din pacienți la o lună postoperator, iar după șase luni, de 64.8%.

La o lună postoperator, am identificat prezența crustelor nazale la 64.8% din pacienți, iar după șase luni, la 2.7%. La șase luni postoperator, 6.7% din pacienți au dezvoltat sinechii septo-turbionare, iar 2.7% au prezentat CRS refractară.

Concluzii. Pacienții incluși în studiul nostru nu au raportat complicații majore în primele 6 luni din perioada de recuperare postchirurgicală.

Durerea facială postoperatorie a fost tolerată mai greu de pacienții tineri (18-35 de ani), în cazul cărora ameliorarea durerii a necesitat doze mai ridicate de analgezice.

După 6 luni de la intervenție, majoritatea pacienților au raportat îmbunătățirea funcției olfactive și creșterea calității vieții în general.

Medicul otorinolaringolog de provincie și medicul de familie au un rol important în dispensarizarea și educarea pacienților în perioada de recuperare.

Studiul 3. Cercetări microbiologice, anatomo-patologice și biochimice privind modificările mucoasei sino-nazale în rinozinuzita cronică cu polipi nazali versus COVID-19

Introducere și obiective. Mucoasa sino-nazală reprezintă primul sediu anatomic al infecției COVID-19. Ne-am propus studiul morfofpatologic (examen histopatologic, microscopie electronică) al mucoasei sino-nazale a pacienților cu COVID-19 decedați, precum și compararea rezultatelor obținute cu cele observate în mucoasa sino-nazală a pacienților cu CRSwNP supuși FESS, în vederea identificării diferențelor de model inflamator. De asemenea, am efectuat determinarea concentrației IL-33 tisulare într-un lot de pacienți cu CRSwNP supuși FESS și într-un lot de pacienți cu COVID-19 decedați.

Acest studiu compară formele severe de boală în ambele situații: pacienți cu CRSwNP în stadiu avansat, în care este necesară intervenția chirurgicală, respectiv pacienți cu formă fatală de COVID-19.

Material și metodă. Am realizat două studii prospective distincte: unul destinat CRSwNP, iar celălalt - COVID-19.

Studiile au fost realizate cu acordul Comisiei de Etică a Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” din Cluj-Napoca (avizul nr. 87/2018, avizul nr. 388/2020, avizul nr. 288/2021), cu acordul Comisiei de Etică a Spitalului Județean de Urgență Deva (aviz nr. 8942/2021), cu acordul Conducerii Spitalului Județean de Urgență Deva (aviz nr. 8943/2021) și cu acordul Conducerii Institutului de Medicină Legală Cluj-Napoca (aviz nr. 4354/XII/615/2021).

Probele de mucoasă sino-nazală au fost recoltate intraoperator (studiul CRSwNP) sau la 12 ore postmortem (studiul COVID-19).

Gena RdRp (gena ARN polimerază ARN-dependență de ARN, situată în gena Orf1ab) a fost utilizată ca genă țintă în testul PCR SARS-CoV-2. Prezența unei curbe cu peste 45 de cicluri de amplificare a indicat un rezultat pozitiv.

Pentru examenul histopatologic, probele au fost fixate în formaldehidă, procesate (Tissue-Tek VIP 5 Jr, Sakura, Olanda), încorporate în parafină (Tissue-Tek TEC 6, Sakura, Olanda), iar pentru secționarea blocurilor de parafină a fost utilizat microtomul Accu-Cut SRM 200 Rotary Microtome (Sakura, Olanda). Colorarea preparatelor histopatologice a fost efectuată automat (Tissue-Tek Prisma Plus, Sakura, Olanda), conform protocolului intern de colorații uzuale.

Pentru colorația Gram a fost utilizat kitul Gram Stain (Gram Fuchsin Counterstain) (Atom Scientific, Manchester, England) conform protocolului furnizat de producător.

Examinarea preparatelor histopatologice a fost realizată la un microscop Olympus BX46 (Hamburg, Germania).

Pentru microscopie electronică, a fost utilizat protocolul prezentat anterior la studiul 1.

Concentrația de IL-33 în lizatul tisular a fost determinată prin test imunisorbant legat de enzimă (ELISA) cu ajutorul kitului ELISA IL-33 (R&D Systems, Minneapolis, Statele Unite ale Americii).

Rezultate. Pentru lotul caz COVID-19, încărcătura virală ridicată ($Ct \leq 25$) a fost identificată în 58,3% din probe, respectiv încărcătură virală intermediară ($25 < Ct < 35$) la 41,7% din probele analizate.

Histopatologic, edemul stromal a fost observat în 92% din probele CRSwNP, dar numai în 25% din probele COVID-19. În timp ce majoritatea probelor CRSwNP cu edem stromal au prezentat inflamație de tip mixt (24%) și infiltrat preponderent eozinofilic (56%), în probele COVID-19 cu edem stromal s-a observat numai infiltrat preponderent limfocitar. Metaplazia scuamoasă, îngroșarea membranei bazale și fibroza stromală au fost observate în 28%, 68% și 36% din probele CRSwNP, respectiv în 41.6%, 33.3% și 0% din probele COVID-19. În CRSwNP, îngroșarea membranei bazale se observă chiar și după rezoluția procesului inflamator, cu sau fără restaurarea epiteliului normal, respirator ciliat. Biofilmul microbial a fost identificat pe suprafața mucoasei doar la pacienții CRSwNP - 40% din probele analizate. Într-o probă, am identificat un efect citopat al infecției virale: apariția unor celule gigante multinucleate, citomegalie cu incluziuni nucleare eozinofile și necrobioză indusă, însoțită de liză nucleară.

La SEM au fost identificate biofilme microbiene doar în probele de CRSwNP (56%), atât bacteriene, cât și mixte (bacterii și fungi). Majoritatea probelor COVID-19 au prezentat colonii microbiene aderente de suprafață, neacoperite de matrice polizaharidică extracelulară (75% din probe), preponderant bacteriene (25%) sau mixte - bacteriene și fungice (25%). Coloniile microbiene au fost identificate în 28% din probele de CRSwNP (n=7/25), majoritatea fiind fungice (12%). Atât în CRSwNP, cât și în COVID-19, am identificat prezența unor elemente nanomicrobiene. De asemenea, am identificat celule aparținând sistemului imunitar local în 58.3% din probele COVID-19, respectiv în 28% din probele CRSwNP. Disfuncția ciliară a fost observată în 76% din probele CRSwNP și în 33.3% din probele COVID-19.

La TEM, în probele CRSwNP, au fost identificate biofilme microbiene de suprafață (39% din probe), iar în 76% - hiperplazia celulelor mucoase. În membrana bazală și în corion, au fost identificate eozinofile, fibroblaste, fibrocite și mastocite, înconjurate de fibre de colagen. În probele COVID-19, am identificat, extracelular, în vecinătatea cililor, prezența unor structuri sugestive pentru virusul SARS-CoV-2. În celulele epiteliale de suprafață am remarcat abundența aparatului Golgi.

Concentrația tisulară medie de IL-33 în probele CRSwNP a fost semnificativ statistic mai mare decât în probele COVID-19 ($p < 0.0001$).

Concluzii. Deși cele două afecțiuni pot împărtăși caracteristici histopatologice comune, modelul inflamator existent este diferit.

Disbioza nazală pare un factor determinant în CRSwNP și un factor secundar în COVID-19. Mucoasa nazală a pacienților cu COVID-19 răspunde infecției prin disbioză și implicarea intensă a celulelor imune de suprafață, suferind și efecte citopate virale. Mucoasa nazală a pacienților cu CRSwNP se caracterizează, de asemenea, prin disbioză, argumentată de prezența biofilmelor microbiene.

Studiul 4. Cercetări microbiologice de virusologie moleculară și microscopie electronică privind prezența virusului SARS-CoV-2 în urechea medie a pacienților cu COVID-19

Introducere și obiective. Conexiunea anatomică directă a urechii medii cu nazofaringele, prin intermediul trompei lui Eustachio, permite tranzitul microorganismelor din nazofaringe către urechea medie și mastoidă. Receptorii ACE2 și TMPRSS2 sunt prezenți și în trompa lui Eustachio, în urechea medie și în cohlee, sugerând că aceste țesuturi sunt susceptibile la infecția cu SARS-CoV-2.

În acest studiu am cercetat prezența virusului SARS-CoV-2 în urechea medie a pacienților cu COVID-19 decedați, precum și aspectele histopatologice și ultramicroscopice ale mucoasei urechii medii la acești pacienți.

Material și metodă. Probe tisulare din urechea medie și din mucoasa etmoidală au fost recoltate de la opt pacienți cu COVID-19 decedați. Studiul a fost realizat cu acordul Comisiei de Etică a Spitalului Județean de Urgență Deva (aviz nr. 8942/2021 și aviz nr. 17187/2021), cu acordul conducerii Spitalului Județean de Urgență Deva (aviz nr. 8943/2021 și 17188/2021) și cu acordul Comisiei de Etică a Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” din Cluj-Napoca (avizul nr. 287/2021).

Pentru testul RT-PCR SARS-CoV-2, extracția ARN-ului total s-a efectuat cu ajutorul NucleoSpin RNA pentru țesuturi (Macherey-Nagel, Dueren, Germany) și MagnaPure 96 DNA - Viral NA, conform instrucțiunilor producătorului. Amplificarea a fost realizată cu ajutorul QuantStudio 7 Pro Real-Time PCR System (Applied Biosystems) și/sau Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, Hercules, CA). Pentru toate probele SARS-CoV-2 ARN- pozitive (atât din mucoasa etmoidală, cât și din urechea medie) s-a practicat secvențierea întregului genom.

Pregătirea probelor pentru examenul histopatologic și prepararea lor pentru microscopie electronică s-au efectuat după aceleași protocoale prezentate anterior la studiul 1, respectiv studiul 3.

Rezultate. Rezultatul testului PCR a fost pozitiv pentru 75% din probele de mucoasă sino-nazală, respectiv pentru 50% din probele de mucoasă a urechii medii. Astfel, 66.6% din cazurile cu rezultat pozitiv în mucoasa nazală, au prezentat rezultat pozitiv și în mucoasa urechii medii. Valorile Ct au fost cuprinse între 17 și 37, cu valori mai mari (încărcături virale mai mici) în probele de mucoasă din urechea medie. Analiza subtipului viral a indicat că toate secvențele aparțin liniei B.1.1.7.

La examenul histopatologic și la SEM nu am identificat elemente patologice.

Dat fiind timpul de 12 ore între deces și momentul recoltării, la TEM aproape toate probele au prezentat alterarea critică a morfologiei celulare, liză celulară și vacuole autofagice. În aceste condiții, nu putem afirma cu exactitate identificarea virusului SARS-CoV-2, dar arătăm prezența unor structuri sugestive pentru acest virus. La nivelul epitelului am identificat celule caliciforme și celule aparținând sistemului imunitar. În stratul subepitelial, am identificat fibrocite înconjurate de fibre de colagen. Pe suprafața externă a membranei timpanice am identificat bacterii, cel mai probabil comensale ale conductului auditiv extern.

Concluzii. La pacienții COVID-19, virusul SARS-CoV-2 poate fi prezent în urechea medie chiar și atunci când aceștia nu dezvoltă otită medie acută, situație în care încărcătura virală este mică și nu apar modificări histopatologice la nivelul mucoasei.

Studiul 5. Coinfecția pulmonară COVID-19-*Pneumocystis jirovecii* - primul caz confirmat prin autopsie

Introducere și obiective. Virusul SARS-CoV-2 determină imunosupresie, coinfecțiile asociate COVID-19 fiind suspicionate frecvent la formele severe de boală. Apariția cazurilor de coinfecție COVID-19-*Pneumocystis* a fost raportată anterior pe baza diagnosticului de laborator și pare să fie subestimată în practica clinică.

Diagnosticul de coinfecție COVID-19-*Pneumocystis* este provocator din pricina caracteristicilor clinice și radiologice comune ale celor două afecțiuni și din cauza dificultăților de realizare a diagnosticului de laborator.

Obiectivul acestui studiu a constat în prezentarea unui caz de coinfecție COVID-19-*Pneumocystis* confirmată în urma autopsiei.

Prezentarea cazului clinic. Pacient de sex masculin, în vârstă de 52 de ani, fumător și potator cronic, sudor (expus la noxe respiratorii profesionale timp de cca 20 de ani) se prezintă în Unitatea de Primire a Urgențelor pentru dispnee, tuse și durere toracică posterioară dreaptă, frisoane și febră înaltă (39°C). Pacientul prezintă multiple comorbidități: steatoză hepatică, hepatopatie cronică etanolică, cardiopatie hipertensivă și ischemică, hipertensiune arterială esențială.

La examenul obiectiv se constată: pacient tahipneic, cu facies congestionat, raluri crepitante bazal dreapta, cu SaO₂ 92%, TA 200/160 mmHg, AV 106 bpm. Radiografia pulmonară evidențiază o zonă de condensare pulmonară în treimea postero-inferioară a plămânului drept.

Analizele de laborator relevă leucopenie cu limfopenie, trombocitopenie, timp de protrombină prelungit, INR 1.15, hepatocitoliză, colestază, clearance-ul creatininei scăzut, retenție azotată, sindrom inflamator, anticorpi anti-HIV1-2 nedetectabili, anticorpi anti-SARS COV-2 nedetectabili, test RT-PCR SARS COV-2 negativ.

În urma interpretării investigațiilor clinice și paraclinice se stabilește diagnosticul de pneumonie bazală dreaptă, insuficiență respiratorie acută, insuficiență hepatică acută pe fond de hepatopatie cronică etanolică, insuficiență renală acută. Se instituie tratament antiinflamator steroidian, antibiotic, antihipertensiv, oxigenoterapie. Pacientul decedează după 17 ore de la prezentare.

La necropsie se constată: cca 1700 ml lichid seros în cavitatea pleurală dreaptă, cu depuneri cenușii, care se regăsesc focal și pe suprafața pleurei drepte. În cavitatea pleurală stângă - cca 500 ml lichid sero-citrin. Plămânul drept prezintă la nivelul lobului inferior, medial, o zonă bine delimitată roșie-cenușie, cu mici zone violacee de consistență crescută, având suprafața de secțiune granulară, uscată. Glandele suprarenale prezintă medulara hemoragică bilateral.

Având în vedere persistența suspiciunii de infecție cu SARS-CoV-2, au fost recoltate fragmente pulmonare din zona roșie-cenușie a lobului inferior drept, rezultatul testului RT-PCR fiind pozitiv. Izolarea ARN-ului a fost efectuată cu ARN NucleoSpin pentru probe de țesut (Macherey-Nagel, Dueren, Germania) conform instrucțiunilor producătorului, Ct RdRp 25.3.

Pentru examenul histopatologic, am folosit un microscop Olympus BX40 (Japan) cu o cameră foto Olympus Camedia 4040, colorație hematoxilină-eozină (kit de colorare Laboratorium, București, România), colorație Giemsa (kit de colorare produs de Merck, Darmstadt, Germania), colorație PAS (Merck, Darmstadt, Germania) și colorație Grocott (trusă de colorare produsă în laboratorul Serviciului de Anatomie Patologică al Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii Cluj-Napoca). Pentru imunohistochimie, s-au folosit anticorpi anti-CD3 (Dako, anticorp policlonal de iepure) și anti-CD45 (Dako, anticorp monoclonal de șoarece, clona 2B11+PD7/26). Reacția de imunomarcare a fost efectuată automat (Leica Bond-Max, Melbourne, Victoria, Australia) cu ajutorul unui sistem de detecție Leica Biosystems (Melbourne, Victoria, Australia), cromogen 3,3'-diaminobenzidină.

Examenul histopatologic a evidențiat atât leziuni preexistente, care pot fi atribuite comorbidităților, cât și leziuni recente, apărute în contextul infecției COVID-19.

În țesutul pulmonar, am identificat, pe un fond de fibroză, multiple tromboze. În vasele trombozate au fost observate limfocite aderente de endoteliu, sugerând

endotelita. În limfaticile perivasculare dilatate se observă un exudat a cărui celularitate este similară cu cea a exudatului alveolar.

Exudatul alveolar este bogat în macrofage spumoase. Imunomarcarea exudatului este pozitivă pentru CD45, dar negativă pentru CD3. Imunomarcarea celulelor sistemului imunitar înăscut pentru iNOS este extrem de slabă. În alveolele pline cu macrofage, am identificat forme chistice cu conținut multinuclear. Acestea au fost pozitive în colorație Giemsa, în colorație Grocott-Gomori și în colorație PAS.

Exudatul albicios-cenușiu descris macroscopic la suprafața pleurei este un amestec de fibrină și material granular bazofil, bogat în celule rotunde cu nuclee veziculare. Aceste celule sunt pozitive în colorațiile Giemsa și Grocott, argumentând diagnosticul de pneumocistoză. Pornind de la acest aspect, foarte sugestiv pentru *Pneumocystis*, reiese că materialul alveolar spumos fagocitat de macrofagele activate este identic cu acest material granular bazofil, iar formele chistice descrise anterior sunt chiste de *Pneumocystis*.

Fibrele musculare miocardice sunt hipertrofiate și fragmentate, iar în vasele venoase intraamocardice sunt prezenți microtrombi. Ficatul prezintă steatoză etanolică. Ramurile medii și mari ale venelor suprahepatice prezintă infiltrat inflamator. Rinichiul prezintă necroză tubulară difuză (rinichi de șoc), iar glandele suprarenale - hemoragie medulară masivă.

Concluzii. Coinfecția COVID-19-*Pneumocystis* trebuie luată în considerare, în mod sistematic, în toate cazurile severe de COVID-19, chiar și atunci când nu sunt identificați factorii de risc cunoscuți pentru pneumocistoză.

CONCLUZII GENERALE

Această teză subliniază că, deși mecanismele patogenetice ale rinosinuzitei cronice sunt diferite, acestea nu se exclud reciproc, ci dimpotrivă, sunt puternic intricate. Cel mai probabil, realitatea din spatele mecanismelor pe care noi le cunoaștem în prezent ca fiind implicate în inițierea sau menținerea rinosinuzitei cronice, este mult mai complexă. Rămâne cert faptul că factorul microbial - patogen sau oportunist - este una din cele mai importante verigi patogenetice ale rinosinuzitei cronice.

Tehnica MALDI-TOF MS oferă posibilitatea identificării unor specii microbiene dificil de diagnosticat prin metodele clasice. Morfologia bacteriană a aceleiași specii poate fi diferită în biofilmul sinusal față de forma izolată în cultură. Faptul că în majoritatea cazurilor de rinosinuzită cronică studiate am identificat germeni oportuniști, impune continuarea cercetărilor asupra factorilor de virulență prin care aceste specii declanșează/întrețin boala.

Chirurgia sinusală endoscopică funcțională întrerupe lanțul patogenetic al rinosinuzitei cronice, acționând direct asupra unor factori etiologici. Rezultatele studiului nostru arată că după 6 luni de la intervenție, majoritatea pacienților din lotul studiat au raportat îmbunătățirea funcției olfactive și creșterea calității vieții, fără să fi suferit complicații postoperatorii majore.

Rinosinuzita cronică și infecția COVID-19 pot împărtăși caracteristici histopatologice comune la nivelul mucoasei nazale, dar modelul inflamator identificat este diferit. Disbioza nazală pare un factor determinant în CRSwNP și un factor secundar în COVID-19. Studiul interacțiunii inițiale gazdă-virus în microbiota nazală poate conduce la înțelegerea modului de apariție și modularea a răspunsului inflamator sistemic în COVID-19. Având în vedere că însămănțarea virală pulmonară este

secundară celei nazale, continuarea cercetărilor rinologice în COVID-19 este necesară atât pentru a studia factorii locali ce pot iniția răspunsul hiperinflamator sistemic, cât și posibilitatea dezvoltării unui vaccin intranasal.

Studiul interacțiunii dintre factorii etiologici ai inflamației cronice din rinosinuzită ne va poziționa mai aproape de tratamentul optim și individualizat al acestei afecțiuni, în special pentru cazurile refractare.

La pacienții cu COVID-19, virusul SARS-CoV-2 poate fi prezent în urechea medie chiar și atunci când aceștia nu dezvoltă otită medie acută. Sunt necesare cercetări suplimentare în vederea elucidării interacțiunii dintre SARS-CoV-2 și mecanismele otologice locale de apărare, pe de o parte, și dintre SARS-CoV-2 și microbiota locală, pe de altă parte.

Otorinolaringologii sunt expuși în mod special la infecția COVID-19. Prezența certă a SARS-CoV-2 în urechea medie are implicații semnificative pentru procedurile de otorinolaringologie.

Coinfecția COVID-19-*Pneumocystis* ar trebui luată în considerare în special la pacienții în stare critică, chiar dacă aceștia nu prezintă factorii de risc pentru pneumocistoză descriși în literatură. Cel mai probabil infecția COVID-19 constituie un factor de risc independent pentru pneumocistoză.

ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI

Teza reunește, într-o abordare originală, subiecte de actualitate în microbiologie și otorinolaringologie. Rinosinuzita cronică are o etiopatogeneză intens studiată, dar tehnicile actuale de cercetare pun vechile descoperiri într-o lumină nouă. Infecția COVID-19, nou apărută, necesită cercetări aprofundate în vederea descoperirii punctelor etiopatogenetice în care terapia poate acționa cel mai eficient. Ambele afecțiuni au un impact de necontestat asupra societății umane și asupra finanțelor alocate sănătății.

Contribuțiile inovative ale tezei sunt următoarele:

1. Identificarea speciilor bacteriene *Corynebacterium aurimucosum* și *Eggerthia cateniformis* ca agenți etiologici ai rinosinuzitei cronice.

2. Identificarea germeilor oportuniști în majoritatea cazurilor de rinosinuzită cronică studiate de noi.

3. Identificarea unor modele inflamatorii patogenetice diferite în mucoasa nazală a pacienților cu rinosinuzită cronică cu polipi, respectiv infecție COVID-19.

4. Identificarea efectului viral citopat în mucoasa nazală a pacienților cu COVID-19 decedați.

5. Identificarea unor aspecte morfologice ale mucoasei nazale care sugerează disbioza nazală ca factor determinant în rinosinuzita cronică cu polipi, respectiv ca factor secundar în infecția COVID-19. Cercetarea rolului probioticelor/vaccinului intranasal în modularea microbiotei nazale va sta la baza unor studii viitoare.

6. Identificarea virusului SARS-CoV-2 în urechea medie a pacienților cu COVID-19 decedați.

7. Determinarea încărcăturii virale a SARS-CoV-2 în mucoasa nazală versus mucoasa urechii medii: virusul prezintă o încărcătură superioară în mucoasa nazală.

8. Identificarea coinfecției COVID-19-*Pneumocystis jirovecii* la un pacient autopsiat (primul caz raportat).

PHD THESIS ABSTRACT

Microbiological, pathological and clinical research on the etiopathogenesis of chronic rhinosinusitis and COVID-19 virosis

PhD Student: **Ionuț Isaia Jeican**

PhD Scientific Coordinator: Prof. **Lia Monica Junie, MD**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABEL OF CONTENTS

INTRODUCTION	13
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Etiopathogenesis of chronic rhinosinusitis in adults - current landmarks	17
1.1. The general framework	17
1.2. The microbial factor	19
1.3. The role of functional endoscopic sinus surgery (FESS) in relation to the etiopathogenesis of chronic rhinosinusitis	20
2. Etiopathogenesis of COVID-19 virosis - general landmarks	23
2.1. The general framework	23
2.2. Involvement of the O.R.L. in the pathogenesis of COVID-19 virosis	24
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Work hypothesis	29
2. Study 1 Microbiological research through matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight technology and electron microscopy on chronic rhinosinusitis etiology	31
2.1. Introduction	31
2.2. Objectives of study	31
2.3. Material and method	32
2.4. Resultate	34
2.5. Discussions	40
2.6. Conclusions	42
3. Study 2 Clinical research on rehabilitation of patients with chronic rhinosinusitis after functional endoscopic sinus surgery	43
3.1. Introduction	43
3.2. Objectives of study	43
3.3. Material and method	44
3.4. Results	46
3.5. Discussions	48

3.6. Conclusions	53
4. Study 3 Microbiological, pathological and biochemical research on changes of respiratory nasal mucosa in chronic rhinosinusitis with nasal polyps versus COVID-19	55
4.1. Introduction	55
4.2. Objectives of study	56
4.3. Material and method	56
4.4. Results	60
4.5. Discussions	76
4.6. Conclusions	81
5. Study 4 Molecular virology microbiological research and electron microscopy on evidence of SARS-CoV-2 virus in the middle ear of deceased COVID-19 patients	83
5.1. Introduction	83
5.2. Objectives of study	83
5.3. Material and method	83
5.4. Results	85
5.5. Discussions	89
5.6. Conclusions	92
6. Study 5 COVID-19 and <i>Pneumocystis jirovecii</i> pulmonary coinfection - the first case confirmed through autopsy.	
6.1. Introduction	93
5.2. Objectives of study	93
5.3. Clinical case presentation	94
5.4. Discussions	102
5.5. Conclusions	105
7. General conclusions	107
8. Originality of research and innovative contribution	109
REFERENCES	111

Key-words: COVID-19, SARS-CoV-2, *Pneumocystis jirovecii*, nasal mucosa, nasal polyps, chronic rhinosinusitis, biofilm, functional endoscopic sinus surgery, MALDI-TOF MS, middle ear

INTRODUCTION

The etiopathogenesis of chronic rhinosinusitis is still a topic of great interest for otolaryngologists, interest determined both by the refractory forms of the disease and by the evolution of laboratory techniques. The recovery of the patients with chronic rhinosinusitis after functional endoscopic sinus surgery is another topic of interest, closely related to the etiopathogenesis of the disease. Approaching this subjects in the first three studies of the thesis was possible due to the large number of rhino-sinus interventions performed in Clinica O.R.L.-Chirurgie cervico-facială II from Cluj.

The outbreak of the COVID-19 pandemic has mobilized the scientific research forces around the world. Engaged in the fight against this unknown virus, we wanted to bring our contribution to the highest technical level we had, by studying the pathogenic mechanisms of this infection in the field of otorhinolaryngology.

With the hope and desire that this thesis, through its modest results, will contribute to the health of our fellows, I express my gratitude to the Almighty God for the work force and for the teachers He has given to me: Prof. Dr. Lia Monica Junie, Prof. Dr. Silviu Albu, Conf. Dr. Iulian Opincariu. I am truly thankful to the team that contributed to the researches from this PhD thesis: Prof. Dr. Adrian Florea, Prof. Dr. Horea Matei, Conf. Dr. Dan Gheban, Conf. Dr. Lucian Barbu-Tudoran, Conf. Dr. Maria Aluaş, Head of work Dr. Costel Siserman, Head of work Dr. Monica Muntean, Head of work Dr. Veronica Trombitaş, Dr. Mirela Flonta, Dr. Mihaela Lazăr, Dr. Patricia Inişca, Dr. Camelia Albu, Farm. Dr. Maria Ilieş, Assist. med. Monica Laza, Assist. med. Daniela Cuibus, Autopsy specialist Remus Adam.

CURRENT STAGE OF KNOWLEDGE

In the first part of the thesis are summarized the most relevant current aspects about the etiopathogenesis of the two studied diseases, being argued the context that led to the work hypothesis.

The chronic rhinosinusitis of the adult (CRS), with (CRSwNP) or without nasal polyps (CRSsNP), is a spectrum of infectious-inflammatory processes that affect the nasal cavity and para-nasal sinuses. CRS is one of the most common chronic disease, with a significant financial impact on health systems. Although the scientific efforts have extended the CRS knowledge, its etiopathogenesis is still incompletely understood. The study on the interaction between the etiopathogenetic factors of CRS is essential to identify new therapeutic strategies, targeting in particular the refractory forms of CRS.

The new β -coronavirus RNA, named after the main condition it causes – severe acute respiratory syndrome - CoronaVirus-2 (SARS-CoV-2) – is the etiological agent for CoronaVirus Disease 19 (COVID-19). The first stage of the infectious process takes place in the nasal mucosa, which is also an important reservoir in the process of transmitting the disease. The study of the SARS-CoV-2 presence and of the changes it produces in the O.R.L. is necessary both for the elucidation of the first pathogenic stage of the COVID-19 infection and for the correct evaluation of the epidemiological risk existent during the otorhinolaryngological procedures.

PERSONAL CONTRIBUTION

Study 1. Microbiological research through matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight technology and electron microscopy on chronic rhinosinusitis etiology

Introduction and objectives. The interest in CRS microbiology is current, due to both the variation of genre, species and their virulence, as well as to the modern microbiological diagnostic techniques. In this study we investigated the microbial etiological spectrum of CRS using the MALDI-TOF MS technique and electron microscopy.

Material and method. Prospective observational study on a group of 32 patients hospitalized in Clinica O.R.L. II, Spitalul Clinic Universitar C.F.R. Cluj-Napoca,, between February 2018-December 2019, with CRS diagnosis (according to EPOS criteria), subjected to FESS after the failure of conservative treatment. The study was carried out with the approval no. 87/2018 of the Ethics Commission of Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca.

Sinus secretion and bioptic fragments of sinus mucosa were prevailed intraoperatively. All types of microbial colonies isolated by the sinus secretion were identified through the MALDI-TOF technique (Biotyper Bruker device, Bremen, Germany). The antibiotic susceptibility of isolated species was determined by the diffusimetric method (Kirby-Bauer) with Oxoid discs (Basingstoke, Hampshire, England).

For scanning electron microscopy (SEM), the fragments of sinus mucosa were fixed in glutaraldehyde, dried, covered with gold (Agar Automatic Sputter Coater, Agar Scientific Ltd, Stansted, Essex, Great Britain) and examined under a Hitachi SU8230 (Tokyo, Japan) scanning electron microscope. For the prevailed bacteria, the samples were prepared by fingerprint method and fixed in osmium tetroxide vapor.

For transmission electron microscopy (TEM), the fragments were fixed in glutaraldehyde, post-fixed in osmium tetroxide, dehydrated, infiltrated with resin. The ultrafine sections were obtained using a Leica-UC7 ultramicrotome, with a Diateome diamond knife (Leica Microsystems, Bensheim, Austria), uranyl acetate - lead citrate stained and examined under a Jeol 1010 transmission electron microscope (Tokyo, Japan).

Results. Among the CRS forms, the odontogenic one was the most common (40,6%), followed by CRSwNP (34,4%), CRSsNP (15,6%) and by sphenoid sinusitis (9,4%).

We have obtained a positive microbiological result in 62,5% of the sinus secretion samples: CRSsNP/CRSwNP/odontogenic - 40%/81,8%/69,2% of the samples of that subgroup. In 28% of the samples, bacterial associations (polymicrobial CRS) were found, especially at patients with odontogenic CRS. 17 bacterial species were isolated, of which 9 Gram positive (52,9%) and 8 Gram negative (47,1%). *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus constellatus ssp faringis* were the most frequently isolated species.

In all cases we identified at SEM microbial elements on the mucosal surface. The microbial biofilm was identified in 43,7% of the samples, of which 15,6% from patients with a negative microbiological diagnosis.

Conclusions. The MALDI-TOF technique allows the identification of bacterial species difficult to diagnose by classical methods. In this study we have identified

Corynebacterium aurimucosum and *Eggerthia cateniformis* as pathogens involved in CRS, species not previously reported in the etiology of this disease.

The study, also, presents the current importance of opportunistic germs in the CRS etiology, as well as the differences in etiological spectrum between the types of CRS in our geographical region.

Study 2 Clinical research on rehabilitation of patients with chronic rhinosinusitis after functional endoscopic sinus surgery (FESS)

Introduction and objectives. FESS is the gold standard in the surgical treatment of CRS, disrupting the pathogenic chain of the disease.

Patient's recovery after FESS is influenced by the perioperative procedures, by the postoperative complications, postoperative stress of the patient and by individual particular factors. In this study, we investigated the postoperative recovery after FESS in our patients.

Material and method. Retrospective observational study on a group of 74 patients from Clinica O.R.L. II, Spitalul Clinic Universitar C.F.R. Cluj-Napoca, between January 2017-December 2019, with CRS diagnosis (according to EPOS criteria), subjected to FESS after the failure of conservative treatment. The study was carried out with the approval no. 87/2018 of the Ethics Commission of Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, and the publication was approved by the Ethics Commission of Spitalului Clinic Universitar C.F.R. Cluj-Napoca (approval no. 10/2020).

Patients were identified in the hospital's database by the diagnostic code at discharge. To compile the statistical basis, the following data were collected from each clinical observation sheet: age, sex, list of diagnoses at discharge, operative protocol, postoperative clinical evolution, associated drug treatment, the result of the rhinologic examination at discharge, postoperative evaluation reports of recovery at one month, and at 6 months postoperative.

Results. Postoperative facial pain was the most common symptom reported by patients on the day of surgery and on day 1 postoperative (72.9%). Nausea was the second most common symptom reported on the day of surgery and on day 1 postoperative, 41.8% of patients, and emesis 8.8%.

On the day of surgery and day 1 postoperative, 9.4% of patients had postoperative epistaxis. A new anterior nasal tamponade was required for 2.7% of patients.

At one month postoperative, 41.8% of patients reported the improvement of the quality of life in general, and after 6 months - 71.6%; 10.8% of patients reported facial pain and after six months - 4%. The improvement of smell (subjective observation) was reported by 31% of patients after one month postoperative, and after six months 64.8%.

At one month postoperative, we identified the presence of nasal crusts in 64.8% of patients, and after six months in 2.7%. At six months postoperative 6.7% of patients developed septo-vortex synechiae, and 2.7% had refractory CRS.

Conclusions. The patients included in our study did not report major complications in the first 6 months of post-surgical recovery period.

The postoperative facial pain was more difficult to tolerate in young patients (18-35 years), who needed higher doses of painkillers.

6 months after surgery, most of patients reported an improvement of the olfactory functions and an increase of the quality of life in general.

The provincial otolaryngologist and family doctor have an important role in the dispensarisation and education of patients in the recovery period.

Study 3 Microbiological, pathological and biochemical research on changes of respiratory nasal mucosa in chronic rhinosinusitis with nasal polyps versus COVID-19

Introduction and objectives. The sinonasal mucosa is the first anatomic site of COVID-19 infection. We proposed the morphopathological study (histopathological examination, electron microscopy) of the sinonasal mucosa of deceased patients with COVID-19, as well as the comparison of the results obtained with those observed in the sinonasal mucosa of patients with CRSwNP undergoing FESS, in order to identify the differences of the inflammatory patters.

This study compares severe forms of the disease in both situations: patients with advanced CRSwNP, in which surgery is necessary, and patients with fatal form of COVID-19.

Material and method. We conducted two separate prospective studies: one for CRSwNP, and the other for COVID-19.

The studies were carried out with the permission of the Ethical Commission of Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” from Cluj-Napoca (approval no. 87/2018, approval no. 388/2020, approval no. 288/2021), with the approval of the Ethical Commission of Spitalul Județean de Urgență Deva (approval no. 8942/2021), with the permission of the Management of Spitalul Județean de Urgență Deva (approval no. 8943/2021) and the agreement of the Management of Institutul de Medicină Legală Cluj-Napoca (approval no. 4354/XII/615/2021).

The sinonasal mucosa samples were collected intraoperatively (CRSwNP study) or at 12 hours postmortem (COVID-19 study).

The RdRp gene (RNA-dependent RNA polymerase gene, located in Orf1ab gene) was used as target gene in the SARS-CoV-2 PCR assay. The presence of a curve with more than 45 amplification circles showed a positive result.

For the histopathological examination, the samples were fixed in formaldehyde, processed (Tissue-Tek VIP 5 Jr, Sakura, The Netherlands), embedded in paraffin (Tissue-Tek TEC 6, Sakura, The Netherlands), and to section the paraffin block was used the Accu-Cut SRM 200 Rotary Microtome (Sakura, The Netherlands). The staining of the histopathological preparations was performed automatically (Tissue-Tek Prisma Plus, Sakura, The Netherlands), according to the internal usual staining protocol.

The Gram Stain kit (Gram Fuchsin Counterstain) (Atom Scientific, Manchester, England) was used for Gram staining according to the protocol provided by the manufacturer.

The examination of the histopathological preparations was performed under an Olympus BX46 microscope (Hamburg, Germany).

For electron microscopy it was used the protocol previously presented in study 1.

The IL-33 concentration in the tissue lysate was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using the ELISA IL-33 kit (R&D Systems, Minneapolis, USA).

Results. For the COVID-19 case group, the high viral load ($Ct \leq 25$) was identified in 58,3% of the samples, respectively the intermediate viral load ($25 < Ct < 35$) in 41,7% of the analyzed samples.

Histopathologically, the stromal edema was observed in 92% of the CRSwNP samples, but only in 25% of the COVID-19 samples. While most of the CRSwNP samples with stromal edema showed mixed inflammation (24%) and predominantly eosinophilic infiltrated (56%), in the COVID-19 samples with stromal edema only predominantly lymphocytic infiltrated was observed. Squamous metaplasia, thickening of the basement membrane and stromal fibrosis were observed in 28%, 68% and 36% of the CRSwNP samples, and in 41.6%, 33.3% and 0% of the COVID-19 samples. In CRSwNP, the thickening of the basement membrane is observed even after the resolution of the inflammatory process, with or without restoration of the normal, ciliated respiratory epithelium. The microbial biofilm was identified on the mucosal surface only in CRSwNP patients - 40% of the analyzed samples. In one sample, we identified a cytopathic effect of the viral infection: the appearance of multinucleated giant cells, cytomegalovirus with eosinophilic nuclear inclusions and induced necrobiosis, followed by nuclear lysis.

At SEM, microbial biofilm were identified only in the CRSwNP samples (56%), both bacterial and mixed (bacteria and fungi). Most COVID-19 samples showed surface adherent microbial colonies, uncovered by the extracellular polysaccharide matrix (75% of samples), mostly bacterial (25%) or mixed - bacterial and fungal (25%). The microbial colonies were identified in 28% of the CRSwNP samples ($n=7/25$), most of which were fungal (12%). In both CRSwNP and COVID-19, we identified the presence of nano-microbial elements. We also identified cells belonging to the local immune system in 58.3% of the COVID-19 samples, and in 28% of the CRSwNP samples. Chilean dysfunction was observed in 76% of the CRSwNP samples and in 33.3% of the COVID-19 samples.

At TEM, in the CRSwNP samples, surface microbial biofilms were identified (39% of the samples), and in 76% - mucosa cell hyperplasia. In the basement membrane and in chorion were identified eosinophils, fibroblasts and mast cells, surrounded by collagen fibers. In the COVID-19 samples, we identified, extracellularly, in the vicinity of cilia, the presence of suggestive structures for the SARS-CoV-2 virus. In the surface epithelial cells we noticed the abundance of Golgi apparatus.

The IL-33 medium tissue concentration in the CRSwNP samples was statistically significantly higher than in the COVID-19 samples ($p < 0.0001$).

Conclusions. Although the two conditions may share common hispathological features, the inflammatory pattern is different.

The nasal dysbiosis seems to be a determining factor in CRSwNP and a secondary factor in COVID-19. The nasal mucosa of patients with COVID-19 responds to infection by dysbiosis and intense involvement of the surface immune cells, suffering also cytopathic viral effects. The nasal mucosa of patients with CRSwNP is also characterized by dysbiosis, argued by the presence of microbial biofilms.

Study 4 Molecular virology microbiological research and electron microscopy on evidence of SARS-CoV-2 virus in the middle ear of deceased COVID-19 patients

Introduction and objectives. The direct anatomical connection of the middle ear with the nasopharynx, through the Eustachian tube, allows the transit of

microorganisms from the nasopharynx to the middle and mastoid ear. The ACE2 and TMPRSS2 receptors are also present in the Eustachian tube, middle ear and cochlea, suggesting that these tissues are susceptible to SARS-CoV-2 infection.

In this study we investigated the presence of the SARS-CoV-2 virus in the middle ear of the COVID-19 deceased patients, as well as the histopathological and ultramicroscopic aspects of the middle ear mucosa in these patients.

Material and method. Tissue samples from the middle ear and ethmoid mucosa were collected from eight deceased COVID-19 patients. The study was carried out with the approval of the Ethical Commission of Spitalul Județean de Urgență Deva (approval no. 8942/2021 and approval no. 17187/2021), with the agreement of the management of Spitalul Județean de Urgență Deva (approval no. 8943/2021 and 17188/2021) and with the consent of the Ethical Commission of Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” from Cluj-Napoca (approval no. 287/2021).

For the SARS-CoV-2 RT-PCR test, the total RNA extraction was performed using NucleoSpin RNA for tissues (Macherey-Nagel, Dueren, Germany) and MagnaPure 96 DNA - Viral NA, according to the manufacturer's instructions. The amplification was performed using QuantStudio 7 Pro Real-Time PCR System (Applied Biosystems) and/or Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, Hercules, CA). For all SARS-CoV-2 RNA-positive samples (both from ethmoid mucosa and from the middle ear) the whole genome was sequenced.

The preparations of the samples for histopathological examination and for electron microscopy were performed after the same protocols previously presented in study 1 and study 3.

Results. The result of the PCR test was positive for 75% of the sinusoidal nasal mucosa samples and for 50% of the middle ear mucosa samples. Thus, 66.6% of the cases with a positive result in the nasal mucosa also showed a positive result in the mucosa of the middle ear. The Ct values were between 17 and 37, with higher values (lower viral loads) in the mucosa samples from the middle ear. The viral subtype analysis showed that all sequences belong to line B.1.1.7.

At the histopathological examination and at SEM we did not identify pathological elements.

Given the time of 12 hours between the decease and the time of collection, at TEM almost all samples showed critical alteration of cell morphology, cell lysis and autophagic vacuoles. Under these conditions, we cannot confirm exactly the identification of the SARS-CoV-2 virus, but we show the presence of some structures suggestive for this virus. At the epithelium level we identified goblet cells and cells belonging to the immune system. In the subepithelial layer, we identified fibrocytes surrounded by collagen fibers. On the outer surface of the tympanic membrane we found bacteria, most likely commensal of the external auditory canal.

Conclusions. In COVID-19 patients, the SARS-CoV-2 virus may be present in the middle ear even when they do not develop acute otitis media, case in which the viral load is low and no histopathological changes occur in the mucosa.

Study 5 COVID-19 and *Pneumocystis jirovecii* pulmonary coinfection - the first case confirmed through autopsy.

Introduction and objectives. The SARS-CoV-2 virus causes immunosuppression, COVID-19-associated co-infections, which are frequently

suspected in severe forms of disease. The occurrence of COVID-19-*Pneumocystis* co-infection was previously reported based on laboratory diagnosis and seems to be underestimated in the clinical practice.

The diagnosis of COVID-19-*Pneumocystis* co-infection is challenging because of the common clinical and radiological characteristics of the two conditions and of the difficulties in making the laboratory diagnosis.

The aim of this study was to present a case of COVID-19-*Pneumocystis* co-infection confirmed after the autopsy.

Case presentation. Male patient, 52 years old, chronic smoker and alcoholic, welder (exposed to occupational respiratory toxins for about 20 years) comes to the Emergency Unit with dyspnea, cough and right posterior chest pain, chills and high fever (39°C). The patient has multiple comorbidities: hepatic steatosis, chronic ethanolic liver disease, hypertensive and ischemic heart disease, hypertension.

The objective examination shows: tachypneic patient, with congested face, right basal crepitant rales, with SaO₂ 92%, TA 200/160 mmHg, AV 106 bpm. The pulmonary radiography shows an area of pulmonary compression in the poster-inferior third of the right lung.

Laboratory tests reveal leukopenia with lymphopenia, thrombocytopenia, prolonged prothrombin time, INR 1.15, hepatocytolysis, cholestasis, low creatinine clearance, nitrogen retention, inflammatory syndrome, undetectable anti-HIV1-2 antibodies, undetectable anti-SARS COV-2 antibodies, negative SARS COV-2 RT-PCR test.

After the interpretation of the clinical and paraclinical investigations, is established the following diagnosis: right basal pneumonia, acute respiratory failure, acute liver failure on the background of chronic ethanolic liver disease and acute renal failure. The following treatment is established: anti-inflammatory steroid treatment, antibiotic, antihypertensive and oxygen therapy.

At autopsy is found: about 1700 ml of serous fluid in the right pleural cavity, with gray deposits found focally and on the surface of the right pleura. In the left pleural cavity - about 500 ml serous citrine. The right lung has a well defined red-gray area at the lower, medial lobe, with small purple areas of increased consistency, with a dry, granular section surface. The adrenal glands have a bilateral hemorrhagic medulla.

Given the persistence of suspected SARS-CoV-2 infection, lung fragments were collected from the red-gray area of the right lower lobe, the result of RT-PCR test being positive. RNA isolation was performed with RNA NucleoSpin for tissue samples (Macherey-Nagel, Dueren, Germany) according to the manufacturer's instructions, Ct RdRp 25.3.

For the histopathological examination we used an Olympus BX40 (Ja-pan) microscope with an Olympus Camedia 4040 camera, hematoxylin-eosin staining (Laboratorium staining kit, București, Romania), Giemsa staining (staining kit produced by Merck, Darmstadt, Germany), PAS staining (Merck, Darmstadt, Germany) and Grocott staining (staining kit produced in the laboratory of Serviciul de Anatomie Patologică al Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii Cluj-Napoca). For immunohistochemistry were used anti-CD3 (Dako, rabbit polyclonal antibody) and anti-CD45 (Dako, mouse monoclonal antibody, clone 2B11+PD7/26). The immunolabeling reaction was performed automatically (Leica Bond-Max, Melbourne, Victoria, Australia) using a Leica Biosystems detection system (Melbourne, Victoria, Australia), chromogen 3,3'-diaminobenzidine.

The histopathological examination revealed both pre-existing lesions, which can be attributed to comorbidities, and recent lesions occurred in the context of COVID-19 infection.

In the lung tissue we identified, on a fibrosis background, multiple thrombosis. Adherent endothelial lymphocytes were observed in the thrombosed veins, suggesting endotheliitis. In the dilated perivascular lymphatics is observed an exudate with cellularity similar to the one of the alveolar exudate.

The alveolar exudate is rich in foamy macrophages. The exudate immunolabelling is positive for CD45, but negative for CD3. The immunolabelling of the immunity system cells innate for iNOS is extremely weak. In the alveoli filled with macrophages, we have identified cystic forms with multinuclear content. These were positive in Giemsa staining, Grocott-Gomori staining and PAS staining.

The whitish-gray exudate macroscopic described on the surface of pleura is a mixture of fibrin and basophilic granular material, rich in round cells with vesicular nuclei. These cells are positive in Giemsa and Grocott staining, arguing the pneumocystosis diagnosis. From this aspect, very suggestive for *Pneumocystis*, it appears that the foamy alveolar material phagocytosed by activated macrophages is identical to this basophilic granular material and the cystic forms previously described are *Pneumocystis* cysts.

The myocardial muscle fibers are hypertrophied and fragmented and in the intramyocardial veins are found microthrombs. The liver has ethanol steatosis. The medium and large branches of the suprahepatic veins show inflammatory infiltrate. The kidney has diffuse tubular necrosis (shock kidney) and the adrenal glands – massive medullary hemorrhage.

Conclusions. COVID-19-*Pneumocystis* co-infection should be taken into consideration, systematically, in all severe COVID-19 cases, even when no known risk factors for pneumocystosis were identified.

GENERAL CONCLUSIONS

This thesis emphasizes that although the pathogenic mechanisms of chronic rhinosinusitis are different, they do not mutually exclude, but are highly intricate. Most likely, the reality behind the mechanisms we know as involved in initiating or maintaining chronic rhinosinusitis is much more complex. It is certain that the microbial factor – pathogenic or opportunistic – is one of the most important pathogenic links of chronic rhinosinusitis.

The MALDI-TOF MS technique offers the possibility to identify microbial species difficult to diagnose by classical methods. The bacterial morphology of the same species can be different in the sinus biofilm from the isolated form in culture. The fact that in most studied cases of chronic rhinosinusitis we identified opportunistic germs requires further research on the virulence factors by which these species trigger/maintain the disease.

Functional endoscopic sinus surgery disrupts the pathogenic chain of chronic rhinosinusitis, acting directly on etiological factors. The results of our study shows that after 6 months from surgery, most patients of the studied group reported the improvement of the olfactory function and the increase of quality of life, without major postoperative complications.

Chronic rhinosinusitis and COVID-19 infection may share common histopathological characteristics in the nasal mucosa, but the identified inflammatory pattern is different. Nasal dysbiosis seems a determining factor in CRSwNP and a secondary factor in COVID-19. The study of the initial host-virus interaction in the nasal microbiota may lead to an understanding of how the systemic inflammatory response occurs and modulates in COVID-19. Because the pulmonary viral insemination is secondary to the nasal one, further rhinological research in COVID-19 is necessary to study both local factors that may initiate systemic hyperinflammatory response, and the possibility of developing an intranasal vaccine.

The study of the interaction between the etiological factors of chronic inflammation in rhinosinusitis will place us closer to the optimal and individualized treatment of this condition, especially for refractory cases.

In patients with COVID-19, the SARS-CoV-2 virus may be present in the middle ear even when they do not develop acute otitis media. Further research is needed to clarify the interaction between SARS-CoV-2 and the local ontological defense mechanisms, on one hand, and between SARS-CoV-2 and local microbiota, on the other hand.

The otorhinolaryngologists are especially exposed to COVID-19 infection. The definite presence of SARS-CoV-2 in the middle ear has significant implications for otolaryngology procedures.

COVID-19-*Pneumocystis* co-infections should be taken into account especially in critically ill patients, even if they do not present the risk factors for pneumocystosis described in literature. COVID-19 infection is most likely an independent risk factor for pneumocystosis.

ORIGINALITY OF RESEARCH AND INNOVATIVE CONTRIBUTION

The thesis gathers, in an original approach, current topics in microbiology and otorhinolaryngology. Chronic rhinosinusitis has an intensely studied etiopathogenesis, but the current research techniques place the old discoveries in a new light. The newly emerging COVID-19 infection requires extensive research to discover the etiopathogenic points at which the therapy can work most effectively. Both conditions have an undeniable impact on the human society and on health-related finances.

The innovative contributions of the thesis are the following:

1. Identification of the *Corynebacterium aurimucosum* and *Eggerthia cateniformis* bacterial species as etiological agents of chronic rhinosinusitis.
2. Identification of opportunistic germs in most cases of chronic rhinosinusitis studied by us.
3. Identification of different pathogenic inflammatory patterns in the nasal mucosa of patients with chronic rhinosinusitis with polyps, respectively COVID-19 infection.
4. Identification of the cytopathic viral effect in the nasal mucosa of deceased patients with COVID-19.
5. Identification of morphological aspects of the nasal mucosa that suggests nasal dysbiosis as a determining factor in chronic rhinosinusitis with polyps, respectively as a secondary factor in COVID-19 infection. The research into the role of probiotics/intranasal vaccine in modulating the nasal microbiota will be the basis for future studies.

6. Identification of the SARS-CoV-2 virus in the middle ear of COVID-19 deceased patients.

7. Determination of the viral load of SARS-CoV-2 in the nasal mucosa versus the middle ear mucosa: the virus is a higher load in the nasal mucosa.

8. Identification of the COVID-19-*Pneumocystis jirovecii* co-infection in an autopsied patient (first case report).