



VNIVERSITAT E VALÈNCIA

Departamento de Microbiología y Ecología

Facultad de Medicina y Odontología

**Implicación y caracterización de *Staphylococcus aureus*
en las poliposis nasales.**

TESIS DOCTORAL

Presentada por: David Navalpotro Rodríguez

Dirigida por: Prof. Dra. Concepción Gimeno Cardona

Prof. Dr. Miguel Armengot Carceller

Valencia, 2015



VNIVERSITAT E VALÈNCIA

Departamento de Microbiología y Ecología

Facultad de Medicina y Odontología

**Implicación y caracterización de *Staphylococcus aureus*
en las poliposis nasales.**

TESIS DOCTORAL

Presentada por: David Navalpotro Rodríguez

Dirigida por: Prof. Dra. Concepción Gimeno Cardona

Prof. Dr. Miguel Armengot Carceller

Valencia, 2015

Departamento de Microbiología y Ecología

Facultad de Medicina y Odontología

Titulación: Microbiología y Ecología

Tesis doctoral: Implicación y caracterización de *Staphylococcus aureus* en las poliposis nasales.

Directores: Prof. Dra. Concepción Gimeno Cardona

Prof. Dr. Miguel Armengot Carceller

Autor: David Navalpotro Rodríguez

Valencia, 2015

La **Prof. Dra. Concepción Gimeno Cardona**, jefa del Servicio de Microbiología del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia y Profesora titular del Departamento de Microbiología y Ecología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia, y el **Prof. Dr. Miguel Armengot Carceller**, facultativo adjunto del Servicio de Otorrinolaringología, y Profesor titular del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral que presenta el Licenciado **David Navalpotro Rodríguez**, con el título “**IMPLICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EN LAS POLIPOSIS NASALES**” ha sido realizada bajo nuestra dirección, habiendo sido revisada y estando conformes con su presentación para obtener el grado de Doctor, siempre que así lo considere el tribunal designado por la Universidad de Valencia.

Valencia, octubre de 2015.

Fdo. Concepción Gimeno Cardona

Fdo. Miguel Armengot Carceller

AGRADECIMIENTOS

La finalización de esta tesis doctoral no habría sido posible sin las aportaciones directas o indirectas de un gran número de personas que me han acompañado a lo largo de esta investigación, y sin cuyo apoyo no habría podido terminarla. A todos ellos les quiero agradecer su inestimable colaboración, esperando no defraudarles con el resultado final al que he podido llegar. Además, esta tesis no habría sido posible si no hubiera disfrutado de una beca “Premios López-Trigo” de la Fundación Consorcio Hospital General Universitario de Valencia.

Por otra parte quiero mostrar mi agradecimiento de manera especial:

A la Prof. Dra. Concepción Gimeno Cardona y al Prof. Dr. Miguel Armengot Carceller por los consejos y oportunidades que tantas veces me han ofrecido desde que un buen día decidí introducirme en el mundo de la microbiología y de las poliposis nasales.

A Ainhoa García-Lliberós de Miguel, con la que he podido discutir y valorar numerosas cuestiones relacionadas con el tema principal de esta tesis. Su ayuda ha sido indispensable para poder organizar este trabajo.

A Xavier Milara y Alfonso Pastor, excelentes investigadores que siempre me han mostrado nuevos caminos de investigación con los que he podido enriquecer mi trabajo. A las personas de la Fundación, por haberme facilitado trabajar allí cuando lo he necesitado, y especialmente a Pilar Bañuls por su paciencia y su disposición.

A Eduardo Ledesma, porque siempre es interesante comentar con él aspectos relacionados con cualquier investigación microbiológica.

Al personal del laboratorio de microbiología del Hospital General Universitario de Valencia, y especialmente a Amparo Salvi por las charlas y reflexiones compartidas y también a Rosa Madolell por su colaboración en la parte de biología molecular.

A mis padres y a mi hermano.

A Amparo y a Empar.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	CONCEPTOS GENERALES	3
1.2	RINOSINUSITIS CRÓNICA. CARACTERÍSTICAS GENERALES.....	5
1.2.1	Aspectos epidemiológicos.....	5
1.2.2	Factores asociados a rinosinusitis crónica con poliposis nasal	7
1.2.2.1	Alergia	7
1.2.2.2	Asma	8
1.2.2.3	Intolerancia al ácido acetilsalicílico.....	8
1.2.2.4	Predisposición genética de la RSC con Poliposis Nasal.....	11
1.2.2.5	Estudio de polimorfismo.....	11
1.2.2.6	Factores ambientales.....	12
1.2.3	Histopatología de la RSC con PN.....	12
1.2.3.1	Eosinófilos	15
1.2.3.2	Linfocitos T	19
1.2.4	Mecanismos fisiopatológicos implicados en la RSC	21
1.2.4.1	Alteración en los mediadores inflamatorios.	22
1.2.4.2	Alteración en la producción de mucinas.....	25
1.2.4.3	Alteración de la integridad del epitelio nasal	26
1.2.4.4	Alteración en la inmunidad innata.....	28
1.2.4.5	Déficit en la remodelación tisular.....	34
1.2.4.6	Implicación de microorganismos.....	35
1.3	<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> . CARACTERÍSTICAS GENERALES	37
1.3.1	Historia de <i>Staphylococcus aureus</i>	37
1.3.2	Prevalencia como patógeno humano.....	38
1.3.3	Características microbiológicas de <i>Staphylococcus aureus</i>	40

1.3.4	Propiedades para la identificación en laboratorio.....	41
1.3.5	Determinantes de virulencia.....	43
1.3.5.1	Cápsula	43
1.3.5.2	Componentes de la pared.....	43
1.3.5.3	Proteínas de superficie.....	44
1.3.5.4	Toxinas	46
1.3.5.5	<i>Biofilms</i>	49
2.	HIPÓTESIS.....	55
3.	OBJETIVOS	59
4.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	63
4.1	CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO.....	65
4.1.1	Descripción.....	65
4.1.2	Ámbito	65
4.1.3	Duración.....	65
4.2	PACIENTES	66
4.2.1	Criterios de inclusión	66
4.2.2	Criterios de exclusión.....	67
4.3	DISEÑO	67
4.3.1	Protocolo de trabajo	67
4.3.2	VARIABLES ANALIZADAS.....	68
4.3.2.1	VARIABLES DEMOGRÁFICAS	68
4.3.2.2	Comorbilidad	68
4.3.2.3	Hábitos tóxicos	69
4.3.2.4	Manifestaciones clínicas.....	69
4.3.2.5	Tratamiento con fármacos previos.....	71
4.3.2.6	Cirugía endoscópica.....	71
4.4	MÉTODOS.....	72
4.4.1	Técnica de obtención de muestras	72

4.4.2	Estudio histológico con microscopio óptico	72
4.4.3	Estudio microbiológico	73
4.4.3.1	Detección <i>in vivo</i> de microorganismos productores de <i>biofilms</i>	73
4.4.3.2	Detección por PCR Real-Time de <i>S.aureus</i> y MRSA de biopsia.....	73
4.4.3.3	Estudio Microbiológico Convencional	76
4.4.3.4	Caracterización fenotípica de la producción de <i>slime</i>	78
4.4.3.5	Caracterización genotípica de genes involucrados en la producción de <i>biofilms</i>	80
4.4.3.6	Caracterización genotípica de genes involucrados en la adhesión bacteriana.....	81
4.4.3.7	Caracterización genotípica de endotoxinas estafilococicas	83
4.5	Aspectos éticos	84
4.6	Análisis estadístico.	84
5.	RESULTADOS.....	87
5.1	Análisis de la población.	89
5.1.1	Datos demográficos.....	89
5.1.2	Datos comorbilidad	90
5.1.3	Hábitos tóxicos.....	92
5.1.4	Manifestaciones clínicas	92
5.1.4.1	Grado de poliposis	92
5.1.5	Tratamientos previos con fármacos.	93
5.1.5.1	Tratamiento antibiótico.....	93
5.1.5.2	Tratamiento corticoideo.....	93
5.1.6	Cirugía endoscópica previa (CENS).....	94
5.2	Análisis experimental.	94
5.2.1	Grado de eosinofilia en tejido polipoide.....	94
5.2.2	Detección <i>in vivo</i> de microorganismos productores de <i>biofilms</i>	95
5.2.3	Cultivo bacteriológico.....	96
5.2.3.1	Resistencia antibiótica de <i>Staphylococcus aureus</i>	98
5.2.4	Detección por PCR Real-Time de <i>Staphylococcus aureus</i>	99

5.3	Estudio comparativo entre los grupo control y experimental y el método de detección de <i>S. aureus</i>	99
5.4	Estudio comparativo entre grupos clínicos	100
5.4.1	Variables demográficas.....	100
5.4.2	Variables analizadas.....	101
5.5	Estudio comparativo multivariante de la detección de <i>Staphylococcus aureus</i> con las variables estudiadas.....	106
5.6	Detección de producción de <i>biofilms</i> en los <i>Staphylococcus aureus</i> y estudio de los genes asociados a <i>biofilms</i>	107
5.7	Estudio genotípico de las proteínas involucradas en la adhesión bacteriana.	108
5.8	Estudio genotípico de enterotoxinas de <i>S.aureus</i>	111
5.9	Estudio comparativo de las adhesinas y enterotoxinas de <i>S.aureus</i> asociados a poliposis nasal y <i>S.aureus</i> asociados a colonización nasal.....	113
6.	DISCUSIÓN	117
6.1	Con respecto al diseño experimental.....	119
6.2	Con respecto a la detección de <i>Staphylococcus aureus</i> en las poliposis nasales.	120
6.3	Con respecto a la producción de <i>biofilms</i> y conjunto de adhesinas de los <i>Staphylococcus aureus</i>	129
6.4	Con respecto a las enterotoxinas producidas por <i>Staphylococcus aureus</i>	134
6.5	Con respecto a las características encontradas en los <i>Staphylococcus aureus</i> en las poliposis nasales.....	135
7.	CONCLUSIONES	1399
8.	BIBLIOGRAFÍA	1433
9.	ANEXO.....	1655

Índice de tablas

Tabla 1.1 Principales proteínas contenidas en los gránulos secundarios de los eosinófilos.	18
Tabla 1.2 Características de los diferentes tipos de linfocitos T <i>helper</i>	21
Tabla 1.3 Mecanismos fisiopatológicos implicados en RSCcPN	21
Tabla 1.4 Citocinas más importantes del sistema inmunitario.....	24
Tabla 1.5 Principales microorganismos aislados en los pólipos nasales	35
Tabla 1.6 Principales enfermedades asociadas a <i>Staphylococcus aureus</i>	39
Tabla 1.7 Principales proteínas de la superficie de <i>Staphylococcus aureus</i> que reconocen las moléculas de adhesión de la matriz extracelular MRSRAMM.....	45
Tabla 4.1 Clasificación de la poliposis nasal según endoscopia nasal (Escala de Lildholdt).....	70
Tabla 4.2 Evaluación de la poliposis nasal según Tomografía Computerizada (Escala Lund y Mackay)	70
Tabla 4.3. Componentes del medio Agar Rojo Congo Modificado.....	78
Tabla 4.4. Interpretación de absorbancia según escala de Marck y col.	80
Tabla 4.5 Secuencia de <i>primers</i> y tamaño del fragmento amplificado utilizados en el estudio.	80
Tabla 4.6 Parámetros de amplificación de la PCR.....	81
Tabla 4.7 Secuencia de <i>primers</i> y tamaño del fragmento amplificado de genes MSCRAMMs.	82
Tabla 4.8 Parámetros de amplificación de la PCR de genes MSCRAMMs.	82
Tabla 4.9 Secuencia de <i>primers</i> y tamaño del fragmento amplificado de genes de enterotoxinas de <i>Staphylococcus aureus</i>	83
Tabla 4.10 Parámetros de amplificación de la PCR de enterotoxinas.	83
Tabla 5.1 Factores de comorbilidad asociados a la RSCcPN.	90
Tabla 5.2 Distribución de grado de infiltración eosinofílica.....	95
Tabla 5.3 Aislamientos en los polipos nasales.....	96
Tabla 5.4 Perfil de sensibilidad antibiótica en los <i>Staphylococcus aureus</i> del grupo del grupo de estudio de poliposis nasal y del grupo control.	98
Tabla 5.5 Comparativa Sexo con Grupos clínicos.	101
Tabla 5.6 Tabla de resultado de regresión logística (modelo Logit).....	106

Tabla 5.7 Distribución de las proteínas de adhesión MRSRAMM entre los aislados de <i>S.aureus</i> de los pacientes con poliposis nasal.....	110
Tabla 5.8 Distribución de la detección de enterotoxinas en los <i>S.aureus</i> de pacientes con poliposis nasal.	112
Tabla 5.9 Comparación de la presencia de genes asociados a las proteínas de adhesión (MRSRAMM) en los diferentes aislados de <i>S.aureus</i> de los grupos de poliposis nasal y de colonización nasal.	115
Tabla 5.10 Comparación de la presencia de genes asociados a enterotoxinas en los diferentes aislados de <i>S.aureus</i> de los grupos de poliposis nasal y de colonización nasal.....	116
Tabla 6.1 Principales proteínas de adhesión de <i>S.aureus</i> y procesos infecciosos en el que están involucradas.	133

Índice de figuras

Figura 1.1 Vía de degradación de los fosfolípidos de membrana celular.....	10
Figura 1.3 Imagen de pólipo nasal tras extirpación quirúrgica mediante CENS.....	13
Figura 1.2 La Poliposis nasal es una forma clínica bilateral e idiopática subagrupada dentro RSC	13
Figura 1.4 Pólipo nasal eosinofílico de paciente con Asa triada.....	14
Figura 1.5 Pólipo nasal neutrofílico en paciente con discinesia ciliar primaria.....	14
Figura 1.6 Fotografía de microscopio óptico (x1000) tinción Giemsa de una extensión de sangre donde se visualizan linfocitos y eosinófilos.....	16
Figura 1.7 Epitelio nasal con estructura anómala en las uniones estrechas.....	27
Figura 1.8 Receptores tipo Toll de células inmunitarias y sus principales ligandos.....	32
Figura 1.9 Prevalencia de aislado MRSA ECDC 2013.....	40
Figura 1.10 Fotografía de microscopio óptico (X1000) donde se visualiza bacterias del género <i>Staphylococcus</i>	41
Figura 1.11 Fotografía de cultivo de una cepa de en medio de cultivo en placa Agar Sangre.....	41
Figura 1.12 Principales pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	42
Figura 1.13 Panel de identificación PC31 del analizador Microscan (Siemens®).....	42
Figura 1.14 Diferencias entre el reconocimiento por MHC de moléculas antigénicas y superantigénicas.....	47
Figura 1.15 Proceso de formación de los <i>biofilms</i> bacterianos.....	51
Figura 1.16 Organización de operón de la adhesina intercelular <i>icaABCDC</i>	51
Figura 4.1 Plataforma automatizada BDMAX™.....	73
Figura 4.2 Tira de reacción BD MAX™.....	74
Figura 4.3 BD MAX™ PCR Cartridge.....	75
Figura 4.4 Proceso de trabajo de la plataforma automatizada BDMAX™.....	75
Figura 4.5 MALDI-TOF (<i>matriz assisted laser desorption ionization time-of-flight</i>).....	77
Figura 4.6 Autoanalizador Microscan Walkaway.....	77
Figura 4.7 Agar Rojo Congo.....	79
Figura 5.1 Distribución de la frecuencia por edad del grupo de estudio.....	89

Figura 5.2 Clasificación de los pacientes según grupos clínicos.	91
Figura 5.3 Distribución por edades de los grupos clínicos.	92
Figura 5.4 Distribución en grados poliposis (Escala Lildholdt)	93
Figura 5.5 Frecuencia de N° de cirugías (CENS) previas a la inclusión en el estudio.	94
Figura 5.6 Fotografía de Microscopía confocal. A. Poliposis nasal. B. Mucosa nasal.....	95
Figura 5.7 Cultivo positivo en Agar Chocolate de una biopsia de pólipo nasal.	96
Figura 5.8 Distribución de los aislamientos bacterianos en el grupo estudio.....	97
Figura 5.9 Resultado de la PCR-Real Time por BDMAX™.....	99
Figura 5.10 Detección de <i>S.aureus</i> según método diagnóstico.	100
Figura 5.11 Gráfico comparativo entre el grado de infiltración eosinofílica y el grupo clínico....	102
Figura 5.12 Gráfico comparativo entre grupos clínicos y antecedentes de polipeptomías.....	103
Figura 5.13 Gráfico comparativo entre los años de evolución de la poliposis nasal y el grupo clínico.....	104
Figura 5.14 Gráfico comparativo de la detección de <i>S. aureus</i> según grupos clínicos.....	105
Figura 5.15 Gráfico comparativo entre el grado de infiltración eosinofílica y la detección de <i>S.aureus</i>	105
Figura 5.16 Cultivo Agar Rojo Congo. A. Colonia color negro intenso. B. Colonia negro suave. Gráfica de los valores del ensayo de adherencia en placa <i>microtiter</i>	107
Figura 5.17. Gel de agarosa donde se observa el producto amplificado de dos fragmentos correspondientes al gen <i>cna</i> (423pb) y el gen <i>eno</i> (302pb).	108
Figura 5.18. Gel de agarosa donde se observa la producto amplificado de dos fragmentos correspondientes al gen <i>bbp</i> (525pb) y el gen <i>fib</i> (405pb).....	109
Figura 5.19 Gel de agarosa donde se observa la producto amplificado de fragmentos correspondientes al gen <i>fnbB</i> (524pb).....	109
Figura 5.20 Gráfica de la distribución de proteínas de adhesión MRSRAMM entre los aislados de <i>S.aureus</i> de los pacientes con poliposis nasal.	111
Figura 5.21 Enterotoxinas detectadas en los <i>S.aureus</i> de pacientes con poliposis nasal.....	112
Figura 5.22 Comparación de la detección de la enterotoxinas <i>sem</i> (180pb) y <i>seo</i> (300pb).	113
Figura 5.23 Comparación de la detección de la enterotoxinas <i>sed</i> (319pb) y <i>sec</i> (271pb).....	114
Figura 6.1. Fotografía microscopía óptica (x1000). Tinción Giemsa de pólipos nasal.	130

Abreviaturas

A.S.S.: Acido acetilsalicilico.

AINES: antiinflamatorio no esteroideo

AP-1: factor de transcripción *activator protein-1*

APC: células presentadoras de antígeno

ASA triada: acetil salicilic acid triad

CENS: Cirugía endoscópica nasal

CLSI: *Clinical and Laboratory Standar Institute*

CMI: concentración minima inhibitoria

ECP: proteína catiónica del eosinófilo

EDN: neurotoxina derivada del eosinófilo

EGFR: *Epidermal growth factor Receptor*

EPO: peroxidasa del eosinófilo

EREA: enfermedad respiratoria exacerbada por la aspirina

GM-CSF: factor de crecimiento de colonias de granulocitos y macrófagos.

HLA: antígeno de histocompatibilidad leucocitario humano

ICAM-1: molécula 1 de adhesión intercelular

Ig: inmunoglobulina

IL: interleucina

INF- γ : interferon γ

LEKTI: *Lympho epitelial Kazal type related inhibitor*

LPS: lipopolisacarido

LTC₄: Leucotrieno C₄

LTD₄: Leucotrieno D₄

LTE₄: Leucotrieno E₄

MALDI-TOFF: *matriz assisted laser desorption ionization time-of-flight*

MBL: lectinasa unidas a manosa

MBP: proteína básica principal.

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad

MRSA: *Staphylococcus aureus* Resistentes a Meticilina

MRSRAMM: moléculas de adhesión de la matriz extracelular de los tejidos

PAF: factor activador de plaquetas

PAMPs: *Pathogen associate molecular patterns*

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PGE₂: Prostaglandinas E₂

PIA: antígeno polisacárido intracelular

PLUNC: *Palate Lung and Nasal epithelium Clone*

PN: poliposis nasal.

PNAG: poli-N- acetil-glucosamina

RANTES: regulated upon avtivation normal T-cell expressed and secreted

RSC: rinosinusitis crónica

RSCcPN: rinosinusitis crónica con poliposis nasal

RSCsPN: rinosinusitis crónica sin poliposis nasal

Sags: superantigenos

SASM: *Staphylococcus aureus* Sensibles a Meticilina

SPLINK 5: *Serine protease inhibitor Kazal type 5*

TCR: receptor de celulas T para antígenos.

TGF- α : Factor de Crecimiento Transformante

Th1: linfocito *helper* 1

Th17: linfocito *helper* 17

Th2: linfocito *helper* 2

TLR: receptor de linfocitos T

TNF- α : factor de necrosis tumoral α

TNF- β : factor de necrosis tumoral β

VCAM-1: molécula de adhesion celular vascular

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CONCEPTOS GENERALES

La rinosinusitis crónica (RSC) es una enfermedad inflamatoria, de más de 12 semanas de duración, que afecta a la mucosa de las fosas nasales y de los senos paranasales. Se caracteriza por presentar, obstrucción o congestión nasal, y/o rinorrea; y además poder presentar uno de estos dos síntomas, dolor o sensación de presión facial, y/o pérdida total o parcial del sentido del olfato (1). La RSC se divide en dos grupos RSC con ausencia o RSC con presencia de poliposis nasal (PN). Además clínicamente la rinosinusitis crónica con presencia de poliposis nasal (RSCcPN) pueden subclasificarse en (a) RSCcPN eosinofílica, que es bilateral e idiopática, pudiendo presentarse de forma aislada, asociada a asma o formado parte de la triada poliposis, asma e hipersensibilidad a los analgésicos-antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), conociéndose entonces como ASA triada. La asociación entre poliposis y asma es frecuente, dado que una vía aérea única desarrolla una patología común. Y (b) RSCcPN neutrofílica (p.e. rinosinusitis secundaria a Fibrosis Quística, a la Discinesia Ciliar Primaria o a otras infecciones crónicas). En este trabajo nos referiremos siempre a la poliposis nasosinusal idiopática, bilateral y eosinofílica (1-3).

Los *biofilms* bacterianos son comunidades de microorganismos sésiles embebidos en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que los propios microorganismos sintetizan, y que están adheridos de forma irreversible a un sustrato, ya sea inerte como los cuerpos extraños (prótesis,...) o tejido vivo como la mucosa sinusal. Esta estructura organizativa responde a condiciones ambientales adversas y proporciona nuevas características a las bacterias embebidas en ella como puede ser la modificación de su tasa de crecimiento, el aumento del intercambio genético de elementos móviles como plásmidos, el aumento de la resistencia a antibióticos y favorecer el escape de la respuesta inmune del hospedador (4).

Staphylococcus aureus es un microorganismo grampositivo en forma de coco que se agrupa en racimos, ubicuo, causante de numerosos procesos infecciosos como infecciones de abscesos, neumonía, infección heridas ... En los últimos años numerosos estudios han puesto de manifiesto que este microorganismo desempeña un rol muy relevante en algunas enfermedades infecciosas que se caracterizan por su morbilidad tórpida y de larga duración, como osteomielitis, periodontitis, endocarditis, rinosinusitis crónica. Debido a su capacidad de crecimiento embebida dentro de

biofilms, se produce una modalidad de relación diferente con respecto a una infección aguda entre esta comunidad de microorganismos y el sistema inmunitario del huésped.

1.2 RINOSINUSITIS CRÓNICA. CARACTERÍSTICAS GENERALES

1.2.1 Aspectos epidemiológicos

La heterogeneidad de la enfermedad hace que la Rinosinusitis crónica dificulte en gran medida la posibilidad de realizar estudios epidemiológicos precisos. Por ello, cuando se realiza una revisión en la literatura para conocer la prevalencia de dicha enfermedad se pueden encontrar porcentajes de prevalencia muy dispares. En los estudios realizados en Estados Unidos por Collins y Blackwell mediante encuestas telefónicas preguntados por la presencia de problemas sinusales con más de tres meses de duración (5, 6) obtenían una prevalencia del 16%, frente a otros estudios como el de Shashy y col, donde el diagnóstico de RSC se basaba únicamente en criterios diagnósticos médicos, como la endoscopia nasal o la exploración mediante Tomografía Computerizada, la prevalencia encontrada fue cercana al 2% (7).

En 2007 se consensuó en el documento EP³OS (1) que los criterios a utilizar para realizar estudios epidemiológicos deben basarse solamente en manifestaciones clínicas, mientras que el diagnóstico clínico de RSC debe estar basado en síntomas y criterios endoscópicos. De esta forma Hastan y col, realizaron un gran estudio epidemiológico europeo en 2011 en 19 centros de 12 países, que incluyó a 57.128 pacientes encuestados utilizando la definición de RSC basada en la sintomatología clínica y que concluyó que la prevalencia de RSC es del 10,9 % con un rango de 6,9-27,1% (8).

No obstante, recientemente Lange y col. han realizado un estudio para conocer la correlación entre los datos de prevalencia basados en encuestas epidemiológicas y los que están basados en criterios clínicos. Para ello, utilizaron 366 personas ya encuestadas en el trabajo de Hastan (8) que volvieron a ser entrevistadas por un otorrinolaringólogo especialista. Se detectó una menor sensibilidad en el diagnóstico de RSC cuando se utiliza únicamente un cuestionario. Lange concluyó que resulta imprescindible incorporar la historia clínica del paciente junto con las preguntas epidemiológicas utilizadas para correlacionar mejor los datos epidemiológicos mediante encuestas con los criterios clínicos de RSC, y de esta forma aumentar la sensibilidad y la especificidad de los estudios epidemiológicos de prevalencia de RSC (9). Recientemente Bohnhorst y col. combinaron los datos obtenidos de la historia clínica y los resultados clínicos obtenidos por

rinoscopia anterior/posterior para el diagnóstico de RSC y obtuvieron una prevalencia del 8,5% (10).

Estos estudios de prevalencia también ponen de manifiesto dos aspectos importantes: la tendencia al incremento de la prevalencia de RSC con la edad teniendo la mayor prevalencia en edades comprendidas entre 50 y 60 años, cercana al 6%, y una mayor frecuencia en mujeres que en hombres, con una relación de 3:2 (5, 11).

Al igual que ocurre con los estudios epidemiológicos de la RSC, los datos epidemiológicos de prevalencia de poliposis nasal también están basados en cuestionarios y/o endoscopias nasales. No obstante, el grupo de Johansson y col. demostraron la necesidad de realizar una endoscopia nasal para estimar la prevalencia de PN ya que en la mayoría de personas que afirmaron estar afectados por poliposis nasal no se consiguió visualizar dichos pólipos endoscópicamente. Este mismo grupo realizó un estudio de prevalencia de poliposis nasal a 1.387 voluntarios de una población sueca y obtuvo una prevalencia de 2,7% y fueron más frecuentes los varones (2,2 a 1) y en los ancianos con una prevalencia del 5% en las personas mayores de 60 años (12). Estos datos también coinciden con los obtenidos por Cerejeira y col. que realizó estudios necrópsicos basados en exploraciones mediante rinoscopia anterior a 200 cadáveres con edad media 77,2 años y la prevalencia de poliposis nasal fue del 5,5% (13).

Klossek y col. utilizando un cuestionario algoritmo diagnóstico específico de poliposis nasal con una sensibilidad y especificidad cercana al 90%, realizó un estudio que incluyó a 10.033 personas. Obtuvo una prevalencia de poliposis nasal del 2,1%, siendo un 45% varones y al igual que lo descrito en el estudio de Johansson se observó un incremento de la prevalencia de PN con la edad (14, 15).

La tasa de incidencia anual de poliposis nasal son de 0,86 casos/1000 hab. y 0,39 casos/1.000 hab., en hombres y mujeres respectivamente según el estudio realizado por Larsen y Tos (16), y aumenta con la edad alcanzando un incidencia en edades comprendidas entre 50 y 60 años de 1,68 y 0,82 casos/1.000 hab. para hombres y mujeres respectivamente. Otros estudios como los de Davidsson y col, obtienen una tasa de incidencia media de PN algo menores, 0,43/1.000 hab. (17).

1.2.2 Factores asociados a rinosinusitis crónica con poliposis nasal

1.2.2.1 Alergia

La rinitis alérgica es una enfermedad muy común con una prevalencia del 10-25% (18). Se pueden distinguir dos tipos de rinitis alérgica, la rinitis alérgica estacional causada principalmente por el polen y la rinitis alérgica perenne cuyos principales alérgenos desencadenantes son el pelo de animales y los ácaros.

Los estudios epidemiológicos ponen de manifiesto una prevalencia mayor de rinitis alérgica en pacientes con RSC. Aunque todavía no está claro cuál es el rol que desempeña la alergia en la RSC, parece indicar que la tumefacción de la mucosa nasal interfiere en la ventilación e incluso puede provocar obstrucciones en los orificios de drenaje de los senos causando retenciones de moco y una predisposición a desarrollar infecciones.

En cambio, cuando se intenta asociar la rinitis alérgica y la poliposis nasal, los resultados obtenidos son muy similares a población sin poliposis nasal, que oscilan entre 0,5%- 4,5%. De esta forma la relación entre la rinitis y la RSC es clara y compleja mientras que la relación entre rinitis alérgica y PN es controvertida y dudosa (19).

Por otra parte, al estudiar la presencia de alguna clínica o afectación alérgica (conjuntivitis, eczema, urticaria o alergia alimentaria) con la RSC se encuentran resultados muy dispares desde el 10% hasta el 64% como se observa en el trabajo de Wilson KF. que realizó una amplia revisión al respecto en las que se analizaron 24 artículos y concluyó que el rol de la alergia en la RSC es muy controvertido (20). Mientras que la relación entre RSCcPN y sintomatología alérgica parece más clara con una mayor prevalencia que en la población general, no lo es tanto la asociación entre RSCsPN y los procesos alérgicos (21). Al analizar pacientes con PN y presencia de algún antecedente de sintomatología alérgica existe una asociación estadísticamente significativa entre ambos factores. Klossek en un estudio de casos control de pacientes con PN y antecedentes alérgicos obtiene porcentajes de prevalencia cercanos al 50% comparada con el 6,5% del grupo control, siendo la conjuntivitis junto con la urticaria o eczema las manifestaciones alérgicas más frecuentes (15). Otros autores como Rugina revelan una mayor incidencia (31%) de alergias alimentarias en pacientes con poliposis nasal (22), aunque estos datos todavía no están confirmados.

1.2.2.2 Asma

El asma es una enfermedad crónica pulmonar caracterizada por la inflamación e hiperactividad bronquial, y es uno de los principales factores asociados a las personas con PN.

En el anteriormente mencionado estudio de Klossek se observó un 26% de personas asmáticas con PN mientras que en la población control de personas sin PN solo el 6% eran asmáticas. Muñoz del Castillo F. y col. también encontraron datos similares con una mayor prevalencia de pacientes asmáticos entre los pacientes con PN que en la población general, 48,9% y 2,6% respectivamente (23).

Se puede observar como en la mayoría de los casos (69%) el asma se manifiesta en primer lugar y posteriormente aparece la RSCcPN, aproximadamente tardan entre nueve y trece años en formarse, y únicamente en el 21% de los casos aparece primero la PN y entre dos y doce años más tarde el asma (24).

A pesar, de que como se ha visto anteriormente la PN es más frecuente en varones, cuando se asocia el factor asma a la presencia de PN se observa un cambio en la distribución por género donde las mujeres en este caso, duplican la frecuencia a los varones (25).

Esta elevada asociación justifica la existencia de una búsqueda sistemática, estudiada por un neumólogo, de un cuadro de asma o de hiperreactividad bronquial inespecífica en todos los pacientes que presentan poliposis nasal.

1.2.2.3 Intolerancia al ácido acetilsalicílico

Otro de los factores más estudiados y que se asocian con la RSCcPN es la intolerancia a los analgésicos-antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) que inhiben la vía de la ciclooxigenasa del metabolismo del ácido araquidónico, tales como la aspirina, ibuprofeno, naproxeno,... . En la literatura se pueden encontrar numerosos artículos que demuestran esta asociación, y donde se puede observar entre los pacientes con intolerancia a ácido acetilsalicílico una prevalencia de RSCcPN que oscila entre un 36% y un 96%. Cuando se estudia la prevalencia de intolerancia a los AINES en pacientes con PN los datos se encuentran cercanos al 11% (26-28). Se conoce entonces

como Síndrome de Widal o de Sampter, también conocido como ASA triada (Acetil Salicilic Acid Triad) o EREA (Enfermedad Respiratoria Exacerbada por la Aspirina) es la forma más severa y grave de la PN. El diagnóstico de este síndrome viene dado cuando aparecen conjuntamente estos tres componentes: la intolerancia al ácido acetilsalicílico (A.A.S. y AINESs), el asma bronquial y la Poliposis Nasal.

El Síndrome de Fernand Widal o ASA triada fue descrito en 1922 y retomado en el año 1968 por Sampter. Las manifestaciones clínicas de la enfermedad se inician, por lo general, con la aparición de rinitis intrínseca (flushing en cabeza y cuello, obstrucción nasal e inyección conjuntival) en pacientes entre 30-50 años, con presencia de poliposis nasal y/o rinosinusitis hipertrófica estableciéndose como principal síntoma la obstrucción nasal junto con anosmia o pérdida de olfato. La aparición del asma es más tardía, desencadenada por la ingestión de aspirina (AAS.) y/o antiinflamatorios no esteroideos (A.I.N.E.) y en muchas ocasiones se manifiesta con ataques asmáticos agudos (disnea, sibilancias, opresión torácica, tos), que se inician, al cabo de minutos a tres horas después de la ingestión de una dosis normal de aspirina u otro fármaco similar, con un periodo de duración de varias horas, y con intensidad marcada y deficiente respuesta a los broncodilatadores. Existe cierta variabilidad en las reacciones provocadas por la intolerancia de los AINES en diferentes episodios dentro de un mismo individuo, desde la inexistencia de síntomas a respuestas naso-oculares o ataques asmáticos severos.

Mediante estudios de tomografía computerizada se observa generalmente en estos pacientes una afectación de todos los senos y conductos nasales (29).

Estas reacciones de hipersensibilidad no están mediadas por inmunoglobulinas ni existen reacciones antígeno-anticuerpo. Una estimulación nociva (mecánica, química, procesos inflamatorios...) sobre las células puede provocar daños en la membrana celular, lo que origina la liberación de fosfolípidos cuya degradación por la acción de fosfolipasas forma Ac. araquidónico. La principal explicación para el ASA triada radica en un desequilibrio de la producción de prostaglandinas originado por la acción de los AINES. Los AINES provocarían un aumento de derivados de eicosanoides, concretamente leucotrienos, al bloquear la enzima ciclooxigenasa que degrada el ácido araquidónico y cuyo producto final de su acción son las prostaglandinas (Figura 1.1). Los leucotrienos a diferencia de la acción broncodilatadora de las prostaglandinas, tienen una acción broncoconstrictora y proinflamatoria.

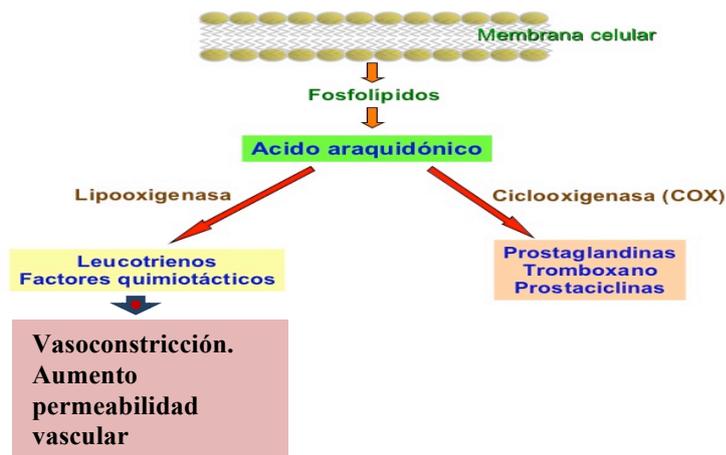


Figura 1.1 Vía de degradación de los fosfolípidos de membrana celular.

Los pacientes que presentan ASA triada difieren significativamente del resto de pacientes asmáticos o de la población en general porque presentan un aumento basal de la actividad de la enzima LTC sintetasa (lipooxigenasa) y de la síntesis de leucotrienos, especialmente, cistein-leucotrienos (LTC₄, LTD₄ y LTE₄), que se muestra exacerbada tras la administración de AAS. y/o A.I.N.E. Se interrumpiría así el efecto antiinflamatorio de la prostaglandinas que actúan como un freno de la actividad de la enzima (30).

Además del aumento de la concentración de cistein-leucotrienes encontrados en las secreciones nasales de los pacientes con ASA triada tras exposición a AAS, se puede detectar un aumento en otros mediadores específicos procedentes de mastocitos (histamina, tripticasa) y además se observa una entrada leucocitaria con un alto contenido en eosinófilos (31).

La poliposis nasosinusal idiopática, bilateral, etmoidal y eosinofílica se engloba dentro del concepto amplio de enfermedad de la vía respiratoria. Existen algunas enfermedades sistémicas como la mucoviscidosis, la discinesia ciliar y las inmunodeficiencias, donde también se producen rinosinusitis crónicas polipoideas bilaterales, pero éstos son pólipos secundarios a la infección, con infiltrado predominante de neutrófilos, por lo que no forman parte de la poliposis nasosinusal idiopática y eosinofílica.

1.2.2.4 Predisposición genética de la RSC con Poliposis Nasal

A pesar de que todavía quedan muchos aspectos de la patogenia de la RSCcPN por aclarar, muchos artículos que analizan datos clínicos y estudios genéticos parecen indicar la existencia de alguna predisposición genética subyacente sobre algún factor patogénico de las PNs.

Rugina y Serrano detectaron en sus estudios que más de la mitad de los pacientes encuestados (52%) con PN presentaron algún antecedente familiar de PN. Greisner y col. no detectó porcentajes tan elevados en los 50 pacientes con PN estudiados, únicamente 7 pacientes (14%) presentaron algún familiar con PN mientras que ninguna de las 30 personas del grupo control tuvieron algún familiar con PN (22, 32). Además, Cohen en su estudio sobre 174 pacientes RSC con PN, donde 57 (34%) tenían algún miembro de primer grado familiar con PN, concluyó que el hecho de que se acumulen casos de RSCcPN en una misma familia se relaciona con un proceso de la enfermedad más grave (33).

Estos estudios parecen indicar claramente la existencia de un factor genético significativo en la formación de PN. No obstante, no se ha podido demostrar unos patrones hereditarios claros, por lo que se está estudiando una posible interacción entre genes y factores ambientales, como el tabaquismo, para explicar esta relación (25, 34).

1.2.2.5 Estudio de polimorfismo

Estudios sobre polimorfismos genéticos parecen indicar que la poliposis nasal se asocia con polimorfismos específicos solamente cuando se presenta con fenotipos asociados, lo que sugiere que este aspecto genético puede desempeñar un papel más relevante en el desarrollo de las características clínicas asociadas a la poliposis nasal que con la poliposis nasal propiamente dicha (35).

1.2.2.6 Factores ambientales

El papel que desempeñan los factores ambientales en las RSCcPN no está claro. En diversos estudios se ha intentado asociar la RSCcPN y el tabaquismo pero los resultados lejos de ser concluyentes, han generado bastante controversia (34).

Kim y col. analizaron 55 pacientes con PN que estuvieron expuestos a diversos factores ambientales como exposición cerrada a tabaco, posesión de mascotas, exposición ocupacional a compuestos aéreos nocivos o exposición a estufas de leña. Y concluyeron que existía una asociación muy fuerte entre el uso de estufas de leña y el desarrollo de PN, también existía una importante asociación con la exposición en el ámbito laboral a compuestos aéreos nocivos (36). Sin embargo, el significado de estos estudios es extremadamente débil.

1.2.3 Histopatología de la RSC con PN.

La rinosinusitis crónica es una enfermedad inflamatoria que afecta a la mucosa de las fosas nasales y senos paranasales. La causa de la inflamación crónica es desconocida y actualmente las hipótesis están encaminadas a la existencia de una etiología multifactorial (15).

Actualmente se considera a la RSCcPN como una entidad patológica subagrupada dentro de las rinosinusitis crónicas (figura 1.2), ya que parece imposible diferenciar claramente ambas sintomatologías. Se presenta con una afectación bilateral difusa e idiopática, es decir de etiología desconocida, que se caracteriza por la aparición de pólipos en las cavidades nasosinusales, fundamentalmente desde los senos etmoides y que se pueden extender al resto de fosas y senos paranasales.

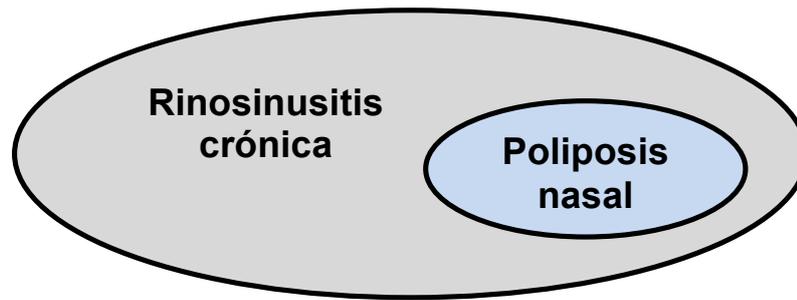


Figura 1.2 La Poliposis nasal es una forma clínica bilateral e idiopática subagrupada dentro RSC.

Los pólipos nasales asociados a la rinosinusitis crónica, macroscópicamente son estructuras mucosas edematosas de aspecto blanco y de coloración translúcida o blanquecina (figura 1.3).



Figura 1.3 Imagen de pólipo nasal tras extirpación quirúrgica mediante CENS.

Microscópicamente los pólipos nasales son estructuras formadas por tejido conectivo laxo, recubierto por un epitelio respiratorio generalmente pseudoestratificado donde se pueden encontrar células ciliadas y caliciformes. El estroma es de naturaleza edematosa y está compuesto principalmente por fibroblastos con función de sostén y por células inflamatorias que rodean a unas formas pseudoquísticas con alto contenido en albúmina y otras proteínas plasmáticas. El contenido glandular y capilar en el estroma laxo es escaso siendo ausente la presencia de tejido nervioso.

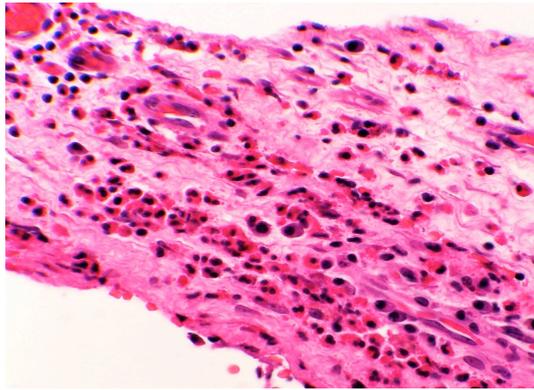


Figura 1.4. Pólipo nasal eosinofílico de paciente con ASA triada.

Es característica la presencia de un gran contenido de infiltrado de células inflamatorias mostrando un alto grado de eosinófilos activados y linfocitos T con una demostrada inclinación hacia la expresión de citocinas de linfocitos T *helper* 2 (*Th2*)(37).

En cambio la RSCsPN presenta un grado menor de infiltración eosinofílica y presencia de linfocitos T *helper* 1 (*Th1*).

Este hecho parece indicar que la deposición de proteínas plasmáticas está regulada por un proceso inflamatorio subepitelial, con especial protagonismo de eosinófilos, y que actúa como factor fisiopatogénico en la formación y desarrollo del pólipo nasal.

Las poliposis nasales secundarias a otras patologías se caracterizan por un contenido inflamatorio compuesto por otros tipos celulares, tal es el caso de las poliposis nasales asociadas a fibrosis quística cuyo contenido mayoritario son neutrófilos (38).

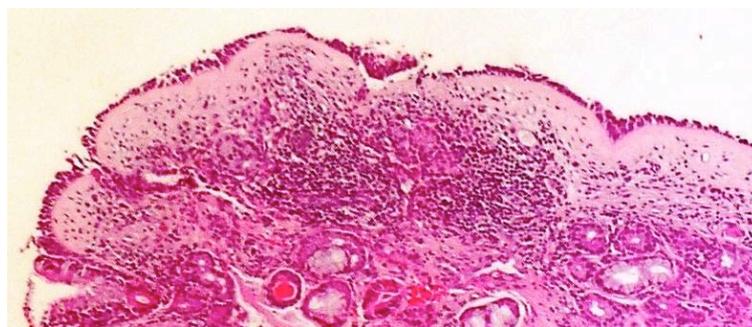


Figura 1.5 Pólipo nasal neutrofilico en paciente con discinesia ciliar primaria.

1.2.3.1 Eosinófilos

Los eosinófilos, leucocitos polimorfonucleares, son células del sistema inmunitario, formadas a partir de células precursoras de la médula ósea o hematopoyéticas. Fueron descritos por primera vez en 1879, por Paul Ehrlich, bacteriólogo alemán y Premio Nobel de Medicina en 1908, que desarrolló nuevas técnicas de tinción tisular, utilizando diferentes colorantes (azul de metileno, anilina,...). Gracias a estas nuevas técnicas clasificó a los leucocitos según su afinidad a los colorantes en acidófilos, neutrófilos y basófilos. Posteriormente, el término acidófilo fue sustituido por eosinófilo al observar su gran afinidad por el colorante eosina (39).

Los eosinófilos se localizan en la dermis y en la mucosa del aparato respiratorio y digestivo. Se diferencian de las células hematopoyéticas (CD34+) por la acción principalmente de tres citocinas la Interleucina-3 (IL-3), el factor de crecimiento de colonias Granulocítico-Monocíticas (GM-CSF) y la Interleucina-5 (IL-5), siendo esta última el promotor más importante.

Los eosinófilos circulantes en sangre se separan en dos poblaciones, eosinófilos normodensos mayoritarios en personas sanas y los eosinófilos hipodensos que son células activadas presentes en personas con eosinofilia.

En la migración tisular se producen varios procesos, primero un proceso de adhesión al endotelio y posterior migración transendotelial dependiente de la expresión de moléculas y receptores de adhesión. En un segundo lugar, la migración a través de la matriz extracelular hacia el lugar de la inflamación dependiente de estímulos quimiotácticos. En este aspecto, las quimiocinas o citocinas quimiotácticas, como IL-5, eotaxinas o RANTES juega un papel central en el proceso de reclutamiento eosinofílico.

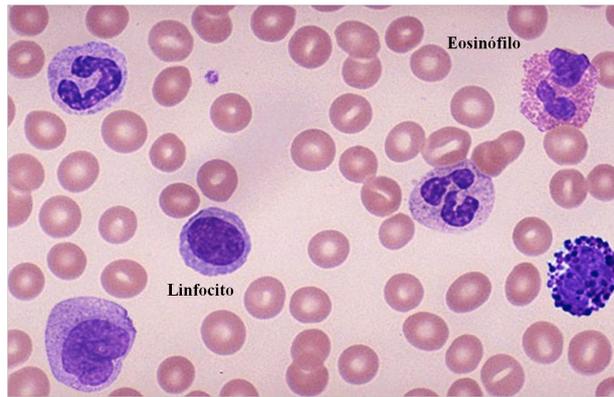


Figura 1.6 Fotografía de microscopio óptico (x1000) tinción Giemsa de una extensión de sangre donde se visualizan linfocitos y eosinófilos.

a) Componentes

- **Receptores de membrana**

Se han identificado un elevado número de receptores en la membrana plasmática de los eosinófilos. En función de su ligando o sitios de unión se pueden dividir en:

- Receptores de inmunoglobulinas, para las IgG, IgA e IgE de especial relevancia. Cabe destacar la ausencia de receptores para IgM.
- Receptores de mediadores lipídicos como prostaglandinas, leucotrienos o factor activador de plaquetas (PAF).
- Receptores de proteínas del complemento, factor C3 y factor C5.
- Receptores de citoquinas, como CCL-5 o RANTES.
- Receptores de moléculas de adhesión, especialmente son receptores de la familia de las integrinas ($\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 6\beta 1$, VLA-4), selectinas (E-selectina, L-selectina, P-selectina). Se unen a moléculas de adhesión vascular endoteliales como VCAM-1, permitiendo la migración del torrente sanguíneo hacia los tejidos.

- **Gránulos pequeños**

Constituyen el 5% de los gránulos. En ellos, se localizan las fosfolipasas, la fosfatasa ácida y las proteínas de los cristales de Charcot-Leyden.

- **Gránulos secundarios**

Los gránulos secundarios de los eosinófilos, constituyen más del 95% de los gránulos citoplasmáticos. Contienen las proteínas responsables de su acción citotóxica. Principalmente contienen cuatro proteínas (tabla 1.1):

- Proteína Básica Principal (MBP), es el mayor componente proteico granular (55%), y forma el *core* o envuelta cristalóide del gránulo. Es un polipéptido de 13.8 kDa con elevada cantidad de residuos de arginina (16%) y estructuralmente similar a las lectinas. Su principal acción citotóxica es frente a parásitos del grupo de los helmintos aunque también se ha descrito toxicidad frente a bacterias como *E.coli* o *Staphylococcus aureus*, desestabilizando la bicapa lipídica debido a su carga catiónica (40).

La MBP tiene otras funciones reguladoras, como la estimulación y activación de mastocitos y basófilos liberando de esta forma histamina, principal factor responsable de las reacciones de hipersensibilidad tipo I y muy estudiado en la hiperreactividad bronquial del asma (41).

- Proteína catiónica del eosinófilo (ECP), también llamada RNAsa 3, miembro de la familia proteica de las ribonucleasas. Se encuentra en la matriz granular y constituye en 30% del contenido proteico granular. Tiene actividad bactericida, formando canales transmembrana, actividad helmintotóxica 10 veces mayor que la MBP, y actividad neurotóxica. Se ha demostrado su capacidad de dañar el epitelio bronquial, especialmente en asmáticos. Posee otras propiedades no citotóxicas como la actividad estimuladora de secreción de moco o inmunomoduladora, al inhibir la proliferación de linfocitos T. También puede favorecer la liberación de histamina por mastocitos, interferir en la síntesis de inmunoglobulinas en linfocito B o incrementar la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1 en las células epiteliales.

- Peroxidasa del eosinófilo (EPO), cadena polipeptídica de 66kDa. También es tóxica para helmintos, bacterias, protozoos, células tumorales y células del huésped como el epitelio respiratorio. Aumenta su potencia en presencia de peróxido de oxígeno.
- Neurotoxina derivada del eosinófilo (EDN), péptido catiónico de 19kDa, presenta una homología del 67% con ECP. A parte de su demostrada actividad neurotóxica sobre neuronas mielinizadas, tiene función antiviral endógena.

Proteína	Localización	Función
Proteína Básica Principal (MBP)	Envuelta	Antihelmíntica, bactericida, antiprotozoaria. Citotóxica cél. huésped (epitelio bronquial, cél. tumorales). Liberación histamina por mastocitos.
Proteína catiónica del eosinófilo (ECP)	Matriz	Antihelmíntica, bactericida. Citotóxica cél. huésped (epitelio bronquial). Liberación histamina por mastocitos. Secreción de moco. Aumento ICAM-1 en cél. epiteliales.
Peroxidasa del eosinófilo (EPO)	Matriz	Antihelmíntica, bacteriostática, antiprotozoaria.
Neurotoxina derivada del eosinófilo (EDN)	Matriz	Antiviral. Citotóxica neuronas mielinizadas.

Tabla 1.1. Principales proteínas contenidas en los gránulos secundarios de los eosinófilos.

b) Activación.

Los eosinófilos activados expresan un mayor número de receptores de membrana y un mayor nivel de metabolismo oxidativo en reposo. La activación eosinófila va acompañada de la degranulación, causante de sus efectos. Son múltiples las moléculas con capacidad de activación siendo la principal el factor de activación plaquetario.

c) Funciones Biológicas

Cada vez se conoce más el papel del eosinófilo en la defensa del huésped:

- Función fagocitaria de microorganismos, poco frecuente.
- Función inmunorreguladora. Capaz de sintetizar y secretar nuevas moléculas como mediadores lipídicos (tromboxano 2, leucotrieno 4, factor activador de plaquetas), radicales libres (óxido nítrico), quimiocitoquinas (TGF, IL-1, IL-6, eotaxina). Esto les permite actuar sobre otras células e incluso sobre los propios eosinófilos, induciendo diferenciación y activación (GM-CSF, IL-3), y regulando de esta forma la respuesta inflamatoria local.

La actividad de la arilsulfatas y fosfolipasas induce la inactivación de los mediadores de las reacciones de hipersensibilidad tipo 1.

- Función citotóxica por degranulación o liberación de las proteínas granulares citoplasmáticas. Es la función mejor conocida, especialmente su actividad helmintotóxica. Tras previa opsonización de la membrana parasitaria por anticuerpos IgE, el eosinófilo se une de forma específica al parásito recubierto mediante sus receptores de IgE y también del factor C3b del sistema del complemento. Necesita un contacto directo con la membrana parasitaria y esta unión específica provoca la exocitosis de los gránulos y la liberación de las proteínas catiónicas en la superficie del parásito. La ECP tiene una actividad mayor antihelmíntica que MBP, pero el hecho de que la MBP se encuentre en mayor cantidad hace que sea mayor su contribución.

1.2.3.2 Linfocitos T

Los linfocitos son células con un gran núcleo en forma ovoide y escaso espacio citoplasmático, que al igual que los eosinófilos pertenecen al grupo de los leucocitos del sistema inmunitario. Morfológicamente, los linfocitos T son indistinguibles de otras células como los linfocitos B o células NK. El receptor específico de membrana- *Toll cell receptor*- (TLR) es el responsable de su diferenciación.

Su principal función es ser responsables de la respuesta inmunitaria celular mediante:

- Función citotóxica: al reconocer las células infectadas, segregan una serie de citocinas que activan la apoptosis celular, destruyendo la célula afectada.

- Acción reguladora o cooperativa: intervienen y modulan otras respuestas inmunitarias como la producción de anticuerpos, o activación de otras células inmunitarias como macrófagos, eosinófilos,...

La actividad de los linfocitos T está estrechamente ligada a las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad- *Major Histocompatibility Complex*- (MHC), situadas en la membrana de las células presentadoras de antígenos (macrófagos, células endoteliales, linfocitos B, ...). Estas proteínas están codificadas por un conjunto de genes situados en el brazo corto del cromosoma 6 llamados HLA y son los encargados de diferenciar los productos intracelulares propios, de los extraños y presentárselos a los receptores específicos linfocitarios (TCR), por lo tanto son los responsables del reconocimiento de los antígenos por parte de los linfocitos T.

Según el receptor de membrana TCR, los linfocitos T se pueden agrupar en dos grupos:

- TCR1 (γ,δ): suponen algo más del 10% del total de los linfocitos T y se encuentran recluidos en ciertos tejidos, como el epitelio intestinal. Su función no está bien conocida, se cree que tienen actividad citolítica constitutiva y que eliminan a células epiteliales infectadas debido a su expresión proteica aberrante.
- TCR2 (α,β): El 85% de la población linfocítica T y a su vez se dividen en dos subpoblaciones:
 - los linfocitos T con receptor CD8+ o citolíticos; se unen a los antígenos en asociación con el receptor MHC clase I de las células diana infectadas, provocando la activación del linfocito. Esto desencadena una exocitosis granular que libera perforina y granzima y una liberación de mediadores moleculares que inducen la apoptosis o muerte celular de la célula diana.
 - Los linfocitos T con receptores CD4+ o cooperadores (*helper*)-*Th*; se unen a los antígenos en asociación con el receptor MHC clase II de macrófagos, linfocitos B o células dendríticas. Su activación genera su proliferación celular y la liberación de citocinas esenciales para la activación de otras células inmunitarias. Existen tres poblaciones de linfocito: *Th1*, *Th2*, *Th17*.

	T helper 1	T helper 2 o colaboradoras	T helper 17 o proinflamatorios
Diferenciación de LT (citocinas)	IL-12	IL-4	IL-6, TNF- β
Función	Activar Macrófagos y Linfocitos T citolíticos.	Activar y proliferar Linfocitos B y eosinófilos	Activar células mieloides, expansión de los neutrófilos (a través del GM-CSF) y quimiotaxis (quimiocinas CXC)
Secreción citocinas	IL-2, INF- γ , TNF- β	IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, IL-10	IL-17, IL-22
Sistema respuesta	Respuesta celular e inflamatoria. Acción fagocítica o citolítica sobre la células diana.	Respuesta humoral. Síntesis de anticuerpos	Respuesta inmunidad innata y control de la autoinmunidad
Efectivos	Infecciones virales y de bact. intracelulares	Infecciones parasitarias y bact.extracelulares	Proinflamatorios infecciones bact. extracelulares y hongos

Tabla 1.2 Características de los diferentes tipos de linfocitos T *helper*

1.2.4 Mecanismos fisiopatológicos implicados en la RSC

En los últimos años, existen numerosos trabajos que abordan el estudio de los posibles mecanismos fisiopatológicos que podrían estar implicados en la formación, crecimiento y persistencia del tejido polipoide en la mucosa nasosinusal dentro de las rinosinusitis crónica, y se resumen en la siguiente tabla:

Alteración en los mediadores inflamatorios
Alteración de la producción de mucinas
Alteración en la integridad del epitelio nasal
Alteración en la inmunidad innata
Déficit en la remodelación tisular
Implicación de microorganismos (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Aspergillus</i>)

Tabla 1.3 Mecanismos fisiopatológicos implicados en RSCcPN

1.2.4.1 Alteración en los mediadores inflamatorios.

Los principales mediadores inflamatorios son las citocinas, grupo de glicoproteínas que actúan como reguladores de la respuesta inmunitaria e inflamatoria. Las quimiocinas son un subgrupo, formado por cuatro familias de citocinas, CXCL, CCL, CL y CX₃CL, especializadas en los fenómenos de quimiotaxis (movilidad celular inducida por la concentración de determinadas moléculas externas y que está mediada por un sistema de receptores).

La síntesis de citocinas está regulada por factores de transcripción como el factor de transcripción nuclear-NFκβ o proteína activadora Ap-1. Estos factores de transcripción se activan por cascada bioquímica tras estimulación celular mediante unión ligando-receptores de membranas:

- Receptores tipo TCR: exclusivamente en los linfocitos T.
- Receptores tipo TLR: que reconocen diferentes patrones asociados a patógenos (PAMPs). Estos receptores se encuentran en las células de diversos epitelios y mucosas, mastocitos y células presentadoras de antígeno.
- Receptores a TNF: principal vía de activación en procesos inflamatorios. Ocurre en diversos tipos celulares, especialmente en los macrófagos.

La liberación de citocinas específicas modula la actividad de muchos tipos celulares e incluso la de la propia célula. De esta forma, las citocinas son las responsables del tipo de respuesta a los estímulos extracelulares al ser capaces de modelar la diferenciación celular, el funcionamiento celular y la proliferación o apoptosis.

El principal factor responsable de la formación del pólipo es la respuesta inflamatoria eosinofílica persistente de la mucosa nasal. En los últimos años muchos estudios sobre la fisiopatología de las RSCcPN intentan aclarar la hipótesis de que una desregulación al alza del proceso inflamatorio subepitelial, por parte de los mediadores inflamatorios puede ser un factor patogénico en la formación y crecimiento de PN (42).

Un aspecto cada vez más importante es la implicación de las células epiteliales de la mucosa sinusal en el proceso inflamatorio. En este sentido, las células epiteliales pueden actuar como células presentadoras de antígeno (APC) activando linfocitos T y/o linfocitos B (43) y también

actuar como moduladores de la respuesta, cuando son estimuladas por algunos mediadores de origen microbiano. En este caso, las células epiteliales liberan quimiocinas como eotaxina, RANTES e IL-8 cuya acción estimula a los eosinófilos, y además pueden producir citocinas como IL-1, IL-6, TGF- β , GM-CSF que activan y aumentan la supervivencia de los eosinófilos (44, 45).

También hay que destacar el papel de las células endoteliales locales, que al ser estimuladas por citocinas proinflamatorias como IL-4, IL-13 o TNF- α , son capaces de sintetizar una serie de receptores, como las selectinas o las integrinas. Estos, son reconocidos por las células inflamatorias y desencadenan el proceso primordial de migración y extravasación de dichas células al lugar de la inflamación (46).

Son numerosos los mediadores moleculares estudiados que han podido ser relacionados con la fisiopatología de la RSCcPN al demostrarse alterada su concentración en pacientes con PN con respecto a pacientes sanos.

La IL-5, con un rol autocrino de activación de eosinófilos, se encuentra significativamente aumentada en los RSCcPN con respecto a las RSCsPN, en especial en los pacientes con asma no alérgico o intolerancia a AAS. Este hecho indica que IL-5 probablemente influye en la predominancia y activación de los eosinófilos en el tejido polipoide (47). Además, la detección de una mayor concentración de ECP, como consecuencia de la exocitosis granular eosinofílica tras su activación en la RSCcPN, confirma la importancia del efecto de la IL-5.

Otros estudios han analizado otras moléculas como las quimiocinas RANTES y la eotaxina y han observado que también se encuentran elevadas en las PN y son claves en el reclutamiento y activación de los eosinófilos (38). La eotaxina, quimiocina de la familia CCL, se ha demostrado que tiene especial afinidad por el receptor CCR3 de los eosinófilos y de los linfocitos *Th2* y que juega un papel importante en los pacientes con asma y poliposis nasal (48).

En cambio, otros mediadores como TNF- β con funciones antagónicas a IL-5, cuya acción anula el efecto de supervivencia que ejerce IL-5 y GM-CSF sobre los eosinófilos, se encuentran en menor concentración en RSCcPN con respecto a RSCsPN.

Mediadores inflamatorios como los eicosanoides, grupo de moléculas de origen lipídico como las prostaglandinas, leucotrienos o tromboxanos, también parecen tener un rol destacado en la PN. Al igual que ocurre con la IL-5 y PCE, los cisteín-leucotrienos como el LTC₄ se encuentran

regulados al alza y asociados con la gravedad de la inflamación. Las prostaglandinas se caracterizan en cambio por un déficit en su producción en especial la PGE₂, existiendo una correlación inversa entre el grado de inflamación eosinofílica y la concentración de PGE₂. Especial relevancia tiene la función de estos mediadores eicosanoides en los pacientes con el síndrome de ASA triada, en los que además de observarse la alteración de las concentraciones LTC₄ y PGE₂, se aprecia un aumento en la lipoxina LXA₄, con función quimiotáctica sobre neutrófilos y eosinófilos (49).

Mediador	Celula diana	Función
IL-1	LT, eosinófilos	Proliferación y supervivencia celular
IL-3	Leucocitos, eosinófilos	Diferenciación eosinófilos. Proliferación y supervivencia
IL-4	LTh0, LB	Diferenciación, quimiotaxis LT Estimulación LB
IL-5	CHP CD34+, eosinófilos	Diferenciación eosinófilos. Proliferación y supervivencia
IL-6	Linfocitos, cél.endoteliales	Inhibir síntesis TNF- α e IL-1
IL-8	Neutrófilos	Quimiotaxis
IL-13	Células endoteliales, linfocitos	Quimiotaxis, induce síntesis de IgE y receptores VCAM.-1, inhibe INF- α
EOTAXINA	Eosinófilos	Quimiotaxis
RANTES	Eosinófilos	Quimiotaxis
LTC ₄	Eosnófilos, neutrófilos	Quimiotaxis
PGE ₂	Eosnófilos, neutrófilos	Quimiotaxis
LXA ₄	Eosnófilos, neutrófilos	Quimiotaxis
TNF- α	Células endoteliales	Quimiotaxis
TNF- β	Eosinófilos	Inhibir efecto IL-5
TGF β	Linfocitos, macrófagos	Pleiotrópica en proliferación y supervivencia celular
GM-CSF	CHP CD34+, eosinófilos	Diferenciación eosinófilos. Proliferación y supervivencia
INF- γ	LTh2	Inhibir producción IgE

Tabla 1.4 Citocinas más importantes del sistema inmunitario.

Todas estas diferencias en la expresión de mediadores inflamatorios moleculares permiten definir distintos fenotipos de patrón inflamatorio atendiendo a las poblaciones celulares inmunitarias que se encuentran en la mucosa de los pacientes con RSCcPN y las mucosas de RSCsPN. De esta forma, en las RSCcPN existe una predominancia en eosinófilos, linfocitos Th2 y

linfocitos B, mientras que en la RSCsPN se encuentra aumentada la cantidad de neutrófilos y fibroblastos con un ligero aumento de linfocitos T mayoritariamente *helper* 1.

1.2.4.2 Alteración en la producción de mucinas

El buen funcionamiento fisiológico de los senos paranasales depende básicamente de dos factores, del aclaramiento mucociliar y de la permeabilidad del complejo osteomeatal. La RSC con PN se caracteriza por la existencia de una hipersecreción e hipermucoviscosidad que dificulta el aclaramiento mucociliar. Esta circunstancia altera la permeabilidad de complejo osteomeatal, y junto con la inflamación de la mucosa y los cambios histopatológicos tiende a la cronicidad.

Las mucinas son proteínas de alto peso molecular y altamente glicosiladas, con propiedad viscoelástica responsable del aspecto de gel, y constituyen el principal componente del moco de las vías aéreas. La familia proteica de las mucinas es muy heterogénea y actualmente se conocen al menos 19 genes implicados en la codificación de mucinas.

Basándose en las características estructurales y funcionales, las mucinas se pueden agrupar en tres categorías (50):

1. Mucinas ancladas a la membrana plasmática, donde se encuentran las *MUC1*, *MUC3*, *MUC4*, *MUC11* y *MUC12*.
2. Mucinas de formación de gel. Subgrupo formado por las mucinas *MUC2*, *MUC5AC*, *MUC5B*, *MUC6* y *MUC19*.
3. Mucinas solubles.

En el trabajo de Kim y col, se observó mediante el estudio de RNA mensajeros (mRNAs) expresados por los genes de las mucinas, que la concentración de mucinas tipo *MUC5AC* y *MUC5B* es significativamente superior en la mucosa sinusal de pacientes con RSC que en la mucosa de pacientes sanos, lo que indica que la hiperproducción de estas mucinas puede jugar un papel importante en la patogénesis de la RSC (51). A su vez Ding y col., también encontraron un incremento significativo de la expresión de los genes de estas mismas mucinas en el grupo de pacientes con RSCcPN. La producción de *MUC5AC* se expresó principalmente en las células

caliciformes mientras que la expresión de MUC5B se localizó en las células epiteliales de la mucosa sinusal (52).

Las secreción de mucinas como MUC5AC o MUC5B está regulada mediante la vía de señalización dependiente de los llamados receptores de los factores de crecimiento epidérmico - *Epidermal growth factor Receptor*- (EGFR). La fosforilación de esta familia proteica, EGFR, tras la unión con un ligando, induce la producción de la mucina MUC5AC. Los niveles de EGFR en la mucosa de RSC están significativamente más elevados comparados con los niveles de expresión de la población sana (53).

Uno de los principales ligandos de EGFR es la citocina TGF- α , que se encuentra en su forma inactivada (pro-TGF- α) en la superficie de las células epiteliales. Tras un estímulo (tabaco, moléculas como los liposacáridos bacterianos) o daño tisular (radicales de estrés) se produce una respuesta celular que permite sintetizar una metaloproteasa dependiente de Zinc (TACE) que escinde a Pro-TGF- α , liberando la porción soluble, TGF- α , y activando de esta forma la vía de secreción de moco (54).

Así, se formula la hipótesis de que aumentos en los niveles de TGF- α en las RSC desencadenan un aumento en la secreción mucinas, dificultando el buen aclaramiento mucociliar, y favoreciendo los procesos inflamatorios y la morbilidad asociada a la RSC (55).

1.2.4.3 Alteración de la integridad del epitelio nasal

a) Uniones estrechas

Las uniones estrechas, uniones ocludens o zonula ocludens- *epithelial tight junctions*- son estructuras citológicas presentes en las células epiteliales y que permiten la aproximación de las membranas lipídicas de las células adyacentes. Estas estructuras proteicas (claudinas, ocludinas, caderinas) son responsables de:

- A. La impermeabilidad del epitelio, impidiendo además la entrada de partículas extrañas, como alérgenos, a las capas subepiteliales.

- B. La regulación del flujo paracelular. La apertura en las uniones estrechas puede permitir la entrada de células inflamatorias hacia el lumen, favoreciendo la resolución del proceso inflamatorio.

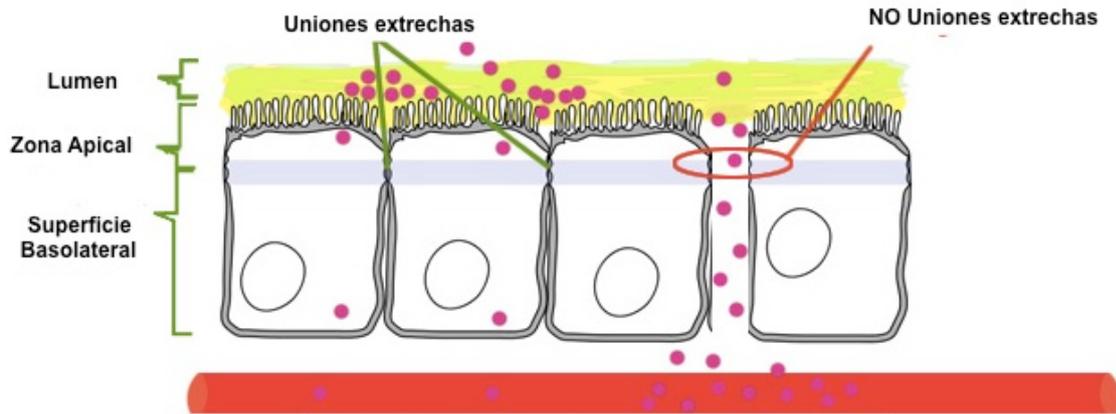


Figura 1.7 Epitelio nasal con estructura anómala en las uniones estrechas

Algunas enfermedades crónicas presentan un funcionamiento anómalo de estas estructuras como ocurre en el asma bronquial, enfermedades inflamatorias intestinales o de la piel. Este hecho ha llevado a plantear si alteraciones en la función de barrera epitelial o en la expresión de las uniones estrechas podrían tener un papel en la patogénesis de la RSC.

Cuando se estudió la resistencia transepitelial en biopsias de pacientes con RSCcPN se encontró una disminución tanto en dicha resistencia como en la expresión de proteínas estructurales de las uniones estrechas (occludina y claudina tipo 4). Esta alteración en la integridad epitelial indica un posible papel en la patogénesis de los pacientes con RSC (56).

b) Inhibidor de proteasa SPLINK 5

Actualmente se conocen numerosas enfermedades alérgicas como la dermatitis atópica, la rinitis alérgica o el asma que tienen comprometido el buen mantenimiento de la función de barrera epitelial.

Una de las muchas proteínas involucradas en el mantenimiento de las funciones de barrera en el epitelio es la SPLINK 5 (*Serine protease inhibitor Kazal type 5*) o también conocida como LEKTI (*Lympho epithelial Kazal type related inhibitor*), es una proteína con actividad inhibidora de enzimas proteasas. No tiene actividad bactericida.

SPLINK 5 tiene un papel bien conocido en su función de barrera en el tejido de la piel. No obstante, se desconoce exactamente su función en vías aéreas, aunque se sospecha que inhibe la actividad de las proteasas provenientes de la exposición continuada a alérgenos, bacterias y/o hongos. SPLINK 5 podría proteger las uniones estrechas existentes entre las células del epitelio (integridad tisular) del ataque de estas proteasas microbianas, de alérgenos o incluso originadas por el propio huésped debido a procesos inflamatorios.

Alteraciones en la inhibición de proteasas están relacionadas con aumento de colonización bacteriana, del mismo modo que se conoce la asociación entre alteraciones de SPLINK5 en las dermatitis atópicas y la colonización de la piel, más de un 90%, por *Staphylococcus aureus*. Se ha planteado la hipótesis de que un déficit en SPLINK 5 facilite la colonización bacteriana en las RSCcPN.

Richer y col. demostraron una menor expresión de SPLINK 5 en los pólipos nasales de las RSCcPN con respecto al grupo RSCsPN. Además, el grupo control tuvo niveles más elevados que los pacientes con RSC (57).

1.2.4.4 Alteración en la inmunidad innata

Otro de los mecanismos fisiopatológicos propuestos en la etiología de la RSC es la alteración en la función del sistema inmunitario innato del huésped, que generaría una respuesta inmune deficitaria, favoreciendo de esta forma la colonización o infección de microorganismos, en especial, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y género *Aspergillus* debido a su elevado carácter patogénico.

Los componentes del sistema inmunitario innato son principalmente:

- Las proteínas antimicrobianas como la lisozima, lactoferrina, las defensinas y catelicinas.

- Los receptores de reconocimiento de patógenos.
- La vía alternativa del sistema del complemento.

a) **Proteínas antimicrobianas**

A. Lisozima

La Lisozima, es una enzima con efecto bactericida que actúa principalmente sobre el peptidoglicano de la pared de las bacterias grampositivas (*Staphylococcus*, *Streptococcus*) al hidrolizar enlaces glicosídicos N-acetil-murámico (β -1,4)- N-acetil-glucosamina. Se barajó durante años la posibilidad de que un descenso en la cantidad de esta enzima en la mucosa nasal podría tener un rol importante en el desarrollo de procesos inflamatorios de origen bacteriano o fúngico, asociándose de esta forma como posible factor etiológico de la RSC.

Recientemente Woods y col descartaron esta posibilidad al detectar niveles más elevados de expresión de lisozimas en epitelios de RSC con respecto a pacientes sanos, demostrando que no existe un defecto de expresión de esta enzima (58).

B. Lactoferrina

La Lactoferrina es una proteína secuestradora del hierro libre, que inhibe el crecimiento bacteriano tanto en bacterias grampositivas como gramnegativas. También es capaz de actuar frente a microorganismos que forman estructuras de *biofilms*.

Los estudios de Psaltis y col. han demostrado una importante reducción en la expresión de mRNA y síntesis de lactoferrina en la mucosa nasal de los pacientes con RSC. Además, también han puesto de manifiesto que la reducción de esta proteína es mayor en aquellas RSC colonizadas por microorganismos embebidos en *biofilms* que aquellas RSC sin colonización bacteriana. Lo que indica que la lactoferrina es un importante factor en la contención de la colonización bacteriana y del desarrollo de *biofilms* (59, 60).

C. PLUNC

PLUNC (*Palate Lung and Nasal epithelium Clone*) es una proteína codificada por el gen BPIFA1 y secretada en el epitelio respiratorio y región nasofaríngea, que se incluye dentro del sistema de inmunidad innata por tener actividad antimicrobiana y especialmente frente microorganismos embebidos en *biofilms*. Tsou y col. en su trabajo con 174 pacientes con RSCcPN observaron una menor expresión de esta proteína en los pólipos nasales que se encuentran colonizados por bacterias, en especial por *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, no encontraron ninguna asociación entre estos bajos niveles de expresión de PLUNC y otros factores como la edad, sexo o grado de ocupación de los pólipos nasales (61).

La ausencia o disminución de tejido glandular en el epitelio de los pólipos nasales de los pacientes con RSCcPN podría explicar la disminución la producción de lisozima, lactoferrina y PLUNC observada cuando se comparan los niveles de estas proteínas en pacientes con RSCsPN (62).

D. Defensinas

Las defensinas, son pequeños péptidos ricos en cisteína (3-6 kDa), producidas por leucocitos y células epiteliales, con actividad de acción de amplio espectro, y que se acumulan directamente sobre la bicapa lipídica de las membranas plasmáticas de bacterias, hongos y virus envueltos. Estos péptidos forman canales que aumentan la permeabilidad de la membrana por mecanismos dependientes de cargas eléctricas.

En humanos se conocen dos grandes familias de defensinas según su estructura molecular y distribución genómica, las α -defensinas y las β -defensinas. En la mucosa nasal las defensinas más importantes son las defensinas β 1 (hBD-1) que tiene un papel constitutivo o permanente en la defensa del epitelio nasal, mientras que las α -defensinas 1, 2 y 3 y la defensina β 2 (hBD-2) están inducidas en la respuesta local infecciosa o inflamatoria (63).

A pesar de que todo parece indicar que las defensinas, al igual que sucede con la lactoferrina, podrían ser un factor relevante en la fisiopatología de la RSC, actualmente no se ha establecido ninguna asociación entre la morbilidad de las RSC y alguna alteración en la regulación o en la expresión de las defensinas en la mucosa nasal.

E. Familia S100

Las proteínas S100 son una familia multigénica compuesta por más de 20 pequeñas proteínas de bajo peso molecular que tienen numerosas funciones, regulación en la diferenciación y transformación celular, función de barrera y acción directa antimicrobiana. En particular tienen especial relevancia en esta familia las proteínas S100A7 y S1008/9 (64).

Recientes estudios sugieren la hipótesis de que la reducción en la expresión de defensinas en el epitelio sinusal podría aumentar la susceptibilidad de colonización o infección de bacterias y/o hongos en pacientes con RSC. En este sentido, Tieu y col. demostraron que la expresión de S100A7, también llamada psoriasina, está drásticamente reducida en el epitelio nasal de los pacientes con RSC. A su vez, cuando estudiaron la expresión de S1008 y S1009, que forman un complejo heterodímero activo (S1008/9), llamado calprotectina, encontraron una disminución significativa de esta proteína en los pacientes con RSC con respecto al grupo control. La calprotectina tiene su principal acción bactericida sobre *Staphylococcus aureus* (65).

F. Catelicidina

Las catelicinas son una familia de proteínas que además de tener acción bactericida similar a las defensinas, son moléculas señal (quimiotaxis) que forman parte del sistema inmune innato de los mamíferos. En humanos, solo se conoce la catelicidina LL-37. Su precursor, hCAP18, se encuentra en los lisosomas de los macrófagos y en los leucocitos polimorfonucleares.

Se ha encontrado a este pequeño péptido LL-37 en la superficie de las células epiteliales y en las glándulas submucosas del tejido mucoso nasal, con un incremento en sus niveles en aquellas mucosas nasales de pacientes con poliposis nasal (66). Además, a diferencia de lo que ocurre con la lactoferrina, se han observado concentraciones superiores de LL-37 en los pólipos nasales colonizados por *Staphylococcus aureus* comparado con los pólipos no colonizados (67).

b) Los receptores de reconocimiento de patógenos.

Los receptores tipo Toll *-Toll-Like receptors-* (TLR) son una familia de glicoproteínas transmembrana que forman parte del sistema inmunitario innato y se encuentran presentes en diversos tipos celulares como mastocitos, epitelio intestinal, macrófagos y otras células presentadoras de antígeno. Estos receptores transmembrana poseen un dominio extracelular variable que reconoce ligandos moleculares expresados por diversos agentes infecciosos y un dominio citoplasmático común *-Toll-IL-1 Receptor-(TIR)* que tras la unión al ligando desencadena una señalización intracelular que permite alterar o modificar la producción de citocinas, como moléculas mediadoras en la respuesta innata. Estos ligandos moleculares están asociados a patrones químicos comunes a ciertos tipos de patógenos *-Pathogen associate molecular patterns-* (PAMPs) como son los ácidos teicoicos presentes en la pared celular de las bacterias grampositivas, los lipopolisacáridos de la pared celular de las bacterias gramnegativas o el ARN de doble cadena existente en algunos virus (figura 1.8). Actualmente se conocen en la especie humana, 11 tipos de TLRs cada uno codificado por un gen diferente.

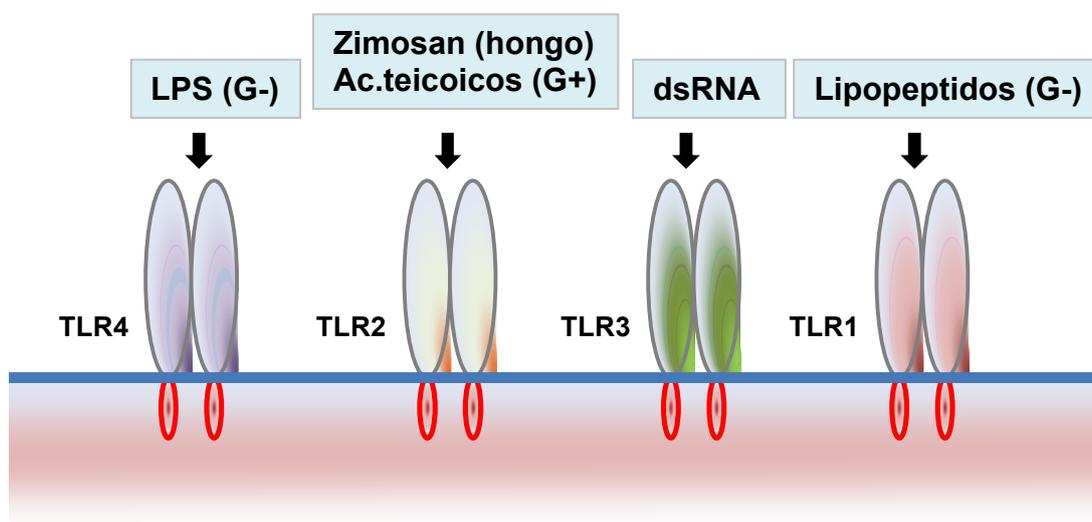


Figura 1.8 Receptores tipo Toll de células inmunitarias y sus principales ligandos

Se ha demostrado la existencia de mRNA de proteínas pertenecientes a la familia de las proteínas Toll-Like receptors (TLR) en las células del epitelio respiratorio. En experimentos in vitro donde se estimularon estas células con RNAs de doble cadena, flagelina, LPS, peptidoglicano, etc, se observó que eran capaces de sintetizar de mRNA TLR especialmente TLR2, TLR3 y TLR5 (68).

Además en su trabajo Lane y col. demostraron la existencia de una alteración en la expresión de los genes asociados con la respuesta innata en las RSCcPN, ya que tras analizar 30 pacientes con RSC y PN, se detectó un incremento significativo en la síntesis de mRNA pertenecientes a TLR2 en las células epiteliales de la mucosa etmoidal con respecto a los 11 pacientes del grupo control. No obstante, no se detectó una correlación con la existencia de un aumento de la expresión de proteínas tipo TLR2 con respecto al grupo control (69).

También se ha demostrado que los tipos TLR2, TLR3 y TLR4 están subexpresados en pacientes con RSCcPN colonizados por hongos del género *Aspergillus* y por bacterias especialmente por *Staphylococcus aureus* (70).

Todo ello, sugiere la posibilidad de una desregulación entre las señales de activación e inactivación en las células efectoras del sistema inmunitario innato de los pólipos nasales, lo que contribuye a generar una respuesta inflamatoria alterada pudiendo afectar a la morbilidad de la RSC.

c) La vía alternativa del sistema del complemento.

Las proteínas del sistema del complemento, formado por más de 30 glicoproteínas, forman parte de la respuesta innata inicial y ayudan a eliminar patógenos de las vías respiratorias. La activación en cascada del sistema del complemento es muy importante para mantener la homeostasis del tejido, facilitando la fagocitosis o potenciando la respuesta inflamatoria, pero una activación excesiva o descontrolada puede provocar procesos y/o enfermedades inflamatorias.

El sistema del complemento puede activarse por tres vías, la vía clásica mediante inmunocomplejos antígeno-anticuerpo, la vía alternativa que reconoce moléculas bacterianas como los lipopolisacáridos (LPS) y la vía de las lectinas que utiliza proteínas llamadas Lectinas unidas a manosa- *Mannan-binding Lectin*- (MBL) que reconocen carbohidratos que se encuentran en la superficie de algunos microorganismos patógenos.

Recientemente se ha descrito que existen defectos en la desregulación de este sistema del complemento en las RSC. Estas alteraciones se han detectado en diferentes componentes de las tres vías de activación, aunque parece que ocurre un mayor déficit en la vía de las lectinas (MBL). Este hecho, parece indicar que este déficit en el sistema del complemento tiene un rol importante en el desarrollo de la RSC. Sin embargo, no se ha demostrado la relación de estos defectos en el sistema del complemento y los síntomas, severidad o recurrencia de las RSC (71, 72).

1.2.4.5 Déficit en la Remodelación tisular

Otro de los aspectos estudiados es la tasa de remodelación tisular existente en las RSC, ya que cualquier afectación en su buen funcionamiento provocaría una defectuosa reparación de la matriz extracelular. Especialmente, han sido estudiadas las isoformas 1, 2 y 3 de la citocina Factor de Crecimiento Transformante - *Transforming Growth Factor*- (TGF- β), que actúan como importantes moduladores en el proceso de reparación y formación de la matriz celular al controlar la proliferación y diferenciación celular. La TGF- β favorece la producción y depósito de proteínas extracelulares e inhibe la activación de monocitos, macrófagos y linfocitos B inactivando el curso inflamatorio.

La RSC se caracteriza por un marcado patrón de remodelación tisular que incluye daño epitelial, engrosamiento de la membrana basal, fibrosis y/o edema. Los estudios de remodelación tisular en la RSC son controvertidos y todo parece indicar que existen diferentes patrones de remodelación tisular según el estadio del proceso inflamatorio de la enfermedad y de la presencia o ausencia de PN (73).

Van Bruenae y col. observaron que los pacientes con RSCsPN presentan concentraciones elevadas de TGF- β 1, incremento en la expresión de los receptores de TGF β , tipo RI y elevado número de células activadas por este mecanismo. Cuando se compara este mecanismo en los pacientes con RSCcPN, se detecta una concentración en TGF- β 1 significativamente menor, una menor expresión en los receptores TGF β , tipo RII y un número menor de células activadas (48). También se ha observado una menor concentración de colágeno y de metaloproteasas en la matriz epitelial en la RSCcPN con respecto a las RSCsPN (74, 75).

Todo parece indicar que la citocina TGF- β 1 juega un papel relevante en la remodelación tisular involucrada en la RSC. Alteraciones en la regulación, activación o expresión de TGF- β 1 pueden relacionarse con los mecanismos etiopatogénicos de la diferenciación de los diferentes subtipos de RSC (76).

1.2.4.6 Implicación de microorganismos

Son numerosos los estudios que relacionan la RSC con la presencia de microorganismos en la mucosa nasal, ya que se han conseguido aislar un elevado número de microorganismos tras el cultivo de porciones de mucosa nasal. Los microorganismos más frecuentes se detallan en la Tabla 1.5.

Staphylococcus epidermidis

Staphylococcus aureus

Haemophilus influenzae

Moraxella catarrhalis

Candida spp

Aspergillus spp

Tabla 1.5 Principales microorganismos aislados en los pólipos nasales.

Además estudios en RSC recurrentes tras cirugía endoscópica sinusal, han determinado que la infección bacteriana es una de las causas del agravamiento de los síntomas tras la cirugía (77).

Ambos aspectos han permitido plantear la hipótesis de que la flora microbiana está de alguna forma involucrada en la inflamación y síntomas de la RSCcPN. Se han propuesto varias maneras de participación microbiana en la patología, de una forma directa por infección bacteriana y sus productos (toxinas), o mediante una reacción de hipersensibilidad frente a antígenos bacterianos

Actualmente esta hipótesis de una infección directa aguda se encuentra a debate, ya que los resultados son controvertidos. Lo más aceptado es que la infección sería secundaria a la génesis de la poliposis nasal. No obstante esta infección no explicaría la eosinofilia ni el perfil conjunto de

mediadores de Linfocitos T, ya que el patrón característico de la rinosinusitis crónica infecciosa es la predominancia de neutrófilos.

Otro aspecto a destacar es la imposibilidad de distinguir entre infección crónica y colonización microbiana. La mucosa nasal al forma parte del epitelio respiratorio de vías altas es un lugar de continuo contacto con partículas y microorganismos exógenos y que actúa de barrera evitando la penetración de éstos al organismo. Se conoce desde hace tiempo que las fosas nasales son el lugar idóneo donde sobreviven numerosas bacterias como es el caso de *Staphylococcus aureus*, como colonizador, definiendo a las personas como portadores asintomáticos. Se ha estimado que aproximadamente entre el 20-30% de la población general es portadora de esta bacteria (78).

Recientemente se ha descubierto que los *biofilms* bacterianos, estructuras compuestas por comunidades bacterianas altamente organizadas y embebidas en una matriz protectora extracelular, se encuentran presentes sobre la superficie de la mucosa sinusal. Esta estructura organizativa responde a condiciones adversas de crecimiento, y proporciona nuevas características como un aumento a la resistencia a antibióticos y a la respuesta inmune del hospedador. Múltiples estudios revelan la presencia de estas estructuras aunque con porcentajes muy dispares según los métodos empleados. Las bacterias implicadas son las mismas que se aíslan tras el cultivo bacteriológico del tejido polipoide (tabla 1.5), pero con un aumento de la presencia del género *Staphylococcus*. (79). Sin embargo, no está claro cuál es el rol de los *biofilms* en el inicio del establecimiento de la RSC (80).

Otra teoría se centra en la liberación de toxinas como agentes implicados en la formación de la poliposis nasales. En este aspecto, los superantígenos (exotoxinas o enterotoxinas bacterianas) están siendo las moléculas más estudiadas por su capacidad de incrementar de forma sustancial la activación de los linfocitos T, especialmente los linfocitos T CD4 y la liberación de citocinas. Los superantígenos tienen la capacidad de activar a los linfocitos T al unirse directamente al receptor TCR sin necesidad de ser presentados por las células presentadora de antígeno, generando una respuesta linfocitaria mayor que los antígenos convencionales. Bachert y otros autores han encontrado IgEs específicas frente a enterotoxinas estafilocócicas en el 50% de los pacientes con poliposis nasal y con una elevada prevalencia en los paciente con hipersensibilidad a la aspirina (81). Pero como demuestran estudios del mismo grupo de Bachert, esta presencia de IgEs frente a enterotoxinas no es exclusiva de la RSCcPN, ya que al estudiar grupos de pacientes con asma

severa encontraron que casi el 60% presentaban IgEs frente a enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* (82).

Además estudios *in vitro* han demostrado la actividad de las enterotoxinas como mediadores en las células proinflamatorias. De esta forma se ha observado que los eosinófilos pueden actuar como células presentadoras de antígenos en presencia de enterotoxinas (SEA, SEB y SEE) induciendo, la estimulación y proliferación de linfocitos T especialmente CD4, aunque con menor eficiencia que los macrófagos. También, afectan directamente a la actividad de los eosinófilos al inhibir su apoptosis y modular la expresión de sus receptores de membrana como CD45, CD54 (83).

No obstante, quedan muchos aspectos por aclarar, desde el tipo o clase de enterotoxinas involucradas hasta la correlación existente entre la respuesta inmune específica producida por las enterotoxinas y la observada en la mucosa sinusal (84).

El papel de la infección fúngica dentro de las RSCcPN es muy controvertido. El género *Aspergillus* es el hongo más estudiado y el que más se ha podido relacionar con esta patología. La rinitis fúngica alérgica o también llamada rinosinusitis alérgica por *Aspergillus*, es una patología caracterizada por una alta presencia de eosinófilos e IgE local y aislamiento de hifas fúngica en la mucina sinusal. Cabe destacar que al cuantificar las IgE específicas fúngicas a nivel sistémico no existe diferencia entre los pacientes con RSC y los pacientes sanos (85). Actualmente, la hipótesis como factor etiopatológico de la poliposis nasal radica en el rol saprofítico y superficial de los hongos sobre la mucosa nasal, donde podría producir una reacción inmunitaria antifúngica local mediada por IgE. Ricketti y otros autores plantean la posibilidad de que una hiperreactividad inmunitaria frente a estos organismos fúngicos puede desencadenar una inflamación local crónica y de esta forma favorecer el desarrollo de las poliposis nasales (86, 87).

1.3 STAPHYLOCOCCUS AUREUS. CARACTERÍSTICAS GENERALES

1.3.1 Historia de *Staphylococcus aureus*

A finales del siglo XIX, en 1880, Alexander Ogshton (1844-929), cirujano escocés, describió la presencia de microorganismos redondeados y que se agrupaban en masas “*cloud-like masses*” a

los que denominó “*micrococci*”, en el material purulento de abscesos de pacientes sometidos a cirugía y demostró que eran los causantes de los abscesos piogénicos “... *a cluster forming coccus was the cause of certain pyogenous abscesses in the man*”. Más tarde, en 1882 denominaría a esos microorganismos *staphylococci*, del término griego “*staphyle*” por su agrupamiento en forma de racimos de uvas (88, 89). En 1884, F.J. Rosenbach (1842-1923) consiguió cultivar dos cepas de *Staphylococcus* una de ellas por su pigmentación dorada la denominó *Staphylococcus pyogenes aureus* del latín *aurum*=oro (actual *Staphylococcus aureus* subespecie *aureus*) y la otra cepa no pigmentada la denominó *Staphylococcus pyogenes albus*, del latín *albus*=blanco actualmente llamado *Staphylococcus epidermidis* (90, 91).

Actualmente el género *Staphylococcus*, está compuesto más de 40 especies, y se caracteriza por poseer un cromosoma de 2.8-2.9 Mbp con un porcentaje de G+C entre 30-39 mol%. De todas las especies del género menos de la mitad colonizan al hombre. Las especies con mayor importancia clínica son *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus lugdunensis* y *Staphylococcus saprophyticus*.

1.3.2 Prevalencia como patógeno humano

Staphylococcus aureus coloniza la piel y las fosas nasales hasta en un 30% de las personas sanas, pero también es uno de los más importantes y prevalentes patógenos del ser humano capaz de originar un amplio espectro de procesos infecciosos, desde infecciones cutáneas relativamente benignas (foliculitis, impétigo) hasta enfermedades sistémicas potencialmente graves (bronconeumonía, meningitis) tabla 1.6. Las infecciones asociadas a *S.aureus* tienen una gran mortalidad cerca al 25%. En el contexto hospitalario las infecciones por *S.aureus* duplican la estancia media, la mortalidad y los costes médicos con respecto a hospitalizaciones sin complicaciones.

Enfermedades mediados por tóxicas
• Síndrome de piel escaldada. (SPEE)
• Síndrome de shock estafilococo tóxico (TSST)
• Intoxicaciones alimentarias (superantígenos)
Enfermedades por invasión y destrucción tisular.
• Infecciones cutáneas: Impétigo, foliculitis, heridas quirúrgicas
• Infecciones respiratorias: Neumonía, empiemas
• Infecciones osteoarticulares: osteomielitis, artritis séptica.
• Infecciones genitourinarias: cistitis, prostatitis.
• Infecciones diseminadas: bacteriemias, endocarditis, meningitis.

Tabla 1.6 Principales enfermedades asociadas a *Staphylococcus aureus*.

Actualmente existe una subdivisión fenotípica de *Staphylococcus aureus* atendiendo a su comportamiento frente a los antibióticos del grupo β -lactámicos por la adquisición de una porina PBP2a codificada por el gen *mec* integrado dentro del elemento genético móvil llamado *cassete* cromosómico estafilocococico (*SCCmec*). Este *cassete* además está flanqueado por genes de recombinasas que le permiten una transmisión intra e interespecies. Esta característica genotípica se detecta fenotípicamente con el comportamiento de capa cepa frente al antibiótico Meticilina. Así a los *Staphylococcus aureus* resistentes a Meticilina se les denomina MRSA y a los sensibles a Meticilina MSSA. Además las cepas MRSA suelen adquirir resistencias a otras familias de antibióticos dificultando notablemente la posibilidad de tratamiento antibiótico adecuado cuando están involucrados en procesos infecciosos y contribuyendo de esta forma a aumentar la morbimortalidad de la infección.

Las cepas MRSA se aíslan principalmente en pacientes que tienen una relación estrecha con instituciones sanitarias (hospitales, residencias, centros de día), aunque en los últimos años ha aumentado la prevalencia de estas cepas en infecciones comunitarias, lo que ha llevado a poner en marcha programas europeos de control de propagación del MRSA (figura 1.9).

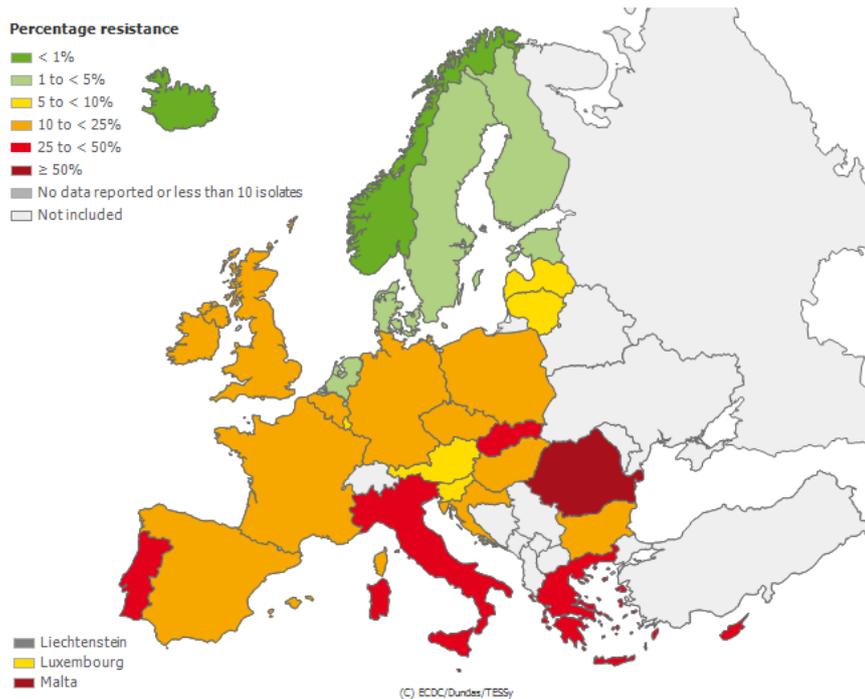


Figura 1.9 Prevalencia de aislado MRSA ECDC 2013.

1.3.3 Características microbiológicas de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es un coco gram-positivo de tamaño 0,5-1,5 μm , inmóvil, células esféricas, que generalmente se agrupan en tétradas y/o racimos irregulares, aunque se pueden encontrar también como células aisladas o en parejas, no formador de esporas, anaerobio facultativo, coagulasa y catalasa positivo (figura 1.10). Esta última característica se utiliza como factor clave para la identificación de género *Staphylococcus*, excepto en la subespecie *S.aureus* subs. *anaerobius* que es anaerobio y catalasa negativa. No obstante, esta subespecie rara vez se aísla en humanos al ser un patógeno animal, que produce abscesos principalmente en ovejas y cabras, y rara vez produce infecciones en humanos (92). La mayoría de aislamientos de *S.aureus* en humanos hacen referencia a *S.aureus* subespecie *aureus*.

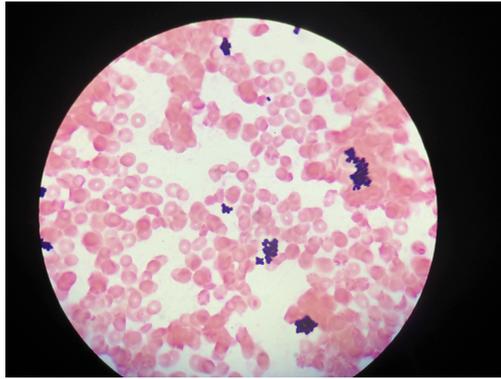


Figura 1.10 Fotografía de microscopio óptico (X1000) donde se visualiza bacterias del género *Staphylococcus*.

1.3.4 Propiedades para la identificación en laboratorio

Staphylococcus aureus crecen en presencia de 10% NaCl entre 18-40°C. En medios habituales como Agar sangre o Agar Chocolate presenta unas colonias de 1-3 mm. de diámetro a 24h. y 3-8 mm. en 72h. a temperatura de 37°C. Las colonias suelen tener un pigmento entre amarillo y naranja, lisas y hemolíticas (figura 1.11).



Figura 1.11 Fotografía de cultivo de una cepa de en medio de cultivo en placa Agar Sangre

La identificación bioquímica de laboratorio se basa en las siguientes características (figura 1.12):

- Coagulasa positivo y detección positiva de proteína A. Prueba de laboratorio.
- Resistencia a concentraciones elevadas de NaCl (medio selectivo de Chapman).
- Pruebas bioquímicas: actividad fosfatasa alcalina producción de ácido a partir de D-manitol y D trehalosa. Producción de dextrirribonucleasa termoestable (DNAsa +), β-glucosidasa arginina descarboxilasa, N-acetilglucosamina, acetoína, reducción de nitratos y ureasa.

	Colonia pig, mentada	Oxidasa	Catalasa	Factor aglutinación	Pyrrolidimyl arylamidás	Reducción de nitratos	Producción acetoina	B-galactosidasa	Producción de ácido a partir de						
									D- Trehalosa	D- Manosa	D- Xilosa	Maltosa	Rafinosa	Ribosa	L-arabinosa
<i>Staphylococcus aureus</i> subs. <i>aureus</i>	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-

Figura 1.12 Principales pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de *Staphylococcus aureus*



Figura 1.13 Panel de identificación PC31 del analizador Microscan (Siemens).

1.3.5 Determinantes de virulencia

Existen varios componentes del *Staphylococcus aureus* que determinan su virulencia e inducen la respuesta inmunitaria del huésped, y son principalmente: la presencia de capsula, los componentes de la pared bacteriana, las proteínas de superficie y las diferentes toxinas que produce.

1.3.5.1 Cápsula

La mayoría de las cepas de *Staphylococcus aureus* presentan una microcápsula solo visible por microscopía electrónica. Las primeras cepas productoras de cápsula fueron descritas por Gilbert en 1931 (93). Se han descrito 11 serotipos capsulares diferentes, los mayoritarios en los aislamientos de muestras clínicas son los serotipos 5 y 8, 25% y 50% respectivamente. Existen dos serotipos asociados a un mayor grosor de la cápsula en los serotipos 1 y 2 cuyas colonias presentan un aspecto mucoso en los medios de cultivo habituales (94). La cápsula es de naturaleza polisacáridica y les proporciona resistencia a la fagocitosis de los linfocitos polimorfonucleares. Las cepas con microcapsulada activan al sistema del complemento debido a componentes del peptidoglicano de la pared celular. El componente C3 del sistema del complemento se une a la pared celular bacteriana pero las cepas altamente capsuladas lo cubren, impidiendo que se pueda unir a los receptores de los leucocitos, dificultando la fagocitosis y aumentando de este modo su virulencia.

1.3.5.2 Componentes de la pared

A. Peptidoglicano: el 50% de la pared celular está compuesta por mureína, peptidoglicano compuesto por subunidades alternas de polisacáridos N- acetilglucosamina y N-acetilmurámico. Además, *S.aureus* presenta enlaces cruzados de tetrapeptidos unidos al N-acetilmurámico por puentes de pentaglicina. El peptidoglicano tiene actividad endotóxica, estimula la liberación de citocinas por los macrófagos, activa la vía del complemento y la agregación plaquetaria.

B. Ácido teicoicos: constituyen el 30% de los componentes de la pared celular, característicos de las bacterias gram-positivas y específicos de especie. *Staphylococcus aureus* presenta como ac. teicoico cadenas de moléculas de ribitol esterificadas entre sí por puentes de fosfato y con N- acetilglucosamina en posición 4. Su principal acción es unirse a la fibronectina. Juega un papel importante en la adherencia de la bacteria a las células epiteliales de la mucosa nasal y son altamente inmunogénicos (95).

1.3.5.3 Proteínas de superficie

A. La Proteína A, sintetizada por el gen *spa*, se encuentra presente en la superficie de la mayoría de las cepas de *S.aureus*. Tiene capacidad de unirse a la región Fc de las inmunoglobulinas de clase G, evitando la opsonización mediada por estos anticuerpos, dificultando su fagocitación.

B. Proteínas de la superficie bacteriana que reconocen las moléculas de adhesión de la matriz extracelular de los tejidos, *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*, (MRSRAMM), median la adherencia a los tejidos del hospedador e inician la colonización, lo que puede conducir al establecimiento de una posterior infección (96). Esta familia de proteínas se anclan covalentemente al peptidoglicano y actúan como receptores de componentes de la matriz extracelular como son el colágeno, la fibronectina o el fibrinógeno entre otros. Las principales proteínas de la familia MRSRAMM se detallan en la tabla 1.7. Estas proteínas de superficie son cruciales para el éxito de la bacteria como comensal o como patógeno. La cantidad de proteínas de superficie depende de la especie y de la cepa. *Staphylococcus aureus* puede expresar más de 24 proteínas de superficie, mientras que otros staphilococos coagulasa negativos, como *Staphylococcus epidermidis* o *Staphylococcus lugdunensis* expresan un número menor.

Proteína de adhesión	Ligando
<i>bbp</i>	sialoproteína osea
<i>ebpS</i>	elastina
<i>eno</i>	laminina
<i>fnbA</i>	fibronectina
<i>fnbB</i>	fibronectina
<i>fib</i>	fibrinógeno
<i>clfA</i>	fibrinógeno
<i>clfB</i>	fibrinógeno
<i>cna</i>	colágeno

Tabla 1.7 Principales proteínas de la superficie de *Staphylococcus aureus* que reconocen las moléculas de adhesión de la matriz extracelular MRSRAMM.

En los últimos años, son numerosos los estudios que relacionan diferentes patrones de expresión de estas proteínas de superficie de las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas, con el foco o tipo de infección estudiado. De esta forma, se ha descrito que la proteína *fnbA*, ligando de fibronectina, juega un importante papel esencial en el establecimiento de procesos infecciosos como la endocarditis, ya que además de facilitar la adhesión bacteriana al endotelio vascular también actúa como inductor de mecanismos inflamatorios y como procoagulante (97). En este mismo sentido, la proteína *cna*, ligando de colágeno, se ha asociado con infecciones musculoesqueléticas como la osteomielitis y con infecciones respiratorias como la neumonía necrosante asociada a la leucodina Pantón-Valantine de *Staphylococcus aureus* (98, 99).

Además como se ha señalado en los estudios de endocarditis los miembros de esta familia proteica también están implicados en otros factores patogénicos no únicamente como mediadores de adhesión a la matriz extracelular de los tejidos. Así, la proteína *cna* se ha demostrado que es capaz de unirse al componente C1 de la vía del complemento bloqueando la reacción en cascada e inhibiendo de esta forma la vía clásica de activación (100).

1.3.5.4 Toxinas

Una de las principales características de *Staphylococcus aureus* como microorganismo patógeno es su capaz para segregar toxinas que dañan la membrana de las células del hospedador. Estas toxinas se puedan agrupar en cuatro tipos:

a) Toxinas citolíticas

Estas toxinas proteicas, presentes en la mayoría de los aislados, forman poros en la membrana citoplasmática, provocando la liberación del contenido citoplasmático y la muerte celular. Especialmente son cinco proteínas:

- α , β , y δ - hemolisinas, siendo la α -hemolisina la que posee mayor poder citotóxico especialmente sobre hematíes, leucocitos polimorfonucleares y hepatocitos.
- Leucocidina o toxina γ , compuesta por dos proteínas S y F que deben unirse para formar complejos perforantes de membrana y así tener actividad hemolítica y leucotóxica.
- Leucocicina de Panton-Valentine, descubierta en 1932 semejante a la toxina γ , sin función hemolítica pero presenta una gran actividad citolítica por los leucocitos. Es una toxina que contiene dos componentes lukS-PV y lukF-PV y a diferencia de las anteriores toxinas citolíticas ésta se encuentra codificada por un bacteriófago que puede transferirse a otras cepas. Se asocia como neumonía necrosante adquirida en la comunidad y con fascitis y miositis necrosantes.

b) Enterotoxinas superantígenos

Las enterotoxinas *Staphylococcus aureus* constituyen una gran familia de exotoxinas pirógenas llamadas superantígenos (SAGs). Actualmente se han identificado más de 15 tipos

diferentes de enterotoxinas. Son proteínas que no activan al sistema inmunitario mediante el contacto normal, es decir, utilizando un antígeno que actúa como puente entre la célula presentadora de antígenos y el linfocito T. Los SAg's tienen la capacidad de reaccionar con la moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) tipo II de las células presentadoras de antígeno y con el receptor TCR del linfocito, formando un complejo trimolecular (figura 1.14). La formación de este complejo induce una activación del linfocito sin necesidad de mediar ningún antígeno (estimulación antígeno-independiente).

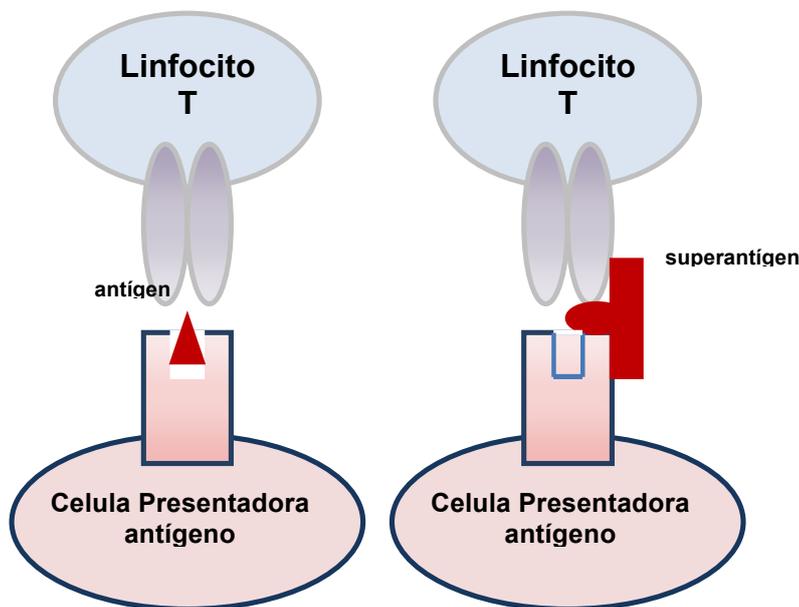


Figura 1.14. Diferencias entre el reconocimiento por MHC de moléculas antigénicas y superantigénicas.

Esta unión inespecífica activa hasta el 20% de los linfocitos T, siendo mucho mayor que la activación antígeno-dependiente que es 1 de cada 10.000 linfocitos. La consecuencia principal es una liberación masiva de citocinas linfocitarias que dan lugar a una intensa respuesta inflamatoria.

Los SAg's de *Staphylococcus aureus* más conocidos son las enterotoxinas A, B, C, D y E (SEA, SEB, SEC, SED y SEE respectivamente) que se asocian con mayor frecuencia a intoxicaciones alimentarias, caracterizadas por malestar general sin fiebre seguido de síntomas gastrointestinales como vómitos, náuseas y diarrea. El mecanismo de acción a nivel de la mucosa intestinal es todavía desconocido.

Un nuevo grupo de enterotoxinas conocidas como cluster *egc* formadas por *seg*, *sei*, *sem*, *seo*, *sel* y *sek*, también presentan actividad superantigénica aunque parece ser que se encuentran involucrados en menos procesos toxiinfecciosos (101).

Recientemente, numerosos estudios han propuesto que los SAGs pueden estar implicados también en la etiología de otras enfermedades como la psoriasis, la dermatitis atópica, el síndrome de Kawasaki o incluso en procesos inflamatorios crónicos como la RSC.

c) Toxina del síndrome de shock tóxico (TSST-1)

También conocida como exotoxina pirogénica C o enterotoxina F, descrita en 1978 por Todd. Proteína termolabile y de codificación cromosómica. Al igual que las enterotoxinas actúa como un superantígeno provocando la extravasación de células endoteliales y a altas concentraciones tienen también efecto citotóxico. Su producción está directamente asociada al síndrome del shock tóxico, shock hipovolémico provocado por la gran extravasación de líquido endovascular. La expresión de esta toxina depende de condiciones ambientales especiales con una elevada presión parcial de CO₂. Estos requerimientos necesarios explican la poca prevalencia del síndrome de shock tóxico 0.5-10 por cada 100.000 pacientes con respecto al elevado número de aislados, cerca al 20%, de *Staphylococcus aureus* que son productores potenciales de TSST-1 al tener el gen pero no expresar la toxina.

d) Toxinas exfoliativas (ET)

Estas toxinas son serin-proteasas con actividad proteolítica y se unen a los glicolípidos de membrana específicos de tipo GM₄, que se encuentran únicamente en neonatos, destruyendo las uniones intraepiteliales (desmosomas) del estrato granuloso de la epidermis queratinizada (acción epidermolítica). No son citolíticas, no afectan a mucosas ni se asocian con ningún mecanismo proinflamatorio. Su acción produce el síndrome de la piel escaldada estafilocócica (SPEE), caracterizada por una dermatitis exfoliativa en neonatos. La prevalencia de estas

toxinas es baja, menor del 5% de los aislados de *Staphylococcus aureus* de muestras clínicas. Se conocen dos tipos de toxinas exfoliativas:

- ET-A: termoestable y localizada en cromosoma bacteriano.
- ET-B: termolábil y móvil al localizarse el gen en un plásmido.

1.3.5.5 *Biofilms*

Un *biofilm* puede definirse como una comunidad de microorganismo de vida sésil que están adheridos a un sustrato (inerte o tejido vivo) y embebidos en una matriz extracelular polimérica (biopelícula), cuya composición varía entre cepas, pero en general pueden contener factores del hospedador, polisacáridos, proteínas y/o DNA extracelular y que les confiere una alteración fenotípica caracterizada por un enlentecimiento del crecimiento, de la expresión de genes y de la producción proteica (102, 103).

Los *biofilms* se forman a partir de bacterias en su forma planctónica, diferentes condiciones ambientales inducen la síntesis de material extracelular que constituye el soporte del *biofilms* (figura 1.14). Existen tres etapas en la formación del *biofilms*.

- Una primera etapa de adhesión, donde las bacterias planctónica presentan una asociación en un principio débil mediada por componente habituales de la pared bacteriana de *Staphylococcus aureus* como autolisinas o los ácidos teicoicos que requieren ligandos hidrofóbico. Esta adhesión va madurando en su fortaleza hasta formarse enlaces covalentes mediada por las proteínas adhesión de la matriz extracelular de los tejidos (MRSRAMM), que se unen a proteínas de la matriz extracelular, que según el tejido puede estar formada por fibrinógeno, fibrina, colágeno fibronectina o laminina.
- En la segunda etapa se forma el *biofilm* propiamente dicho, donde las bacterias comienzan a secretar el exopolisacárido que constituye la matriz del *biofilms* y se agrupan formando en fases tempranas microcolonias. *Staphylococcus aureus* produce un *biofilm* multicapa embebido dentro de un glicocalix o *slime* con expresión

heterogénea de proteínas. En el inicio de su formación este glicocalix está compuesto principalmente por ácidos teicoicos en un 80%, los propios microorganismos y proteínas del huésped. Posteriormente se excreta un antígeno polisacárido intracelular (PIA), también conocido como poli-N-acetil-glucosamina (PNAG) compuesto por residuos D-glucosamina, fosfatos y ésteres de succinato y que posee una elevada carga positiva. El PIA es el principal responsable de la unión a superficies cargadas negativamente como superficies plásticas o matriz celular de las células humanas.

Aunque la mayoría de los *Staphylococcus aureus* son PIA dependientes, es decir, necesitan la presencia del *locus ica* para la formación de *biofilms*, algunas cepas pueden desarrollar *biofilms* por otras vías alternativas. De esta forma Fitzpatrick y col, encontraron cepas de *Staphylococcus aureus* con deleciones en el *locus ica* y que son capaces de desarrollar *biofilms*. Resulta interesante observar que cuando se categorizó estas cepas en función a su sensibilidad frente al antibiótico meticilina se observó que las cepas meticilin-resistentes (MRSA) fueron capaces de formar *biofilms* con estas deleciones, mientras que en las cepas meticilin-sensibles (MSSA) no se observó formación de *biofilms* (104).

También se han observado *biofilms* PIA independientes por acumulación de proteínas de la superficie bacteriana que reconocen las moléculas de adhesión de la matriz extracelular de los tejidos (MRSRAMM). *Staphylococcus epidermidis* desarrolla *biofilms* asociados a la producción de la proteína Aap (accumulation - associated protein) y algunas cepas de *Staphylococcus aureus* también pueden desarrollar *biofilms* con alto peso molecular asociados a la producción de la proteína Bap.

- En la última etapa, las bacterias embebidas en el *biofilm* adquieren nuevas características mediante un sistema de comunicación llamado *quorum-sensing* como resistencia a antibióticos o enlentecer el ritmo de crecimiento. En esta etapa también las bacterias pueden desprenderse del *biofilms* y volver a la vida planctónica para poder colonizar otras superficies, cerrando el ciclo de formación de *biofilms*.

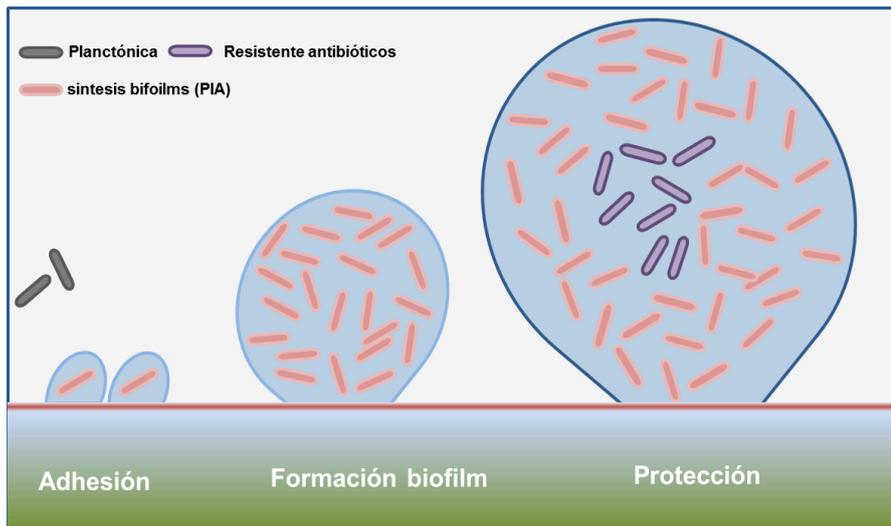


Figura 1.15 Proceso de formación de los *biofilms* bacterianos.

La vía de expresión y síntesis del antígeno PIA está regulada por un *locus* de adhesión intercelular llamado *ica*. Este *locus* está formado por cuatro genes de biosíntesis *icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD* y un quinto gen, *icaR*, que es un regulador negativo de *icaABCD*. La expresión de *icaABCD* está altamente regulada. Esta regulación se puede inducir *in vitro* cuando *Staphylococcus* se encuentra en condiciones de estrés, altas temperaturas, anaerobiosis, elevada osmolaridad, ambientes ricos en glucosa o en presencia de etanol. Pequeñas concentraciones de antibióticos como tetraciclinas, gentamicinas o estreptograminas pueden inducir también la producción de PIA (105).

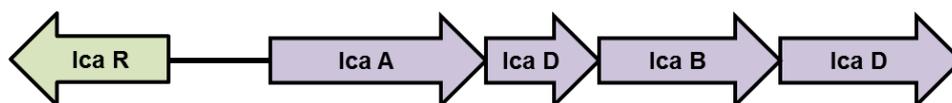


Figura 1.16. Organización de operón de la adhesina intercelular *ica ABCDC*.

IcaA e *icaD* actúan como un N-acetilglucotransferasa. Ica C es una proteína de membrana que permite transportar los oligómeros sintetizados por *icaAD* a través de la membrana bacteriana. La proteína IcaB se puede encontrar en la superficie bacteriana o secretada y su función es desacetilar a

PIA para cargar positivamente al polímero. Esta desacetilación es la promotora de la interacción de PIA con la superficie de las células hospedadoras que presenta carga negativa.

La regulación es compleja y pueden intervenir numerosos factores reguladores. Pueden mediar grandes factores reguladores como SarA y Agr que además afectan la regulación de muchos otros genes, o pequeños factores como IcaR y TCaR que regulan unos pocos genes.

IcaR

Es una proteína de 22 kDa aproximadamente que actúa como regulador transcripcional del operón *ica ABCD*. Su transcripción difiere de los otros genes del operón al tener diferentes puntos de iniciación. Conlon y col inactivaron la proteína IcaR de cepas clínicas de *S.epidermidis* que presentaban una estrecha capa de *biofilms* cuando las cultivaban *in vitro*. Tras la inactivación observaron un incremento en la expresión de *icaA*, demostrando que el gen *icaR* ejercía una función represora a la expresión de *ica ABCD* (106). Al igual que sucede en *S.epidermidis* IcaR actúa como regulador negativo en *S.aureus*. Jefferson y col demostraron que la proteína IcaR se une a una secuencia corta de la región intergénica *icaR-icaA* y que esta unión afecta a la expresión de *ica ABCDC*. Deleciones en el gen *icaR* aumentan la expresión de PIA entre 10-100 veces más que las cepas nativas (107, 108).

Familia proteica Sar

Esta familia está compuesta por más de 11 proteínas diferentes. La más estudiada es la proteína Sar A, que puede tener función activadora o represora de muchos genes de *S.aureus*, incluyendo genes asociados a su patogénesis. Entre ellos, se encuentra el *locus agr* (*accessory gene regulator*) que tiene un papel muy importante en la transición de síntesis de proteínas de membrana durante la fase exponencial de crecimiento a la síntesis de toxinas y proteínas degradativas de la fase estacionaria. El *locus agr* contiene dos promotores que producen dos transcritos, RNA II que codifica cuatro proteínas (*agrA*, *agrB*, *agrC* y *agrD*) que conforma el sistema de comunicación intercelular *quorum sensing system* y el transcrito RNA III que actúa como RNA regulador y que también codifica la δ -toxina.

La expresión de *agr* puede reducir la capacidad de *S.aureus* de formar *biofilms* no por inducir una reducción en la expresión de PIA sino por las propiedades surfactantes de la δ -toxina (109).

SarA es un inductor positivo del *locus agr* por lo que puede inhibir la formación de *biofilms*. No obstante, se ha observado en estudios con cepas mutantes en *SarA* que tienen una reducida capacidad de producir *biofilms*. Por lo que se postula que *SarA* afecta más por su acción inductora de expresión de proteinasas y nucleasas, que tienen un impacto negativo en la síntesis de *biofilms* por aumento de la expresión de *icaR*, que por su acción activadora de *agr* (110).

TcaR

TcaR (*Teicoplanin-associated locus regulator*) es un miembro de la familia de los factores de transcripción MarR y es un débil regulador negativo de *icaABCD*. No está claro cual es su mecanismo de regulación aunque parece indicar que su acción depende del sitio de unión a la región promotora de *ica* (111).

Operón SigB

σ^B es un factor sigma alternativo que tiene un rol muy importante en la respuesta a condiciones ambientales de estrés. En *S.aureus*, σ^B es activado por señales de transducción en respuesta a altas temperaturas, alta osmolaridad, antibióticos o pH extremos. El operón sigB mediante los genes *rsbUVW* regula la expresión de σ^B y este a su vez regula una gran cantidad de proteínas bacterianas implicadas en la patogénesis (β -hemolisina o enterotoxina B) o en la adhesión celular (*clumping factor*, coagulasas...). σ^B también interviene en la regulación del sistema *agr*. Estudio de Rachid y col revelaron que cepas de *S.aureus* deficientes en *sigB* no son capaces de formar *biofilms* y detectaron un aumento de RNAIII, factor anti- *biofilms* inducido por el sistema regulador *agr*. Sin embargo, otros estudios revelaron que mutantes de *sigB* si son capaces de formar *biofilms*. Estos conflictos sugieren que el operón *sigB* puede actuar de diferentes maneras en el control de la formación de *biofilms* (105, 112).

Los *Staphylococcus aureus* productores de *biofilms*, una vez que establecen la infección, tienen tendencia a progresar hacia enfermedades insidiosas, crónicas y con una elevada tasa de recurrencia. Por este motivo, en numerosas ocasiones están implicados como agentes etiológicos de procesos crónicos como osteomielitis, endocarditis, infecciones crónicas de heridas especialmente asociadas a pacientes diabéticos, periodontitis,...

Las bacterias formadoras de *biofilms* se caracterizan por su capacidad de resistencia a los mecanismos de defensa del hospedador, lo que se traduce en que la matriz del *biofilm* puede impedir el acceso de algunos tipos de células de defensa inmunitaria, como los macrófagos, que muestran una penetración incompleta sobre el *biofilm* y frustrando de este modo la fagocitosis (113). Además, las bacterias embebidas en el *biofilm* incrementan la tolerancia a los antibióticos.

A diferencia de lo que sucede en los mecanismos de resistencia a antibióticos heredables, la tolerancia antibiótica asociada a los *biofilms* es transitoria a esta fase en la que normalmente bacterias susceptibles entran en un metabolismo y fisiología alterada donde decrece su sensibilidad. Cuando estas células vuelven a estado planctónico, recupera su sensibilidad antibiótica normal. (114). Existen varias hipótesis que intentan explicar esta tolerancia antibiótica:

- El *biofilm* bloquea el acceso del antibiótico a la célula en crecimiento que está embebida en su interior. Este fenómeno depende de la capacidad de penetración del antibiótico al *biofilm*.
- La tolerancia antibiótica se debe al desarrollo de un estado fisiológico durmiente y persistente. A este descenso de actividad metabólica va unido de forma inherente una resistencia antibiótica (115).

Además, esta tolerancia antibiótica solo se presenta cuando las células se encuentran dentro del *biofilm*, lo que no permite ser detectada en el crecimiento planctónico de los cultivos *in vivo*.

Estas características de resistencia tanto al sistema inmune como a la antibioticoterapia hace que las infecciones asociadas al *biofilm* jueguen un papel importante en la progresión hacia enfermedades crónicas. Además, cabe destacar que el establecimiento de *biofilms*, es un foco de dispersión de células bacterianas, que les permite llegar a otros lugares e infectarlos, pudiendo producir infecciones agudas como la sepsis (116).

2. HIPÓTESIS

La Poliposis Nasal es una enfermedad inflamatoria cuya etiología es todavía desconocida y cuyas manifestaciones clínicas son insidiosas y recurrentes, que conllevan una gran dificultad en su manejo y tratamiento. Estudios publicados en los últimos años parecen indicar la existencia de una fisiopatología multifactorial para explicar estos procesos inflamatorios. Varios de estos factores fisiopatológicos parecen estar relacionados con procesos infecciosos, especialmente relacionados con la presencia de bacterias grampositivas de la especie *Staphylococcus aureus* y con su posibilidad de formar estructuras embebidas en una matriz extracelular (*biofilms*) y con la capacidad de sintetizar proteínas con función enterotoxigénica que actuarían como superantígenos desencadenando procesos inflamatorios eosinofílicos.

Este estudio pretende corroborar/avaluar las siguientes hipótesis de trabajo:

1. Existe una mayor prevalencia de *Staphylococcus aureus* productores de *biofilms* en los pacientes con poliposis nasal y especialmente en aquellos pacientes diagnosticados con Síndrome de ASA triada.
2. Los *Staphylococcus aureus* aislados en los pacientes diagnosticados de Poliposis nasal presentan un patrón de adhesinas y de genes enterotoxigénicos característico, que se correlacionaría con un aumento en la respuesta inmunitaria eosinofílica en el tejido rinosinusal.
3. Tanto la presencia de *Staphylococcus aureus* productores de *biofilms* como la capacidad de sintetizar enterotoxinas serían factores relacionados con la gravedad y las recidivas de los procesos de poliposis nasales.

3. OBJETIVOS

- 1- Conocer la implicación de *Staphylococcus aureus* en los pacientes con poliposis nasal y determinar los factores clínicos que puedan estar asociados, especialmente en aquellos diagnosticados con el Síndrome de ASA triada.
- 2- Caracterizar genóticamente los factores de virulencia asociados a la adhesión celular (adhesinas) presentes en los *Staphylococcus aureus* y determinar la capacidad de expresar una matriz extracelular para formar *biofilms*.
- 3- Caracterizar genóticamente los factores de virulencia asociados a la producción de superantígenos (enterotoxinas) de los *Staphylococcus aureus* aislados en los pacientes con poliposis nasales.
- 4- Comprobar si las características encontradas en los *Staphylococcus aureus* aislados en los pacientes con poliposis nasales, son particulares de dicho grupo.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO

4.1.1 Descripción.

El estudio realizado es de carácter observacional longitudinal prospectivo, con pacientes que acudieron a las Consultas Externas del Consorcio Hospital Universitario General de Valencia (CHGUV), con diagnóstico de rinosinusitis crónica con poliposis nasal, como grupo de estudio, y que cumplieran los criterios de inclusión del estudio. Como grupo control se incluyeron pacientes que no presentaban dicha patología. Además, como grupo control de cepas de *S.aureus* de población general se estudió el estado de portador nasal de *S.aureus* de pacientes que acudían a las Consultas Externas del CHGUV, excluyendo aquellos pacientes que habían tenido visita al servicio de Otorrinolaringología en el último año.

4.1.2 Ámbito

El ámbito del estudio fue las Consultas Externas del Servicio de Otorrinolaringología del Consorcio Hospital Universitario General de Valencia (CHGUV). El CHGUV es un Hospital de tercer nivel con 518 camas, englobado en el departamento 9 de la Comunidad Valenciana que presta atención sanitaria a una población de 372.325 habitantes. Los pacientes fueron seleccionados de la Consultas Externas del Servicio de Otorrinolaringología. A todos ellos se les informó del estudio y se solicitó su consentimiento de aceptación para ser incluidos en el mismo.

4.1.3 Duración

La duración del estudio fue de cuatro años. La selección de los pacientes se comenzó en Septiembre de 2010 y concluyó en Abril del 2012. La recogida de datos clínicos se hizo de forma retrospectiva tras la inclusión de los pacientes en el estudio y concluyó en Mayo de 2013. La recogida de datos de las muestras concluyó en Junio de 2014.

4.2 PACIENTES

El reclutamiento de los pacientes correspondientes al objetivo del estudio, se realizó de forma prospectiva y aleatoria, cumpliendo los criterios de inclusión del estudio, y tras comprobar la ausencia de algún criterio de exclusión.

4.2.1 Criterios de inclusión

El criterio de inclusión fueron pacientes mayores de edad con presencia de poliposis nasal grave que precisaban intervención quirúrgica para realizar una polipectomía mediante cirugía endoscópica (CENS) y estaban diagnosticados de Rinosinusitis Crónica, definida como la inflamación de nariz y senos paranasales que presentaban alguno de estos síntomas (3):

- Bloqueo/obstrucción/congestión nasal.
- Rinorrea (anterior/posterior/goteo nasal posterior).
 - Con o sin presión facial
 - Con o sin reducción o pérdida de olfato

y al menos alguno de los siguientes signos en la endoscopia nasal:

- Poliposis nasal.

Escala EVA: de 0 a 10 donde 0 corresponde a ninguna molestia y 10 a la peor molestia imaginable. Así, siguiendo los criterios de punto de corte propuestos por EP³OS 2007 (1), se puede obtener la siguiente clasificación:

- Enfermedad leve (0-3)
- Enfermedad moderada (>3-7)
- Enfermedad grave (>7-10)
- Rinorrea mucopurulenta principalmente en el meato.
- Edema u obstrucción en la mucosa del meato medio.
- Cambios en la mucosa que afectan al complejo osteomeatal y/o senos paranasales.

4.2.2 Criterios de exclusión

Se excluyeron del estudio aquellos pacientes que presentaban al menos una de las siguientes características:

- A. Presentaban una edad inferior a 14 años.
- B. Pacientes diagnosticados de alguna patología otorrinolaringológica no asociada a RSC.
 - Pólipo de Killian.
 - Pólipos esfenocoanales y etmoidocoanales.
 - Tumores nasosinusales.
 - Sinusitis fúngica alérgica.
- C. Pacientes que hubieran tenido un proceso infeccioso, bacteriológico, fúngico o vírico agudo en los últimos tres meses con afectación rinosinusal.
- D. Pacientes que hubiesen sido intervenidos quirúrgicamente debido a patologías otorrinolaringológicas en el último año.

El grupo control estuvo formado por pacientes diagnosticados de desviación de septum nasal, con indicación quirúrgica de septoplastia sin clínica rinítica.

4.3 DISEÑO

4.3.1 Protocolo de trabajo

La metodología que se siguió para detectar los casos de rinosinusitis crónica con poliposis nasal fue la siguiente:

- I. Se solicitó al Servicio de Otorrinolaringología el calendario de las intervenciones quirúrgicas para incluir las polipectomías mediante endoscopia nasal.

- II. Una vez obtenida la programación, mediante la consulta de la historia clínica, se seleccionaron solo aquellos casos que cumplieran los criterios de inclusión definidos en el estudio.
- III. Se realizó una base de datos de interés de diferentes variables que tras codificación previa, se almacenaron en soporte informático para su análisis posterior.

4.3.2 Variables analizadas

En este estudio se consideraron las siguientes variables para analizar:

4.3.2.1 Variables demográficas

En los datos demográficos de cada paciente se incluye la edad, sexo y el año en el que se le realizó el diagnóstico de rinosinusitis crónica.

4.3.2.2 Comorbilidad

- Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.
- Asma, enfermedad crónica del sistema respiratorio que se caracteriza por episodios recurrentes de disnea y sibilancias, por incremento en la respuesta broncoconstrictora del árbol bronquial.
- Alergias, respuesta de hipersensibilidad inmunológica a alguna partícula o sustancia, ya sea alimentos, polen, fármacos...
- Intolerancia a AINES, basado en una adecuada historia clínica de reacciones frente a dos o más AINES de diferentes grupos químicos y/o una prueba de provocación con AAS.
- Factores inmunosupresión, exceptuando uso de tratamiento corticoideo.
- Diabetes *mellitus*. Hiperglucemia mantenida (glucemia en ayunas mayor de 126 mg/dl) y necesidad de tratamiento con insulina o antidiabéticos orales.
- Hipertensión arterial, elevación persistente de las cifras de tensión arterial superiores a PD>140 ml/Hg y/o PS >90ml/Hg.
- Enfermedad renal, antecedentes de enfermedad renal crónica o pacientes con valores alterados de urea o creatinina documentados en historia clínica.

- Hepatopatía crónica, de origen tóxico, viral o por consumo de alcohol, incluyendo grado de cirrosis en el caso de que se haya realizado biopsia hepática.
- Enfermedad neoplásica.
- Antecedentes de cardiopatía, valvulopatía o insuficiencia cardiaca.

Atendiendo a los factores de comorbilidad de asma, intolerancia a AINES se clasificaran los pacientes en tres grupos clínicos:

1. Poliposis nasal aislada.
2. Poliposis nasal más asma.
3. Poliposis nasal con asma e intolerancia a AINES (grupo ASA triada).

4.3.2.3 Hábitos tóxicos

Las variables recogidas se definieron como variables cualitativas.

- Hábito tabáquico: considerando persona fumadora aquella que consumo cualquier cantidad de cigarrillos diariamente durante al menos un mes (definición OMS).
- Consumidor de drogas no legales por vía parenteral (UDVP).
- Hábito enólico: definiéndolo como persona que ingiere habitual.
- Exfumador: persona que habiendo tenido hábito tabáquico lleva al menos un año sin consumir ningún tipo de tabaco.

4.3.2.4 Manifestaciones clínicas

a. Signos y síntomas

Los síntomas evaluados atendiendo tanto a la duración como a su intensidad fueron dolor, estornudos, sensación de presión facial, rinorrea, reducción o pérdida de capacidad olfativa y congestión nasal. Y los signos recopilados fueron obstrucción u ocupación de espacio nasosinusal por técnicas endoscópicas y/o técnicas de imagen como la Tomografía Axial Computerizada (TAC).

b. Grado de Poliposis

Para la evaluación del grado endoscópico de poliposis nasal se utilizó la clasificación de Lildholdt (tabla 4.1), que utiliza un estadiaje en 4 niveles. Esta escala deriva de un estudio realizado en 1995 en el que se hizo un seguimiento durante 2 años a 126 pacientes diagnosticados de poliposis nasal para evaluar la eficacia del tratamiento con glucocorticoides (budesónida y netametasona) (117).

Grado 0	Ausencia de pólipo
Grado 1	Poliposis leve que no alcanza el borde superior del cornete inferior
Grado 2	Poliposis moderada que alcanza la región situada entre los bordes superior e inferior del cornete inferior.
Grado 3	Poliposis grave, que sobrepasa el borde inferior del cornete inferior.

Tabla 4.1. Clasificación de la poliposis nasal según endoscopia nasal (Escala de Lildholdt y cols.).

En el subgrupo de pacientes con síndrome de ASA triada se utilizaron las imágenes obtenidas de la Tomografía Axial Computerizada para estratificar el grado de ocupación de la cavidad sinusal. Se utilizó la escala Lund y Mackay (tabla 4.2), descrita en 1993 para evaluar ocupación de espacio de la cavidad sinusal y recomendado su uso en 1997 por la American Academy of Otolaryngology Head and Neck Surgery por ser un método simple, de fácil aplicación y reproducibilidad (118).

Seno afectado	Izquierda	Derecha
Maxilar	0-1-2	0-1-2
Etmoides anterior	0-1-2	0-1-2
Etmoides posterior	0-1-2	0-1-2
Esfenoides	0-1-2	0-1-2
Frontal	0-1-2	0-1-2
Complejo osteomeatal	0 o 2	0 o 2
Total	De 0 a 12	De 0 a 12

0= sin ocupación, 1=ocupación parcial; 2=ocupación completa. *0=libre; 2=ocupado

Tabla 4.2 Evaluación de la poliposis nasal según Tomografía Computerizada (Escala Lund y Mackay)

4.3.2.5 Tratamiento con fármacos previos

Se realizó un estudio detallado del tratamiento farmacológico recibido desde el diagnóstico de rinosinusitis crónica con poliposis nasal. Para ello, se revisó la historia clínica y se recogieron los datos relacionados con farmacológica recibida especialmente de dos grupos de fármacos habitualmente empleados en el tratamiento de las rinosinusitis crónica con poliposis nasal:

A. Corticoesteroides

Tratamiento de primera elección para el tratamiento de las rinosinusitis crónica. Su utilización puede ser:

- Vía tópica (Corticoides tópicos nasales): budesónida, beclometasona, furoatos, mometasona. Se recogieron las variables de duración del mantenimiento del tratamiento (semanas) y número episodios o tandas de tratamiento desde el diagnóstico.
- Vía sistémica (Corticoides orales: prednisolona el deflazacort). Se recogieron las variables de duración del mantenimiento del tratamiento (días) y número episodios o tandas de tratamiento desde el diagnóstico.

B. Antibioticoterapia

A su vez, en la revisión de la historia clínica se recogieron los datos de la administración de algún tratamiento antibiótico como elección terapéutica se la rinosinusitis crónica. En caso de haberse recibido se detalló el grupo al que pertenece el antibiótico empleado y su duración.

4.3.2.6 Cirugía endoscópica

Se realizó una revisión de la historia clínica para recoger el número de episodios de cirugía endoscópica nasosinusal para cirugía endoscópica nasal (CENS) que había recibido cada paciente antes de su inclusión en el estudio.

4.4 MÉTODOS

4.4.1 Técnica de obtención de muestras

Se obtuvieron muestras de pólipos nasales de todos los pacientes, diagnosticados de rinosinusitis crónica con poliposis nasal incluidos en el estudio que cumplieran los criterios de inclusión. El material se obtuvo durante la intervención quirúrgica (cirugía endoscópica nasal), en los quirófanos de Especialidades del CHGUV previa presentación del consentimiento informado.

El material biopsiado se fraccionó en tres fragmentos (tamaño mínimo 1 x 1 cm), que se depositaron en contenedores de plástico de 25 c.c. dos fragmentos en un contenedor que contenía 10 ml de agua destilada, para su estudio microbiológico, y un fragmento en un contenedor con formaldehído al 10% para estudio histológico. El transporte del material se realizó de manera inmediata para su procesamiento. En los casos en los que no fue posible su transporte se conservó a 4°C durante un máximo de 48h.

4.4.2 Estudio histológico con microscopio óptico

1. Fijación: mediante formaldehído al 10% en agua destilada.
2. Tallado: Inclusión de la muestra en parafina.
3. Cortado con microtomo en secciones de 5µm.
4. Desparafinación con baños seriados de xilol a distinta concentración. Y tinción con hematoxilina-eosina.
5. Visualización en microscopio óptico Nikon Eclipse E200.
6. Recuento del infiltrado eosinófilo a 400X.

Se realizó el recuento medio del número de eosinófilos por campo, y se recogió el porcentaje de eosinófilos con respecto al total de células inflamatorias por campo (dos observadores distintos):

- Ninguno o escaso <10%.
- Leve 10-30%.
- Moderado 30-60%.
- Elevado >60%.

4.4.3 Estudio microbiológico

4.4.3.1 Detección *in vivo* de microorganismos productores de *biofilms*

Para ello se utilizó un microscopio confocal (CLSM) y la solución *BacLight Live/Dead* kit (Invitrogen). Las muestras de senos nasales se procesaron, tras tres lavados con agua estéril para eliminar restos de bacterias planctónicas. Se utilizó el kit LIVE/DEAD (Invitrogen, Molecular Probes), según las instrucciones del fabricante, donde se combina dos componentes; A (*Syto 9 green fluorescens nucleic acid stain*) que colorea de verde a células vivas) y B (*Propidium iodide*) que colorea de rojo a células dañadas o muertas). Posteriormente se realizó el análisis por Microscopía Laser Confocal (Confocal Nikon C1+) a 40X, para detectar la presencia de estructuras compatibles con *biofilms* bacterianos. El *biofilm* se caracteriza por presentar una intensa fluorescencia de bacterias vivas (color verde) organizadas en cluster o torres (79).

El criterio de presencia de *biofilms* viene determinado por la visualización de bacterias inmóviles, con unión irreversible al tejido, vivas de tamaño 0,5-2 μm y con una morfología característica (*clusters* y torres de microcolonias).

4.4.3.2 Detección por PCR Real-Time de *S.aureus* y MRSA de biopsia

Se utilizó el sistema de diagnóstico molecular BDMAXTM (Becton Dickinson[®]), que automatiza la lisis celular, extracción de ácidos nucleicos, preparación de PCR, amplificación y detección de dianas moleculares a estudio mediante sondas.



Figura 4.1 Plataforma automatizada BDMAXTM

En este estudio se utilizó el ensayo comercializado BD MAX™ StaphSR, que permite detectar sobre muestra directa, en la misma reacción, *Staphylococcus aureus* Sensibles a Meticilina (SASM) y *Staphylococcus aureus* Resistentes a Meticilina (MRSA). Los componentes proporcionados por el fabricante son los siguientes:

A. BD MAX™ StaphSR Master Mix (Mezcla maestra)

Mezcla maestra deshidratada para PCR que contiene la enzima polimerasa, nucleótidos, sondas moleculares y cebadores específicos junto con una sonda molecular específica para el control de procesamiento de muestras.

B. BD MAX™ StaphSR Reagent Strip (Tiras de Reacción)

Tira de reactivos individuales que contiene todos los reactivos líquidos y las puntas de pipeta desechables que se necesitan para el procesamiento de las muestras y la extracción del ADN.

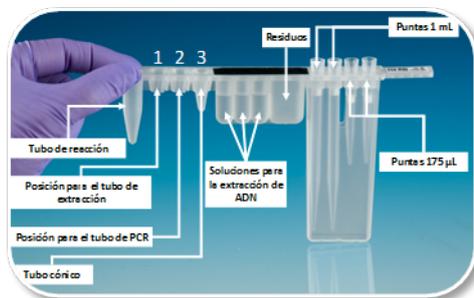


Figura 4.2. Tira de reacción BD MAX™

C. BD MAX™ StaphSR Extraction Tube (Tubo de extracción)

Reactivo de extracción deshidratado que contiene microesferas de afinidad magnética al ADN, acromopeptidasa y control de procesamiento de muestras.

D. BD MAX™ StaphSR Sample Buffer Tube (Tubo de tampón de muestras)

Contenedor donde se introduce la muestra a estudio. Permite tamponar el pH de la muestra y favorece que el proceso de extracción del DNA con las microesferas magnéticas sea el adecuado.

E. BD MAX™ PCR Cartridge

Soporte donde se realiza las reacciones de amplificación y detección.



Figura 4.3. BD MAX™ PCR Cartridge.

Tras la impronta de la muestra para su cultivo, se fraccionó en dos partes, una porción para el estudio en BHI y otra porción se homogeneizó con 200µl de agua destilada. Posteriormente se recogió con torunda de algodón y se introdujo en el Sample Buffer Tube se vorteoó tres veces durante 5 seg.

A continuación, se realizó la PCR Real-Time en la plataforma BD MAX™ siguiendo las instrucciones del fabricante.

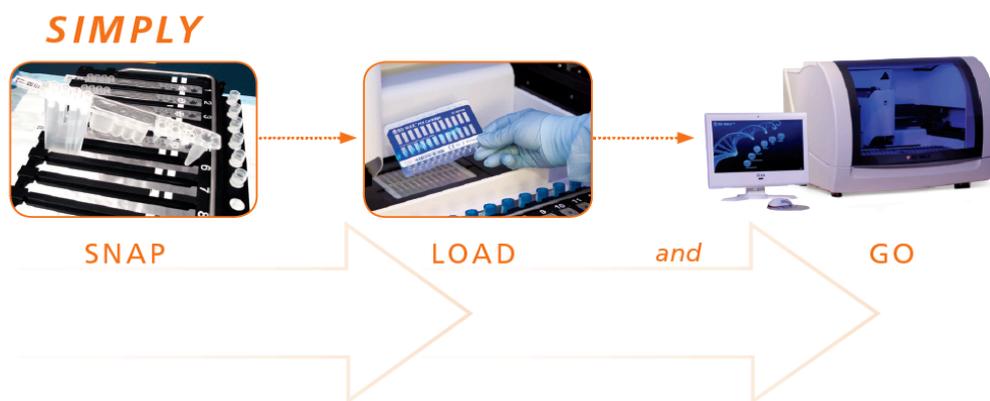


Figura 4.4 Proceso de trabajo de la plataforma automatizada BD MAX™. 1.- introducción de los reactivos en la *Reagent Strip*. 2.- Introducción de la tarjeta de soporte. 3.- Puesta en marcha de la plataforma y posterior lectura de los resultados.

4.4.3.3 Estudio Microbiológico Convencional

A. Cultivo microbiológico

Antes de cultivar la muestra se realizaron dos lavados sucesivos con suero fisiológico de la misma. Seguidamente, se realizó el cultivo bacteriológico mediante siembra por impronta en medios Agar Chocolate (Becton Dickinson), Agar Sangre (Becton Dickinson). Se fraccionó la muestra en dos partes y una porción se introdujo en medio de enriquecimiento Brain Heart Infusión (BHI) (Becton Dickinson). Se incubaron las placas de cultivo en atmosfera enriquecida al 5% de CO² a temperatura de 37°C, durante 48h. El medio de enriquecimiento permaneció en incubación hasta 7 días a 37°C. En caso de que se observó turbidez en el medio BHI se realizó un subcultivo, sembrándose mediante técnica de triple estría, con asa de siembra de 10µl, en medio Agar Chocolate y Agar Sangre, y se reincubó durante 24h en atmosfera enriquecida al 5% de CO² a 37°C.

B. Identificación del microorganismo.

Para la identificación de las colonias observadas en los medios de cultivo empleados se realizó una Tinción de Gram y posterior identificación preliminar mediante espectrometría de masas, MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight*) (figura 4.5), que permite comparar el espectro de masas proteico de la colonia de microorganismos problema, con una base de referencia, Maldi BioTyper[®] MicroFlex LT Bruker BD, obteniendo una identificación a nivel de especie con una elevada especificidad.



Figura 4.5. MALDI-TOF (*matriz assisted laser desorption ionization time-of-flight*).

C. Estudio de Sensibilidad. Antibiograma

Para el estudio de sensibilidad se utilizó el sistema automatizado Microscan Walkaway (Siemens®) (figura 4.6) que permitió desde un soporte de plástico con 96 micropocillos realizar la identificación bacteriana y un estudio de sensibilidad antibiótica por microdilución en caldo, que calculó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del antibiótico a la cual la bacteria no puede multiplicarse. Las CMI observada se interpretaron siguiendo las guías internacionales *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI) para obtener una interpretación categórica de sensible, intermedio o resistente.



Figura 4.6. Autoanizador Microscan Walkaway.

4.4.3.4 Caracterización fenotípica de la producción de *slime*.

A. Ensayo cualitativo de producción de *biofilms*

La detección cualitativa de *S.aureus* productores de *biofilms* se estudió mediante la utilización del medio Agar Rojo Congo Modificado (CRCM) descrito por Freeman y col. en 1989 (119), y modificado posteriormente por Mariana y col. Los componentes del Agar Rojo Congo Modificado utilizado se detallan en la tabla 4.3.

Componente	Cantidad
Rojo Congo (Sigma)	0,4 g.
Glucosa (Sigma)	10 g.
Agar Sangre Base-2 (BAB-2) (Sigma)	40 g.
Agua destilada (Braun)	1000 ml.

Tabla 4.3. Componentes del medio Agar Rojo Congo Modificado.

Se sembraron las cepas a estudio en medio CRCM mediante siembra por triple estría, con asa de siembra de 10 μ l, y se incubaron las placas en atmosfera aeróbica durante 48h a 37°C. El estudio de cada cepa se realizó por duplicado. Como cepas de referencia del ensayo se utilizaron cepas de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), control positivo la cepa productora de *biofilms* CECT 435, ATCC 25923 *Staphylococcus aureus* subespecie *aureus* (Rosenbach 1884) y control negativo la cepa no productora de *biofilms* CECT 231, ATCC 12228 *Staphylococcus epidermidis* (Winslow and Winslow 1908).

Se consideraron cepas productoras de *biofilms* aquellas que produjeron colonias de color negro intenso o suave, mientras que las colonias de color rojo bourdeos se clasificaron como cepas no productoras de *biofilms* (figura 4.7).

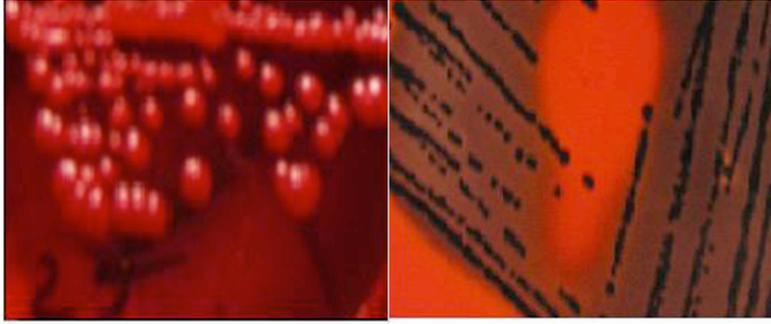


Figura 4.7. Agar Rojo Congo. Colonias rojas corresponden a cepas no productoras de *biofilms* y colonias negras a cepas productoras de *biofilms*.

B. Ensayo Cuantitativo de producción de *biofilms*

El estudio cuantitativo de producción fenotípica de *biofilms* se determinó usando un ensayo semicuantitativo de adherencia descrito por Stepanovic y col (120).

Las cepas a estudio se cultivaron toda la noche en medio Tryptic Soy Broth (TSB) (Becton Dickinson[®]), suplementado con 2% glucosa (Sigma-Aldrich[®]) a 37°C. Se transfirieron 200µl de suspensión celular a una placa de microtiters de 96 pocillos. El estudio se realizó dos veces y por triplicado con cada cepa. Se utilizaron dos pocillos unicamente con medio TSB como control negativo del ensayo. La placa fue incubada en atmosfera aeróbica a 37°C durante 24h. La placa microtiters fue lavada tres veces con buffers fosfato salino (PBS) para eliminar las células no adheridas a la placa. Posteriormente se fijaron las células adheridas al material con 500µl de etanol al 95% en cada pocillo durante 20 minutos, después se eliminó el etanol sobrante y se dejó secar durante toda la noche. Las bacterias adheridas se tiñeron con cristal violeta al 1% durante 5 minutos. La placa se lavó tres veces con agua estéril y se dejó secar. Se realizó una lectura de densidad óptica de cada pocillo a 570 nm (OD₅₇₀) usando un lector automatizado VICTOR³ PerkinElmer[®].

Para la interpretación de la lectura de absorbancia obtenida en el ensayo se siguió la escala utilizada por Mack y col. (121).

Lectura OD	Interpretación
OD ₅₇₀ >1	Fuerte adherencia
0,1 < OD ₅₇₀ < 1	Débil adherencia
OD ₅₇₀ < 0,1	No adherencia

Tabla 4.4. Interpretación de absorbancia según escala de Marck y col.

4.4.3.5 Caracterización genotípica de genes involucrados en la producción de *biofilms*.

La extracción del DNA de los aislados se realizó tras incubación previa de la cepa de *S.aureus* a estudio en medios Agar sangre durante 24h a 37°C en atmósfera aeróbica. Posteriormente, se resuspendieron 1 ó 2 colonias aisladas en 500 ml de agua libre de RNAsas para obtener una suspensión 1,5 McFarland. Y se realizó la extracción del DNA bacteriano utilizando el extractor MagNa Pure Compact Instrument (Roche®) siguiendo las instrucciones del fabricante y obteniendo un eluido final de 100µl.

Las reacciones de amplificación por PCR estuvieron compuestas por 12,5 µl GoTaq® Hot Green Master Mix (Promega®) que contenía 400µM de cada dNTP, 3mM de MgCl₂, 10 pmoles de cada primer (invitrogen®), 3µl del DNA de la cepa en estudio y agua para Biología Molecular libre de RNAsas y proteasas (Fisher Scientific) hasta completar un volumen total de 25 µl por cada reacción. Se realizó la mezcla en *ependorfs* de 0,2ml (Thermo Scientific®), y para la reacción de amplificación se utilizó el termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem®) tabla 4.6.

Gen	Primer	Secuencia Nucleotídica (5'-3')	Frag. amplificado	Reference
<i>ica A</i>	icaA-F	ACA CTT GCT GGC GCA GTC AA	188bp	Arciola ⁽¹²²⁾
	icaA-R	TCT GGA ACC AAC ATC CAA CA		
<i>ica D</i>	icaD-F	ATG GTC AAG CCC AGA CAG AG	191bp	Arciola ⁽¹²²⁾
	icaD-R	AGT ATT TTC AAT GTT TAA AGC AA		

Tabla 4.5 Secuencia de *primers* y tamaño del fragmento amplificado utilizados en el estudio.

Etapa	Ica A / Ica D
Desnaturalización Inicial	94°C 2 min
Desnaturalización	94°C 1 min
Anillamiento	55°C 1 min
Elongación	72°C 1 min
Elongación Final	72°C 7 min
Ciclos	25

Tabla 4.6. Parámetros de amplificación de la PCR.

Se utilizaron 5µl del producto amplificado de cada reacción para ser analizados mediante electroforesis durante 45 minutos a 100 V Power PAC300 (Bio-Rad®) utilizando un gel de agarosa ultrapura (UltraPure™ Agarose Invitrogen®) al 2% en Tris-Borato-EDTA (TBE) (Roche®) al que se le añadió 3µl de una solución 10mg/ml de Bromuro de Etidio (Sigma). Se usó el marcador de DNA molecular con escala de 100pb DirectLoad™ (Sigma-Aldrich®) como patrón para determinar el tamaño del fragmento de DNA amplificado.

4.4.3.6 Caracterización genotípica de genes involucrados en la adhesión bacteriana.

Se realizó la detección genotípica de diez genes que codifican proteínas involucradas en la adhesión bacteriana a las células del hospedador. Estas adhesinas pertenecen a un único complejo proteico denominado “*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules* (MSCRAMMs). En la Tabla 4.7, se detalla los genes que se estudiaron y los *primers* utilizados y en la tabla 4.8 las condiciones de amplificación.

Gen	Primer	Secuencia Nucleotídica (5'-3')	Amplicón	Referencia
<i>bap</i>	bap-F	CC TAT ATC GAA GGT GTA GAA TTG	971bp	Cucarella ⁽¹²³⁾
	bap-R	GCT GTT GAA GTT AAT ACT GTA CCT GC		
<i>bbp</i>	bbp-F	AAC TAC ATC TAG TAC TCA ACA ACA G	575 bp	Tristan ⁽¹²⁴⁾
	bbp-R	ATG TGC TTG AAT AAC ACC ATC ATC T		
<i>cna</i>	cna-F	GTC AAG CAG TTA TTA ACA CCA GAC	423bp	Tristan ⁽¹²⁴⁾
	cna-R	AAT CAG TAA TTG CAC TTT GTC CAC TG		
<i>ebpS</i>	ebpS-F	CAT CCA GAA CCA ATC GAA GAC	186bp	Tristan ⁽¹²⁴⁾
	ebpS-R	CTT AAC AGT TAC ATC ATC ATG TTT ATC TTT G		
<i>eno</i>	eno-F	ACG TGC AGC AGC TGA CT	302bp	Tristan ⁽¹²⁴⁾
	eno-R	CAA CAG CAT YCT TCA GTA CCT TC		
<i>fnbA</i>	fnbA-F	GTG AAG TTT TAG AAG GTG GAA AGA TTA G	643 bp	Tristan ⁽¹²⁴⁾
	fnbA-R	GCT CTT GTA AGA CCA TTT TTC TTC AC		
<i>fnbB</i>	fnbB-F	GTA ACA GCT AAT GGT CGA ATT GAT ACT	524bp	Tristan ⁽¹²⁴⁾
	fnbB-R	CAA GTT CGA TAG GAG TAC TAT GTT C		
<i>fib</i>	fib-F	CTA CAA CTA CAA TTG CCG TCA ACA G	404bp	Tristan ⁽¹²⁴⁾
	fib-R	GCT CTT GTA AGA CCA TTT TCT TCA C		
<i>clfA</i>	clfA-F	ATT GGC GTG GCT TCA GTG CT	292bp	Tristan ⁽¹²⁴⁾
	clfA-R	CGT TTC TTC CGT AGT TGC ATT TG		
<i>clfB</i>	clfB-F	ACA TCA GTA ATA GTA GGG GGC AAC	205bp	Tristan ⁽¹²⁴⁾
	clfB-R	TTG GCA CTG TTT GTG TTT GCA C		

Tabla 4.7. Secuencia de *primers* y tamaño del fragmento amplificado de genes MSCRAMMs.

Etapa	MRSCRAMMs
Desnaturalización Inicial	94°C 3 min
Desnaturalización	94°C 30seg
Anillamiento	55°C 45 seg
Elongación	72°C 45 seg
Elongación Final	72°C 5 min
Ciclos	30

Tabla 4.8 Parámetros de amplificación de la PCR de genes MSCRAMMs.

4.4.3.7 Caracterización genotípica de endotoxinas estafilococicas

Para la detección de las principales enterotoxinas que pueden encontrarse en las *S.aureus*, se utilizaron los *primers* y las condiciones de amplificación que se detallan en la tabla 4.9 y tabla 4.10.

Gen	Primer	Secuencia Nucleotídica (5'-3')	Amplicón	Referencia
<i>sea</i>	sea-F	CCT TTG GAA ACG GTT AAA ACG	127bp	Becker ⁽¹²⁵⁾
	sea-R	TCT GAA CCT TCC CAT CAA AAA C		
<i>seb</i>	seb-F	TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG	477bp	Becker ⁽¹²⁵⁾
	seb-R	GCA GGT ACT CTA TAA GTG CCT GC		
<i>sec</i>	sec-F	CTC AAG AAC TAG ACA TAA AAG CTA GG	271bp	Becker ⁽¹²⁵⁾
	sec-R	TCA AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC		
<i>sed</i>	sed-F	CTA GTT TGG TAA TAT CTC CTT TAA ACG	319bp	Becker ⁽¹²⁵⁾
	sed-R	TTA ATG CTA TAT CTT ATA GGG TAA ACA TC		
<i>sem</i>	sem-F	CTA TTA ATC TTT GGG TTA ATG GAG AAC	300bp	Jarraud ⁽¹²⁶⁾
	sem-R	TTC AGT TTC GAC AGT TTT GTT GTC AT		
<i>seo</i>	seo-F	AGT TTG TGT AAG AAG TCA AGT GTA GA	180bp	Jarraud ⁽¹²⁶⁾
	seo-R	ATC TTT AAA TTC AGC AGA TAT TCC ATC TAA C		
<i>tsst-1</i>	tsst-F	ACC CCT GTT CCC TTA TCA TC	326bp	Mehrotra ⁽¹²⁷⁾
	tsst-R	TTT TCA GTA TTT GTA ACG CC		

Tabla 4.9 Secuencia de *primers* y tamaño del fragmento amplificado de genes de enterotoxinas de *Staphylococcus aureus*.

Las amplificaciones por PCR estuvieron compuestas por 12,5 µl GoTaq® Green Master Mix (Promega) que contiene 400µM de cada dNTP, 3mM de MgCl₂, 10 pmoles de cada primer (invitrogen), 3µl del DNA de la cepa en estudio y agua estéril ultrapura hasta completar un volumen total de 25 µl por cada reacción.

Etapa	sea-d/tsst-1	sem/seo
Desnaturalización Inicial	94°C 5 min	94°C 5 min
Desnaturalización	94°C 2 min	94°C 5 min
Anillamiento	55°C 2 min	62°C 1 min
Elongación	72°C 1 min	72°C 1 min
Extensión elongación	72°C 7 min	72°C 7 min
Ciclos	35	

Tabla 4.10 Parámetros de amplificación de la PCR para detección de enterotoxinas.

Se utilizaron 5µl del producto amplificado de cada reacción para ser analizado mediante electroforesis durante 45 minutos a 100 V (Power PAC300 Bio-Rad)_utilizando un gel de agarosa ultrapura (UltraPure™ Agarose Invitrogen) al 2% en Tris-Borato-EDTA (TBE) (Roche) al que se le añadió 3µl de una solución 10mg/ml de Bromuro de Etidio (Sigma). Se usó el marcador de DNA molecular con escala de 100pb (DirectLoad™ Sigma-Aldrich) como patrón para determinar el tamaño del fragmento de DNA amplificado.

4.5 Aspectos éticos

Se garantizó la privacidad de los datos de los pacientes codificando los nombres y números de historia hospitalaria. Los datos codificados se introdujeron en una base de datos informática, cuyo manejo fue exclusivo del investigador. El investigador es responsable de la custodia y confidencialidad de los mismos.

El estudio fue aprobado por el comité ético del CHGUV.

4.6 Análisis estadístico.

Los datos descriptivos de cada variable se presentan en números absolutos o en porcentajes. Además se ha realizado el cálculo de la media, varianza y desviación típica en las variables continuas y las proporciones en porcentajes en las variables cualitativas.

Para facilitar la interpretación de los resultados obtenidos se agruparon por categorías las variables cuantitativas; grado de poliposis según la escala Lung y Mackay, eosinofilia tisular y densidad óptica en el ensayo cuantitativo de producción de *biofilms*.

Previo cálculo de los estadísticos de asociación, se ha verificado la hipótesis de que la variable edad cumple criterios de normalidad mediante el test de Kolmogorov-Smirnof y Test Shapiro. La homogeneidad de la variable sexo entre grupos clínicos se realizó mediante una tabla de contingencia y

cálculo de Chi-cuadrado de Pearson (χ^2). Para dar mayor consistencia a los cálculos estadísticos se agruparon los grupos clínicos 1 (PN aislada) y 2 (PN con asma).

Para los análisis univariantes entre dos variables categóricas se realizaron tablas de contingencia con el cálculo de las frecuencias de ocurrencia y posterior estudio del estadístico de independencia de Chi-cuadrado de Pearson (χ^2). Para establecer los factores potencialmente asociados de la morbilidad de la poliposis nasal mediante años de evolución (variable dependiente) y las distintas variables estudiadas se realizaron análisis multivariantes por regresión lineal mediante el análisis de la varianza (ANOVA). Posteriormente se realizó un análisis multivariante por regresión logística mediante la función LOGIT para el estudio de factores dependientes de la detección de *Staphylococcus aureus*. Así mismo para el establecimiento de medida de asociación se realizó el cálculo del Odds Ratio, como medida de probabilidad de que el hecho ocurra con un nivel de confianza del 95% (IC 95%).

El manejo de datos estadístico y su almacenamiento se realizó mediante el programa estadístico el SPSS 19.0v. El grado de significación estadística aceptado para cada tipo de análisis fue de p -valor inferior a 0,05.

5. RESULTADOS

5.1 Análisis de la población.

5.1.1 Datos demográficos.

Se incluyeron en el estudio 55 pacientes diagnosticados de rinosinusitis crónica con poliposis nasal. La edad media de los pacientes fue de 55,3 años con un rango de 25-79 años y una desviación típica de 12,54. Destaca la acumulación de casos en el intervalo de edad comprendido entre 60 y 65 años. La distribución por edades se muestra en la figura 5.1.

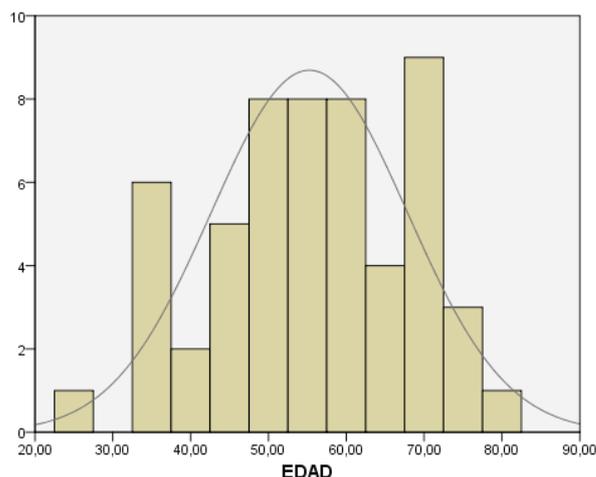


Figura 5.1 Distribución de la frecuencia por edad del grupo de estudio.

El grupo control estuvo formado por 20 pacientes cuya edad media se situó en 25,25 años con valores comprendidos entre los 3 y los 53 años. La desviación típica de este grupo control fue de 19,00. Once pacientes fueron intervenidos quirúrgicamente por septorinoplastia y 9 por adenoidectomía.

Con respecto a la distribución por género, el grupo de poliposis nasal estuvo formado por 34 hombres y 21 mujeres, lo que supone un porcentaje de 61,1% y 38,2% respectivamente. El grupo control se compuso de 3 mujeres (15%) y 17 hombres (85%).

5.1.2 Datos comorbilidad

- En la mayoría de los pacientes (51) se halló algún factor de comorbilidad, lo que representa el 92,7% (tabla 5.1).

Comorbilidad	N (%)
Asma	37 (67,2)
Intolerancia a AINES	28 (50,1)
Hipertensión arterial (HTA)	26 (47,2)
Alergias (polen, alimentos, antibióticos...)	19 (34,5)
Dislipemia	17 (30,9)
Insuficiencia cardiaca	9 (16,3)
Diabetes <i>mellitus</i>	6 (10,9)
EPOC	3 (5,4)
Hepatitis	2 (3,6)
Insuficiencia renal	1 (1,8%)

Tabla 5.1 Factores de comorbilidad en la población con RSCcPN estudiada.

La patología asociada a la enfermedad de RSCcPN más frecuente fue el asma, que afectó 37 pacientes (67,2%). En la mitad de los pacientes (28) se identificó intolerancia a ácido acetilsalicílico (AINES), lo que representa el segundo factor de comorbilidad más frecuente, con un 50,1%. Se detectaron antecedentes de hipertensión arterial en 26 pacientes (47,2%). En 19 (34,5%) se identificó algún tipo de alergia o intolerancia, siendo la más frecuente la alergia al polen de la parietaria, planta de la familia *Urticaceae*, seguida de la alergia a algún tipo de medicamento, como antibióticos, y la alergia a los ácaros, ambos con 5 pacientes (9%). La presencia de dislipemia se observó en 17 pacientes (30,9%), mientras que la insuficiencia cardiaca se detectó en 9 pacientes (16,3%). Seis pacientes sufrían diabetes *mellitus* tipo 2 (10,9%) y en 3 pacientes (5,4%) enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Por último, en 2 pacientes se observó inflamación hepática crónica por el virus de la hepatitis B y un paciente presentó insuficiencia renal (1,8%).

Atendiendo a estos datos de factores de comorbilidad asociados a la poliposis nasal se clasificaron los pacientes según los grupos clínicos descritos (figura 5.2).

- Grupo 1 Poliposis nasal aislada 16 pacientes (29,1%).
- Grupo 2 Poliposis nasal con asma 11 pacientes (20%).
- Grupo 3 Poliposis nasal con ASA triada. 28 pacientes (50,9%).

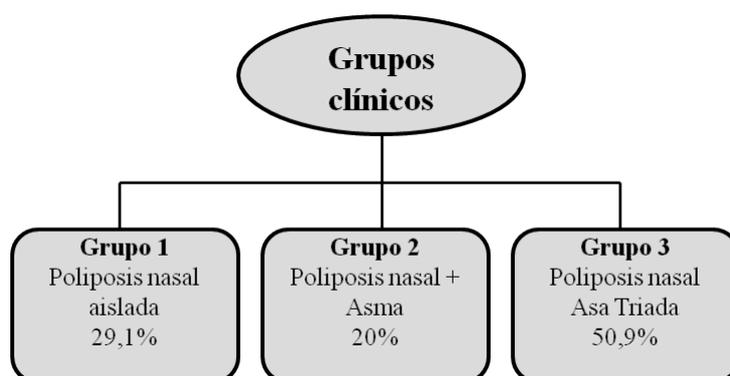


Figura 5.2 Clasificación de los pacientes según grupos clínicos.

Se observó que el 50,9% de los pacientes presentaban asma asociado a intolerancia a AINES, síndrome de ASA triada. El resto de pacientes (27) se distribuyeron en los siguientes grupos, poliposis nasal aislada (29,1%) y poliposis asociada a asma (20%).

La distribución por edades de los distintos grupos clínicos se representa en la figura 5.3.

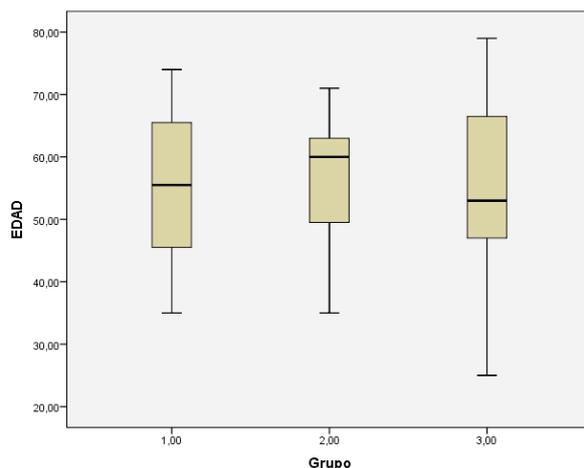


Figura 5.3 Distribución por edades de los grupos clínicos.

5.1.3 Hábitos tóxicos.

La mayoría de los pacientes a estudio con poliposis nasal refirieron no ser fumadores (72,2%), mientras que 11 pacientes fueron exfumadores (20%) y únicamente 4 pacientes tenían hábito tabaquito en momento de inicio del estudio.

Al ser preguntados por sus hábitos enólicos solo 3 pacientes consumían alcohol habitualmente, que corresponden a un escaso 5,4% del grupo en estudio.

En ningún caso se identificó ningún paciente con uso de drogas por vía parenteral (UDVP).

5.1.4 Manifestaciones clínicas

5.1.4.1 Grado de poliposis

El grado de poliposis del grupo de estudio atendiendo a la endoscopia nasal y según la escala de Lildholdt y col. La distribución se describe en la tabla 5.4. Los grados 2 y 3 agruparon a la mayoría de los pacientes estudiados un total de 42 pacientes, lo que representa al 76,3% del grupo en estudio.

La media de puntuación de la escala Lund y Mackay en las PN de los pacientes con síndrome de ASA triada, también fue elevada con una media de 17,8, y un rango 14 a 24.

Poliposis	Nº pacientes
Grado 0	0
Grado 1	13 (23,6%)
Grado 2	14 (25,4%)
Grado 3	28 (50,9%)

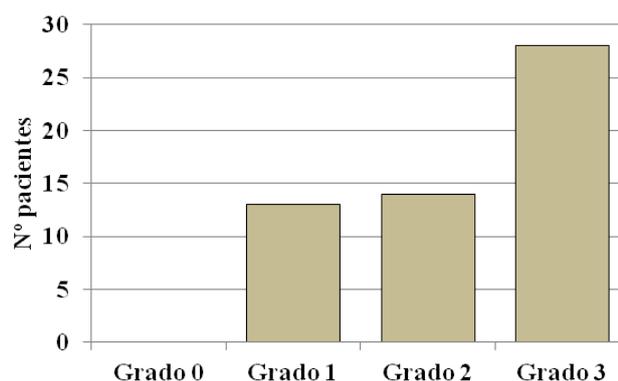


Figura 5.4 Distribución en grados poliposis (Escala Lildholdt)

Ninguno de los sujetos del grupo control presentaron poliposis nasal.

5.1.5 Tratamientos previos con fármacos.

5.1.5.1 Tratamiento antibiótico

En el momento de la inclusión de los pacientes en el estudio ningún paciente estaban tomando tratamiento antibiótico. Al 75,4% (44) de los pacientes, según su historia clínica, se le había administrado previamente al estudio al menos una pauta antibiótica. Se observó que en más de la mitad (24) de los pacientes se les había pautado varias tandas de antibioticoterapia. La familia antibiótica más utilizada fueron los macrólidos en 37 pacientes, concretamente la claritromicina (31) y azitromicina (8), seguido de la combinación aminopenicilina con inhibidor de β -lactamasas como el amoxicilina/clavulánico (6) y de la familia de las quinolonas (4), había sido utilizado principalmente el levofloxacino.

5.1.5.2 Tratamiento corticoideo

Únicamente 9 pacientes no habían recibido tratamiento corticoide alguno. A la mayoría se les había administrado varias pautas de tratamiento corticoideo sistémico, mayoritariamente prednisolona oral y tratamiento tópico.

5.1.6 Cirugía endoscópica previa (CENS)

La media de las polipectomías quirúrgicas (CENS) realizadas previamente a la inclusión de los pacientes en el estudio fue de 0,87 cirugías previas/paciente, con una desviación típica de 0,93. A la mayoría de los pacientes (43) no se les había realizado ninguna cirugía (41,8%) o únicamente una cirugía 36,3% (figura 5.5).

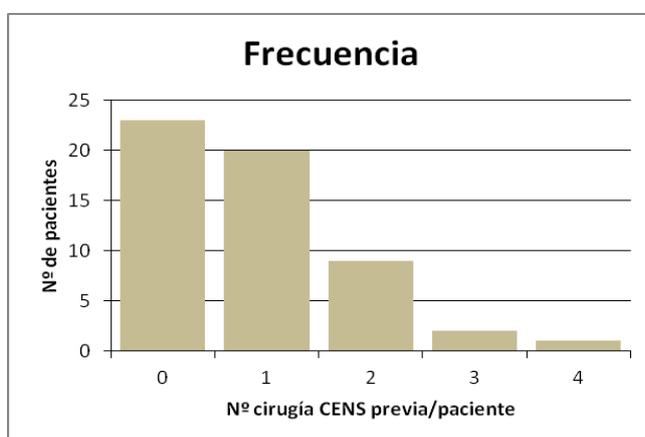


Figura 5.5. Frecuencia de N° de cirugías (CENS) previas a la inclusión en el estudio.

5.2 Análisis experimental

5.2.1 Grado de eosinofilia en tejido polipoide.

El grado de infiltración eosinofílica en general, medido de 0 a 3, se situó de media en los pacientes estudiados 1,81. En dos pacientes del estudio no se pudo determinar el grado de eosinofilia por un error en el procesamiento de la muestra. Los 20 pacientes del grupo control presentaron un grado 0 de eosinofilia que corresponde a menos de un 10% de eosinófilos. La distribución por grados se detalla en la tabla 5.2. El grado 2 y 3 fueron los observados más frecuentemente con un 20,8% y un 35,8%

respectivamente, que corresponden a muestras donde más del 40% de las células inflamatorias observadas son eosinófilos. 6 pacientes presentaron una eosinofilia inferior al 10%.

	Control	Grupo estudio
Grado 0	20 (100%)	6 (11,3%)
Grado 1	0	17 (32,1%)
Grado 2	0	11 (20,8%)
Grupo 3	0	19 (35,8%)

Tabla 5.2 Distribución de grado de infiltración eosinofílica.

5.2.2 Detección *in vivo* de microorganismos productores de *biofilms*.

De las muestras recogidas para el estudio, por dificultades técnicas únicamente se pudieron analizar 9 muestras, para determinar la presencia *in vivo* de *biofilms* mediante la tinción con solución *BacLight Live/Dead* y posterior observación mediante microscopía confocal. En las 8 muestras analizadas del grupo de estudio se encontraron imágenes compatibles con formas bacterianas en disposición de *clusters* y en la muestra control no se observó ninguna imagen compatible (figura 5.6).

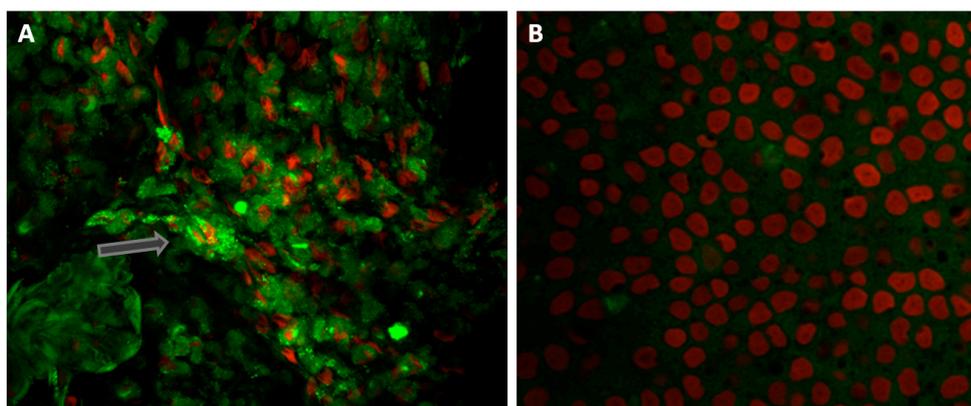


Figura 5.6 Fotografía de Microscopía confocal. A. Poliposis nasal, la flecha indica agrupaciones de bacterias en forma de *cluster*. B. Mucosa nasal (control) sin presencia bacteriana.

5.2.3 Cultivo bacteriológico

En 31 de las muestras de polipoides estudiadas se aisló al menos una especie bacteriana (figura 5.7), 24 muestras fueron resultados negativos por cultivo en la impronta directa sobre la placa Petri y en los pases posteriores a placa Petri del cultivo en caldo de enriquecimiento. Se identificaron 56 aislamientos bacterianos que correspondieron a 12 especies distintas, con una buena concordancia entre el autoanalizador Microscan Walkaway y el MALDI-TOF (98,3%). Únicamente, en un aislado hubo una discrepancia, que se realizó la identificación por secuenciación del rDNA 16S, coincidiendo el resultado con el obtenido por MALDI-TOF. Las especies bacterianas y su frecuencia están descritas en la tabla 5.3. La bacteriana aislada con mayor frecuencia fue el *Staphylococcus epidermidis* seguido de *Staphylococcus aureus*.



Figura 5.7 Cultivo positivo en Agar Chocolate de una biopsia de pólipo nasal.

Aislado	Poliposis nasal	Control
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	27 (49,1%)	20 (100%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	17 (30,9%)	5 (25%)
<i>Moraxella catarrhalis</i>	3 (5,4%)	2 (10%)
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	3 (5,4%)	1 (5%)
Bacilos gramnegativos	4 (3,6%)	6 (30%)
<i>Candida parapsilopsis</i>	1 (1,8%)	0
<i>Bacillus cereus</i>	1 (1,8%)	0
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0	5 (25%)

Tabla 5.3 Aislamientos en los polipos nasales.

La bacteria más frecuentemente aislada fue *Staphylococcus epidermidis* con un 49,1%, seguida de *Staphylococcus aureus* (30,9%). Además, ambos aislamientos se encontraron en 6 de las muestras estudiadas, siendo el aislamiento polimicrobiano más frecuente. El resto de aislamientos tuvieron una frecuencia mucho menor. *Moraxella catarrhalis* y estafilococo coagulasa negativo (*Staphylococcus lugdunensis*), fueron las bacterias aisladas que ocuparon el tercer lugar (5,4%). Los “bacilos gramnegativos” correspondieron a tres bacterias fermentadoras *Escherichia coli*, *Morganella morganii*, y *Enterobacter cloacae* y a un no fermentador como *Acinetobacter baumannii* (figura 5.8).

En cuanto al grupo control en todos los pacientes se aisló *Staphylococcus epidermidis*, seguido de *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus*, ambos con un 25%. Se aislaron 6 bacilos gramnegativos, todos ellos fermentadores *Escherichia coli* (2) y *Enterobacter cloacae* (3).

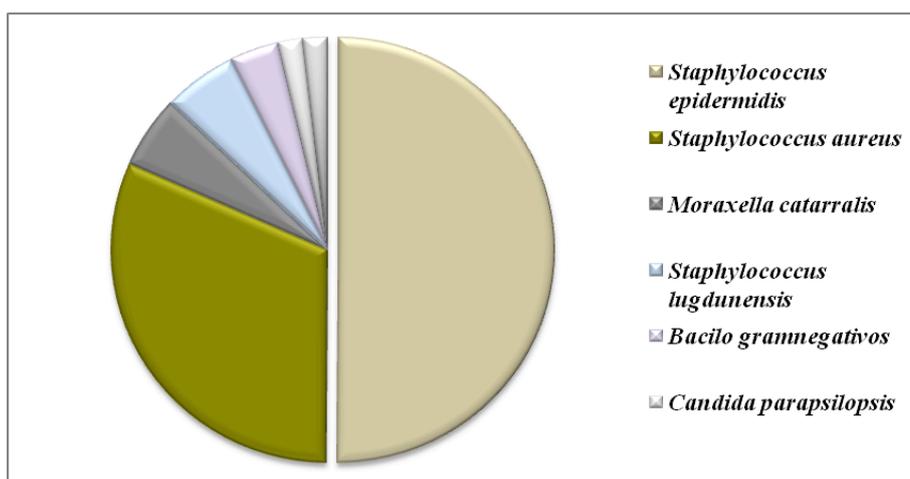


Figura 5.8 Distribución de los aislamientos bacterianos en el grupo estudio.

5.2.3.1 Resistencia antibiótica de *Staphylococcus aureus*

Todos los *Staphylococcus aureus* pertenecientes al grupo de estudio (n=17) presentaron el mismo patrón de sensibilidad a los antibióticos estudiados, salvo a la penicilina que fueron todos resistentes (tabla 5.4). Los *Staphylococcus aureus* del grupo control (n=5), presentaron mayor variación, en especial los antibióticos de la familia de los macrólidos, donde tres aislamientos mostraron resistencia a eritromicina y a clindamicina. Además, en este grupo control se detectó un *Staphylococcus aureus* meticilina resistente.

Antibiótico	Grupo pólipos nasales		Grupo control					
	n=17 (100%)		n=2		n=1		n=2	
	CMI (µg/ml)		CMI (µg/ml)		CMI (µg/ml)		CMI (µg/ml)	
Penicilina	> 0,25	R	> 0,25	R	> 0,25	R	> 0,25	R
Amoxicilina/ac. clavulánico	≤ 4/2	S	≤ 4/2	S	≤ 4/2	R	≤ 4/2	S
Oxacilina	≤ 0,25	S	≤ 0,25	S	≤ 0,25	R	≤ 0,25	S
Screening de Cefoxitina	≤ 4	NEG	≤ 4	NEG	> 4	POS	≤ 4	NEG
Fosfomicina	≤ 32	S	≤ 32	S	≤ 32	S	≤ 32	S
Levofloxacino	≤ 1	S	≤ 1	S	> 4	R	≤ 1	S
Eritromicina	≤ 0,5	S	≥ 8	R	≥ 8	R	≤ 0,5	S
Clindamicina	≤ 0,25	S	≥ 4	R	≥ 4	R	≤ 0,25	S
Gentamicina	≤ 1	S	≤ 1	S	≤ 1	S	≤ 1	S
Tobramicina	≤ 1	S	≤ 1	S	≤ 1	S	≤ 1	S
Nitrofurantoina	≤ 32	S	≤ 32	S	≤ 32	S	≤ 32	S
Trimetropim/sulfa	≤ 1/19	S	≤ 1/19	S	≤ 1/19	S	≤ 1/19	S
Tetraciclina	≤ 1	S	≤ 1	S	>8	R	≤ 1	S
Vancomicina	≤ 1	S	≤ 1	S	≤ 1	S	≤ 1	S
Daptomicina	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S	≤ 0,5	S
Mupirocina	≤ 4	S	≤ 4	S	≤ 4	S	≤ 4	S

Tabla 5.4 Perfil de sensibilidad antibiótica en los *Staphylococcus aureus* del grupo del grupo de estudio de poliposis nasal y del grupo control.

5.2.4 Detección por PCR Real-Time de *Staphylococcus aureus*

Se detectó la presencia de DNA específico de *S. aureus* en 26 de las muestras estudiadas (figura 5.9), lo que corresponde al 47,2% de los pacientes del grupo de estudio. En ninguno de los casos se detectó presencia de MRSA. En el grupo control hubo presencia de DNA de *S.aureus* en 5 casos positivos para *S. aureus* y un caso para MRSA.

Todos los ensayos de PCR Real-Time mostraron amplificación del control interno, por lo que ninguna muestra presentaba inhibidores del proceso de amplificación que no permitieran validar los resultados informados por la plataforma BDMAX™.

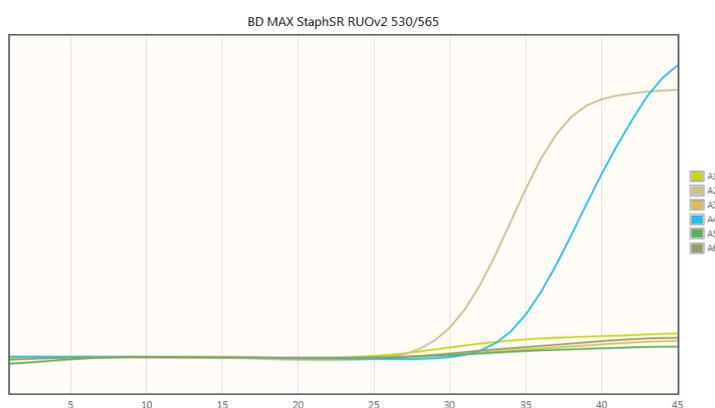


Figura 5.9 Resultado de la PCR Real-Time por BDMAX™. Muestras A2 y A4 positivas para *S.aureus*. Muestras A1, A3, A5 y A6 negativas.

5.3 Estudio comparativo entre los grupo control y experimental y el método de detección de *S. aureus*

Al 47,2% de los pacientes del grupo de estudio se les ha detectado por cultivo y/o PCR Real-Time la presencia de *S.aureus* (MSSA), frente a los 6 (30%) casos del grupo control (5 MSSA y 1 MRSA).

Cuando se comparan los resultados según el método de detección de *S.aureus* empleado (figura 5.10), se observa que si se realiza únicamente por cultivo, la detección en el grupo experimental es del 30,9% (17) frente al 20% (5) del grupo control. Y cuando se analiza la detección de *S.aureus* mediante

PCR Real-Time se observa que la diferencia de incidencia en ambos grupos aumenta, pasando del 30,9% al 47,2% del grupo de estudio y del 30% al 35% en el grupo control. Todas las muestras con cultivos positivos para *S. aureus* también fueron positivas mediante PCR Real-Time.

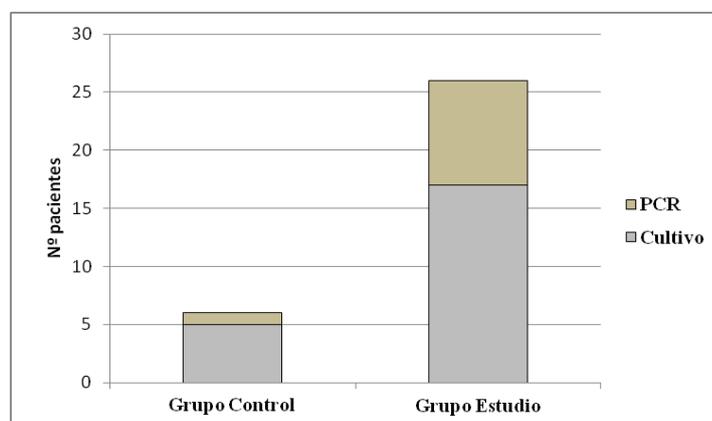


Figura 5.10 Detección de *S.aureus* según método diagnóstico.

5.4 Estudio comparativo entre grupos clínicos

5.4.1 Variables demográficas

Para poder obtener mayor consistencia en los resultados de los cálculos comparativos, se agruparon el grupo 1 (PN aislada), con el grupo 2 (PN con asma). De esta forma se obtuvieron grupos comparativos más homogéneos, el agrupado estuvo compuesto por 27 pacientes y el grupo 3 lo formaron 28 pacientes con Síndrome de ASA triada 28 (tabla 5.5).

En la variable epidemiológica edad no se encontraron diferencias significativas entre los grupos ambos grupos.

En cuanto, a la variable sexo en nuestro grupo de estudio se encontraron diferencias significativas en el conjunto, es decir, los grupos clínicos no tienen distribución similar en cuanto al sexo.

Grupo clínico	Sexo	
	Hombre	Mujer
1	14	2
2	9	2
3	11	17
Total	34	21

Tabla 5.5 Comparativa sexo con grupos clínicos.

La agrupación de los grupos clínicos permite detectar más claramente esta diferencia significativa con un $p \leq 0,05$. El grupo de Síndrome de ASA triada presenta un mayor porcentaje de mujeres que de hombres (1,5:1) frente al resto de poliposis nasales que mayoritariamente la forman hombres con un 77,7%.

5.4.2 Variables analizadas.

1) Grado de eosinofilia en tejido polipoide

El grado de infiltración eosinofílica difiere significativamente según el grupo clínico. Las poliposis nasales asociadas al Síndrome ASA triada presentan un mayor grado de infiltración eosinofílica, el 57,14% de los pacientes que forman este grupo presentan el mayor grado de infiltración. Llegando a alcanzar el 82,1% de este grupo cuando se suman los pacientes con recuentos de más del 40% de eosinófilos con respecto al de células inflamatorias en el tejido polipoide (figura 5.11). La poliposis nasal aislada y la asociada a asma no presentan diferencias importantes entre ellas con respecto al grado de eosinofilia, teniendo los dos grupos una media de eosinófilos menor del 40%.

En seis pacientes del grupo de estudio el porcentaje de eosinófilos con respecto al total de células inflamatorias no supera el 10%.

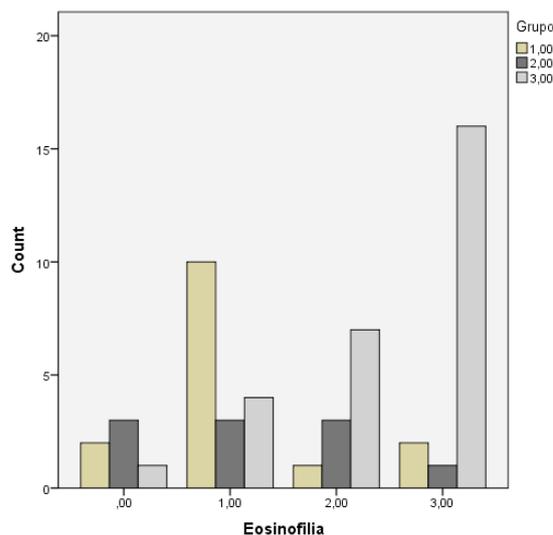


Figura 5.11. Gráfico comparativo entre el grado infiltración eosinofílica y el grupo clínico.

En la figura 5.11 se puede apreciar el marcado incremento del grado de infiltración eosinofílica en el tejido polipoide en los pacientes con poliposis nasal y Síndrome de ASA triada. Al realizar el estudio estadístico destaca la elevada asociación entre ambas variables con un Odds ratio de 11,8 (IC95%, 3,21-43,52) $p < 0,001$.

2) Cirugía endoscópica previa

Cuando se estudia el número de cirugías endoscópicas previas (polipectomías) a la inclusión de los pacientes con el grupo clínico al que pertenecen (figura 5.12). Se puede apreciar una clara tendencia de la realización de esta intervención quirúrgica sobre el grupo 3 (PN y síndrome ASA triada). Los pacientes con PN aislada que no han sido intervenidos representan el 50% del grupo, en el grupo 2 (PN y asma) son el 63,6%, mientras que el grupo 3 (síndrome ASA triada) son únicamente el 28,5%. Al realizar el estudio comparativo se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos clínicos en las cirugías endoscopias previas con un $p = 0,029$. Al estudiar los pacientes que han tenido más de una polipectomía, se observa que 11 (39,2%) pacientes del pertenecen al grupo PN y ASA triada mientras que solo un paciente (3,7%) pertenece al resto de los grupos. El estudio estadístico de tener más de una intervención y el grupo de Síndrome ASA triada presenta un Odds ratio de 16,8 (IC95%, 1,9-142,4) $p = 0,001$, con respecto los grupos de PN no ASA triada.

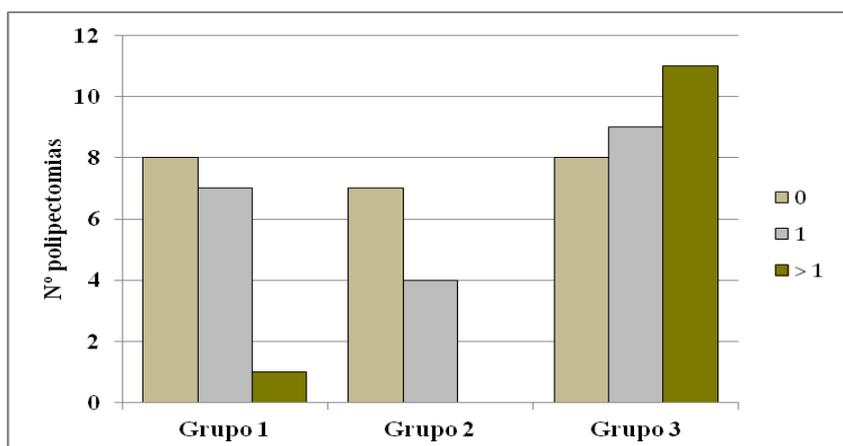


Figura 5.12 Gráfico comparativo entre grupos clínicos y antecedentes de polipectomías.

3) Duración de la poliposis nasal

Se realizó el estudio comparativo de la variable dependiente, años de evolución de la poliposis nasal, con el grupo clínico. El grupo del Síndrome ASA triada fue el que más años de evolución de la poliposis nasal con una media de 7,10 años, seguido del grupo de poliposis nasal aislada con una media de 5,32 años. Por último, en el grupo de PN y asma la media fue de 1,8 años (figura 5.13).

El estudio estadístico mostró diferencias estadísticamente significativas cuando se agruparon los grupos clínicos 1 y 2, que mostró una media de 4 años, con respecto al grupo 3 de PN y Síndrome ASA triada. De esta forma, la relación de los grupos clínicos y los años de evolución de la poliposis nasal, mostró un resultado con un $p = 0,016$, infiriendo que el grupo de síndrome ASA triada se correlaciona con más años de evolución de la PN.

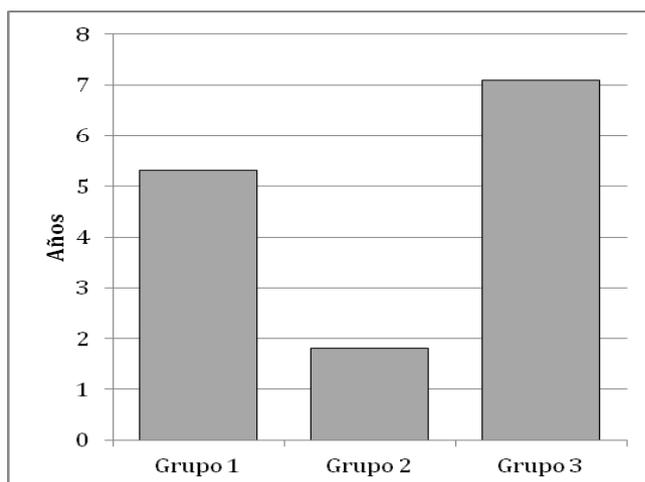


Figura 5.13. Gráfico comparativo entre los años de evolución de la poliposis nasal y el grupo clínico.

4) Detección de *Staphylococcus aureus*

La distribución de la detección de *Staphylococcus aureus* según los grupos clínicos se detalla en la figura 5.14. Se observó que en el 67,8% de los pacientes del grupo de síndrome ASA triada, en el 18,7% de los pacientes con PN aislada (grupo 1), en el 36,6% de los pacientes con PN y asma, se detectó *S.aureus* por al menos uno de los dos métodos utilizados. Existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos clínicos y la detección de *S.aureus*. Siendo el grupo de ASA triada el que presenta mayor presencia de *S.aureus*, $p=0,004$.

El valor de Odds ratio de la variable grupo frente a la detección de *Staphylococcus aureus* fue de 9,50 (IC95%, 1,69-53,39). La detección *Staphylococcus aureus*, en el tejido polipoide de pacientes con Síndrome de ASA triada mediante los métodos utilizados en el estudio, es algo más de nueve veces más probable que en los pacientes con poliposis nasal que no tiene asociado dicho Síndrome.

La detección por el método PCR Real-Time en la plataforma automatizada BDMAXTM, presentó una mayor significación estadística que el cultivo bacteriológico mediante placa en medios habituales y enriquecimiento en BHI.

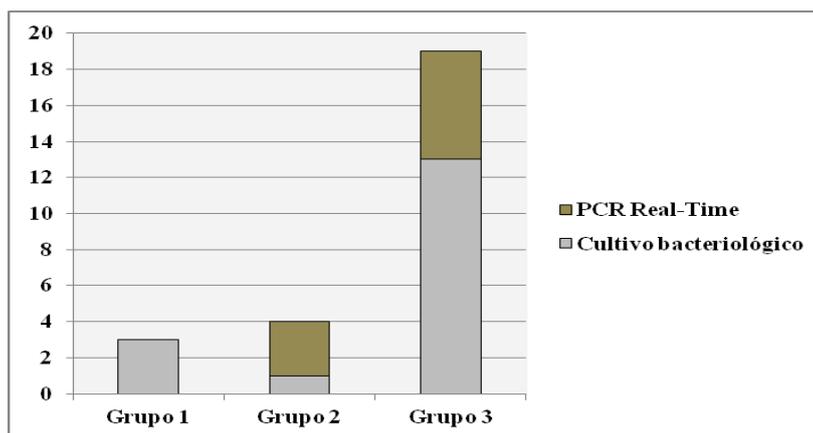
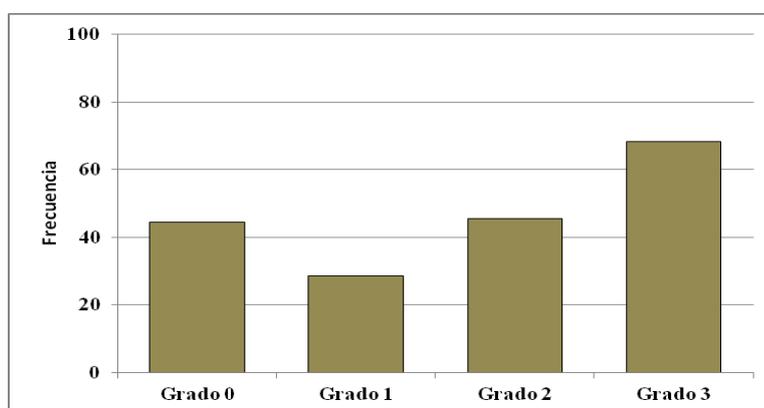


Figura 5.14. Gráfico comparativo de la detección de *S. aureus* según grupos clínicos.

A pesar de no ser significativa la asociación entre las variables grado de eosinofilia y la detección de *S.aureus*, cuando se analiza todos los datos, se puede apreciar (figura 5.15), como existe una clara tendencia de asociación entre los pacientes con PN y síndrome ASA triada y la presencia de *S.aureus*.



5.15 Gráfico comparativo entre el grado de eosinofilia y la detección de *S.aureus*.

No obstante, al agrupar los estadios del grado de eosinofilia en mayores y menores del 40% de eosinófilos por células inflamatorias observadas y se analiza la asociación con la variable detección de *S.aureus*, se observan diferencias significativas con un Odds rattoo de 3,5 (IC95%, 1,066-11,495).

Cuando se analiza la detección de *S.aureus* y los años de evolución de la poliposis nasal no se encuentra diferencias estadísticamente significativas con una $p = 0.065$. De la misma forma, cuando se estudia si la detección de *S.aureus* se asocia con más tiempo de la poliposis nasal en el grupo de síndrome ASA triada tampoco se encuentra significación estadística ($p = 0.095$).

5.5 Estudio comparativo multivariante de la detección de *Staphylococcus aureus* con las variables estudiadas.

Se realizó un análisis de regresión logística (modelo Logit) para predecir el resultado de la variable detección de *Staphylococcus aureus* (variable dependiente) en función de las variables independientes sexo, edad, grupo clínico, grado de eosinofilia y grado de poliposis en el momento de la inclusión de los pacientes al estudio.

En nuestro estudio la detección de *Staphylococcus aureus* en la poliposis nasal no tiene asociación con la edad ni sexo de los pacientes, ni con el grado de poliposis y eosinofilia que presenta el pólipo nasal (Tabla 5.6). No obstante, sí es significativa la asociación entre la detección de *Staphylococcus aureus* y el grupo clínico al que pertenece el paciente, en especial con el grupo 3, pacientes con Síndrome de ASA triada, donde existe una probabilidad de 2,66 veces mayor de ser detectado el *S.aureus* que en el resto de PN estudiadas.

Variables en la ecuación							
		B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)
Paso 1	EDAD	-,030	,025	1,503	1	,220	,970
	SEXO	-,807	,734	1,207	1	,272	,446
	GRUPO	,978	,338	8,360	1	,004	2,660
	GRADO	-,205	,384	,285	1	,594	,815
	Constante	-,548	1,738	,099	1	,752	,578

a. Variable(s) introducida(s) en el paso 1: EDAD, SEXO, GRUPO, GRADO.

Tabla 5.6 Tabla de resultado de regresión logística (modelo Logit).

5.6 Detección de producción de *biofilms* en los *Staphylococcus aureus* y estudio de los genes asociados a *biofilms*.

En la tabla se detallan los resultados de los ensayos de adherencia realizados a cada aislamiento de *S. aureus* de las muestras de los pacientes estudiados. El 85,35% de las cepas presentaron color negro, con distintos grados de intensidades del color negro (52,94% negro intenso, 32,40% negro suave) en el ensayo de Agar Rojo Congo y el 17,64 presentaron colonias de color rojo (figura 5.16). La cepa control *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 creció como colonias de color negro y la cepa control de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (cepa no productora de *biofilms*) como colonias de color rojo.

En el ensayo de adherencia en placas *microtiter* todas las cepas presentaron resultados positivos de adherencia ($OD_{570} > 0.1$), pero únicamente 4 aislados pudieron interpretarse como cepas de fuerte adherencia ($OD_{570} > 1$). La cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 obtuvo valores superiores a $OD_{570} > 1$, mientras que la cepa *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (cepa no productora de *biofilms*) presentó valores inferiores $OD_{570} > 0.1$ (ANEXO).

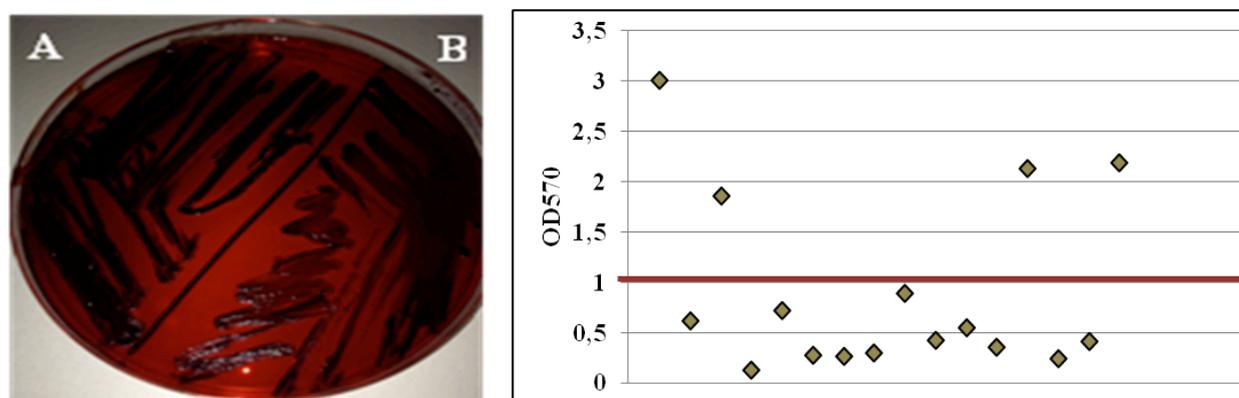


Figura 5.16. Cultivo Agar Rojo Congo. A. Colonia color negro intenso. B. Colonia negro suave. Gráfica de los valores del ensayo de adherencia en placa *microtiter*.

Al comparar ambos ensayos se observó que los valores extremos obtenidos en el ensayo de adherencia en placa *microtiter* tuvieron buena correlación con el color de las colonias obtenido en el ensayo Rojo Congo. Las cepas que presentaron color rojo en medio Agar Rojo Congo presentaron valores dentro del rango $0,1 < OD_{570} < 0,300$, y todas las cepas con $OD_{570} > 1$ tuvieron un color negro intenso. No

obstante, se observó mayor diversidad en la correlación de las cepas con los valores de OD₅₇₀ comprendidos entre 0,300 y 1.

Todas las cepas estudiadas (100%) presentaron amplificación de los genes *ica A* e *ica D*.

5.7 Estudio genotípico de las proteínas involucradas en la adhesión bacteriana.

Se realizó el estudio genotípico de 12 proteínas de adhesión bacteriana de la familia MRSRAMM sobre los 17 aislados de *S.aureus* del grupo de pacientes con poliposis nasales. Las figuras 5.17 a 5.19, representan la lectura en gel de agarosa al 1,5% de los fragmentos de DNA amplificados correspondientes a los genes de adhesión estudiados.

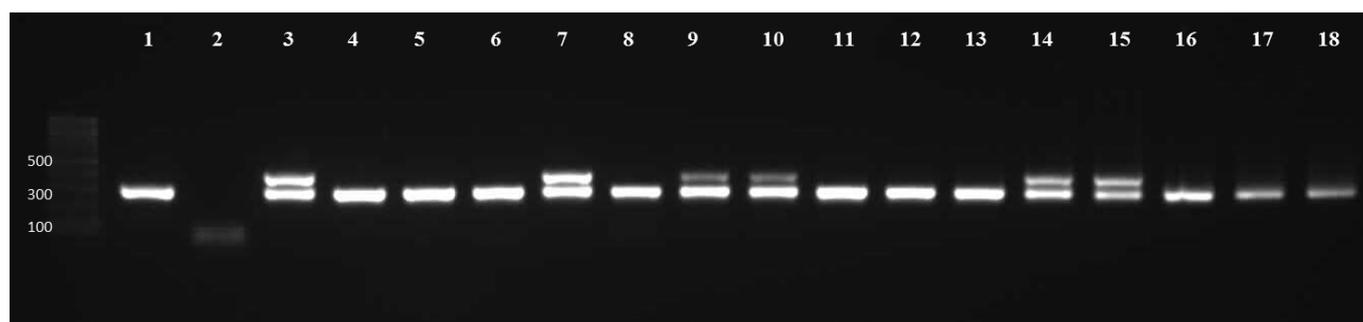


Figura 5.17. Gel de agarosa donde se observa el producto amplificado de dos fragmentos correspondientes al gen *cna* (423pb) y el gen *eno* (302pb). Todos los aislados amplifican para el gen *eno*. Los aislados de las carreras 3, 7, 9, 10, 14 y 15 amplifican para el gen *cna* y gen *eno*. La carrera 2 corresponde al control negativo.

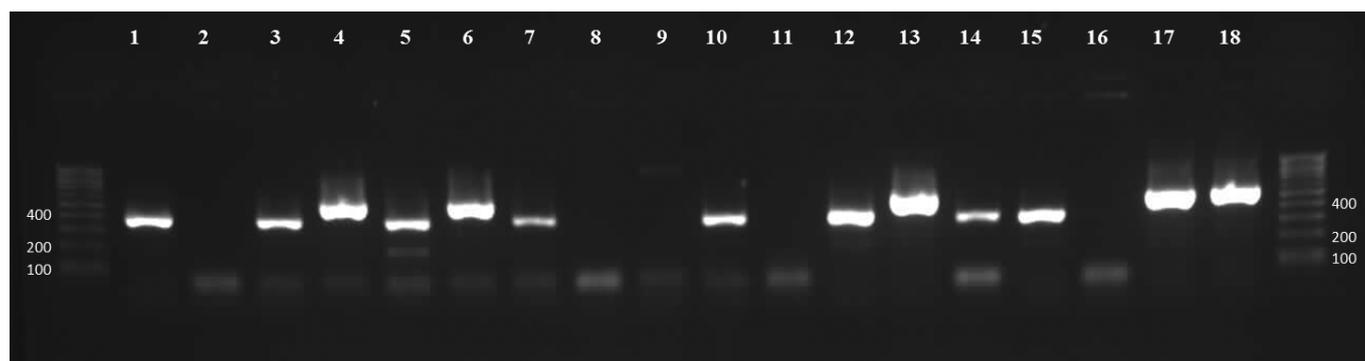


Figura 5.18. Gel de agarosa donde se observa el producto amplificado de dos fragmentos correspondientes al gen *bbp* (525pb) y el gen *fib* (405pb). Los aislados de las carreras 1, 3, 5, 7, 10, 12, 14 y 15 amplifican para el gen *fib*. Los aislados de las carreras 4, 6, 13, 17, 18 amplifican para el gen *bbp*. La carrera 2 corresponde al control negativo.



Figura 5.19 Gel de agarosa donde se observa el producto amplificado de fragmentos correspondientes al gen *fnbB* (524pb). Se observa producto en los aislados de las carreras 5, 9 y 10.

En la Tabla 5.7 se resume el resultado de detección de los 12 genes de las proteínas de adhesión en los *S.aureus* estudiados. Todos los aislados presentaron más de 4 adhesinas. En el 47,05% (8) de los *S.aureus* se detectaron 8 adhesinas, en el 29,4% (5) se detectaron 5 adhesinas y con el mismo porcentaje 11,76% (2) se detectaron dos grupos de 5 y 4 proteínas, respectivamente.

N° aislado	<i>ica A</i>	<i>ica D</i>	<i>eno</i>	<i>ebpS</i>	<i>clfA</i>	<i>clfB</i>	<i>cna</i>	<i>bbp</i>	<i>bap</i>	<i>fib</i>	<i>fnbA</i>	<i>fnbB</i>	N° total adhesinas
1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	6
2	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	4
3	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	6
4	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	6
5	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	7
6	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	7
7	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	7
8	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	4
9	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	6
10	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	7
11	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	5
12	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	7
13	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	6
14	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	7
15	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	7
16	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	5
17	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	7
Total (%)	100	100	100	52,9	100	11,7	41,1	17,6	0	52,9	17,6	17,6	

Tabla 5.7. Distribución de los genes de las proteínas de adhesión MRSRAMM entre los aislados de *S.aureus* de los pacientes con poliposis nasal.

Al estudiar la presencia de cada gen de proteínas de adhesión en los *S.aureus*, se observa que existen varios grupos bien diferenciados. Los genes que se encuentran presentes en el 100% de las cepas, corresponden a los genes *icaA*, *icaD*, *eno* y *clfA*. Un segundo grupo de adhesinas, se encuentran en aproximadamente la mitad de los aislados, los genes *ebpS*, *fib* (52,9%) y el gen *cna* (41,1%). Un tercer grupo formado por los genes *bbp*, *fnbA*, *fnbB* y *clfB*, que apenas se detectan en el 17,6% de los aislados. Y por último, el gen *bap* que no se encuentra en ninguno de los *S.aureus* estudiados.

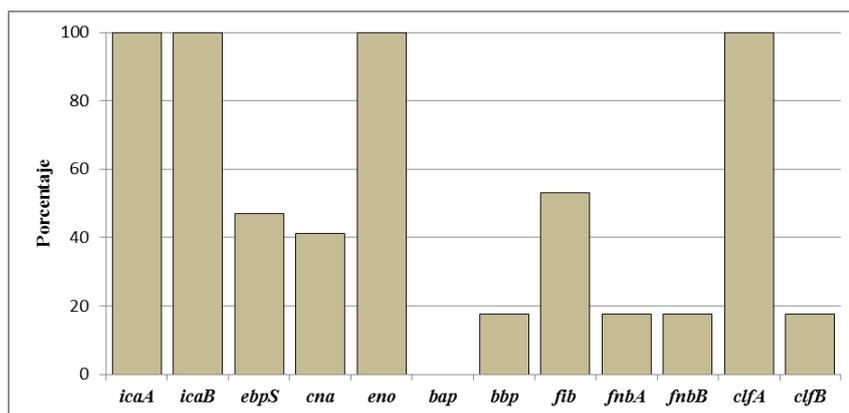


Figura 5.20 Gráfica de la distribución de los genes de proteínas de adhesión MRSA entre los aislados de *S.aureus* de los pacientes con poliposis nasal.

5.8 Estudio genotípico de enterotoxinas de *S.aureus*.

En la tabla 5.8 se detalla el estudio genotípico de las enterotoxinas *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *sem*, *seo* y *tsst-1* de *S.aureus* en las cepas aisladas del grupo de pacientes con poliposis nasal. En la mayoría de los aislados (58,8%) no se detectó ninguna de las enterotoxinas estudiadas. En 2 (11,7%) aislados se detectó una única enterotoxina y en 5 (29,4%) aislados se observó la presencia de dos enterotoxinas.

Nºaislado	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>sem</i>	<i>seo</i>	<i>tsst-1</i>	Total enterotoxinas
1	-	-	-	-	+	+	-	2
2	-	-	-	-	+	+	-	2
3	-	-	-	-	-	-	-	0
4	-	-	-	-	-	-	-	0
5	-	-	-	-	-	-	-	0
6	-	-	-	-	-	-	-	0
7	-	-	-	-	-	-	-	0
8	-	-	-	-	-	-	-	0
9	-	-	-	-	-	-	-	0

10	-	-	-	-	-	-	-	0
11	+	-	-	-	+	-	-	2
12	-	-	-	-	+	+	-	2
13	+	-	-	-	+	-	-	2
14	-	-	-	-	-	-	-	0
15	-	-	-	-	-	-	-	0
16	-	-	-	-	+	-	-	1
17	-	-	-	-	+	-	-	1
Total (%)	11,7	0	0	0	41,1	17,6	0	

Tabla 5.8 Distribución de la detección de enterotoxinas en los *S.aureus* de pacientes con poliposis nasal.

Las enterotoxinas que más se detectaron fueron *sem* y *seo* ambas pertenecientes al grupo *egc*, en un 17,6% y 41,1% de las cepas, respectivamente (figura 5.21). Las enterotoxinas denominadas clásicas tuvieron una escasa prevalencia, únicamente se detectó la enterotoxina A (*sea*) en dos aislados.

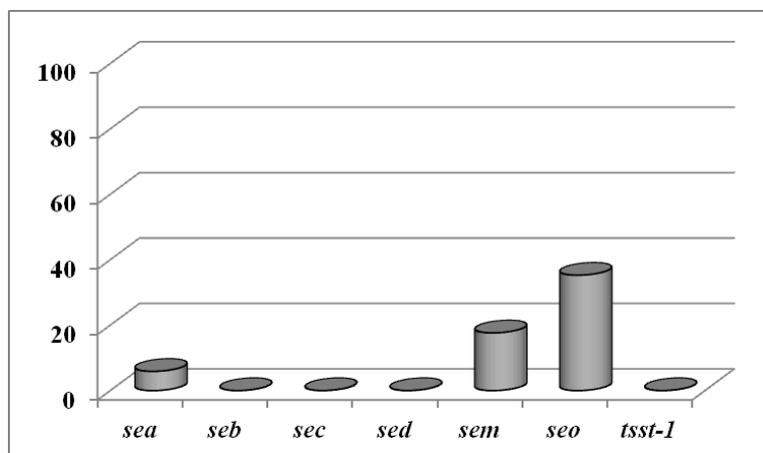


Figura 5.21. Enterotoxinas detectadas en los *S.aureus* de pacientes con poliposis nasal.

5.9 Estudio comparativo de las adhesinas y enterotoxinas de *S.aureus* asociados a poliposis nasal y *S.aureus* asociados a colonización nasal.

Los 19 *S.aureus* pertenecientes al grupo de colonización nasal sin poliposis nasal fueron obtenidos de pacientes que acudieron a consultas externas de diferentes servicios del CHGUV. Se estudió la presencia de proteínas de adhesión y de enterotoxinas mediante análisis molecular.

En la figura 5.22 se muestra el estudio de enterotoxina *sem* y *seo* de las cepas de *S.aureus* del grupo de portadores sanos y las cepas de *S.aureus* del grupo de poliposis nasal.

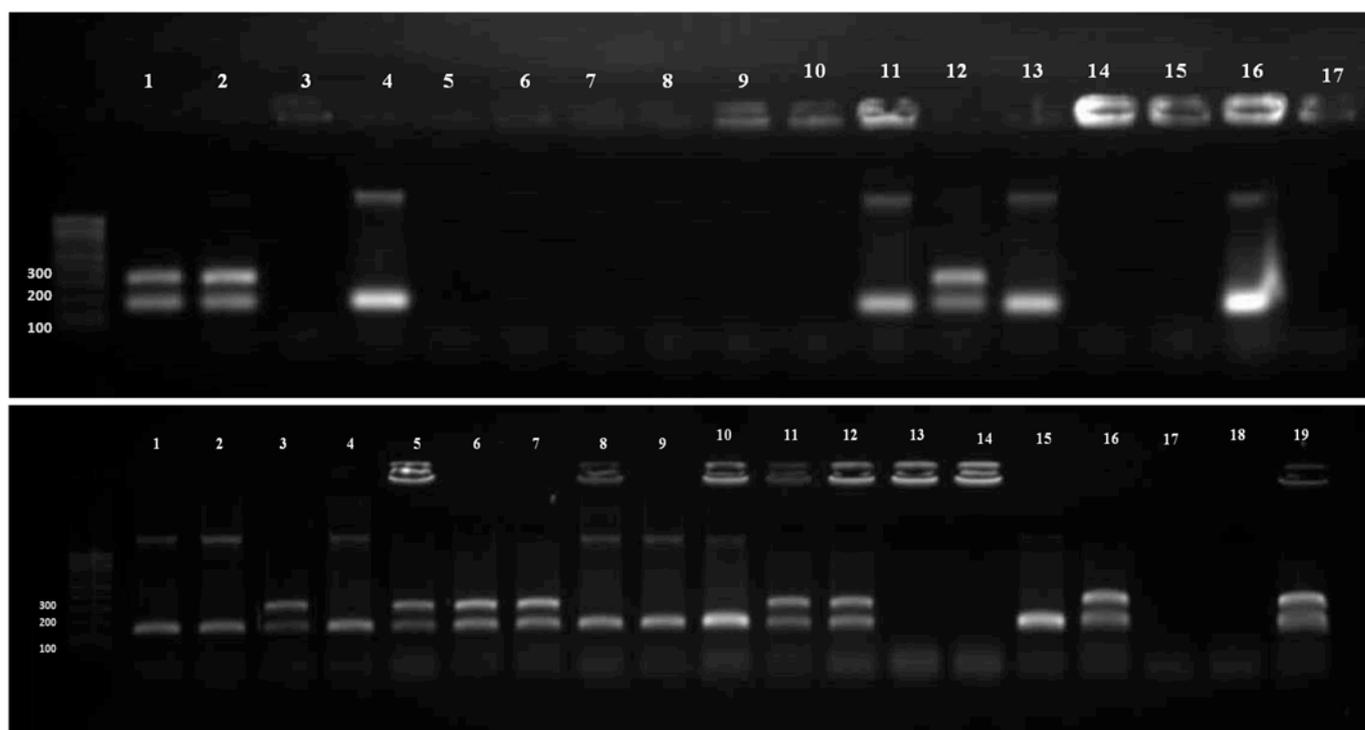


Figura 5.22 Comparación de la detección de la enterotoxinas *sem* (180pb) y *seo* (300pb) mediante la observación del producto amplificado en un gel de agarosa al 1,5%. La fotografía superior correspondientes a los *S.aureus* del grupo con poliposis nasal se puede observar como en las carreras 1, 2 y 12 se observan amplificados correspondientes a *sem* y *seo* (*sem*+/*seo*+). En las carreras 4, 11, 13 y 16 únicamente se observan fragmentos de 180pb (*sem*+/*seo*-). En las carreras 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 14 y 15 no presencia de *sem* ni *seo* (*sem*-/*seo*-). En la fotografía inferior se muestran los *S.aureus* correspondiente al grupo de colonización nasal sin poliposis nasal, se aprecia una mayor presencia de productos amplificados carreras 1, 2, 4, 8, 9, 10 *sem*+/*seo*-, carreras 3, 5, 6, 7, 11, 12, 16 y 19 enterotoxinas *sem*+/*seo*+. En las carreras 13, 14, 17, 18 no hay presencia de enterotoxinas *sem*-/*seo*-.

En la figura 5.23 se muestra el estudio de la enterotoxina *sed* y *sec* de las cepas de *S.aureus* del grupo de portadores sanos sin poliposis nasal y las cepas de *S.aureus* del grupo de poliposis nasal.



Figura 5.23 Comparación de la detección de la enterotoxinas *sed* (319pb) y *sec* (271pb) mediante la observación del producto amplificado en un gel de agarosa al 1,5%. La fotografía superior corresponde a los *S.aureus* del grupo de poliposis nasales, se puede observar que no se detecta ningún producto amplificado, carreras 1-17 (*sed-/sec-*). La carrera 18 corresponde al control negativo, y la carrera 19 corresponde al control de amplificación *S.aureus* con gen *sed* (319pb). La fotografía inferior corresponde a los *S.aureus* del grupo de colonización nasal sin poliposis nasal, se aprecia una mayor presencia de productos amplificados, en las carreras 5 12, 13, 16, 18, *sed+/sec-*, en las carreras 6,7 y 9 enterotoxinas *sed-/sec+*. En las carreras 1, 2, 3, 4, 8, 10, 11, 14, 15, 17 y 19 no hay presencia de enterotoxinas *sem-/seo-*.

- **Análisis comparativo de los genes de las proteínas de adhesión, MRSRAMM.**

Al realizar el estudio comparativo de las proteínas de adhesión MRSRAMM entre los *S.aureus* pertenecientes a los pacientes con poliposis nasal y los *S.aureus* asociados a colonización nasal, se observó que la mayoría de las proteínas (*icaA*, *icaB*, *bab*, *clfA*, *clfB*, *fib*, *fnbA*, *fnbB* y *eno*) no presentaban diferencias significativas en cuanto a su prevalencia en cada grupo.

En cambio, las proteínas *bbp* y *ebpS* tuvieron más prevalencia en el grupo de los *S.aureus* asociados a la colonización nasal con un Odds ratio de 0,15 (0,33-0,73) $p=0,013$ y 0,3 (0,07-1,28) $p= 0,013$, respectivamente.

Únicamente, la proteína de adhesión *cna*, cuyo ligando es el colágeno, se encontró en mayor prevalencia en el grupo asociado a poliposis nasal que en el grupo de colonización nasal sin poliposis nasal 12,6 (1,3-117,5), $p=0,016$ (tabla 5.9).

Gen	N° (%) aislados		
	Polipos nasal (n=17)	Colonización nasal (n=19)	Odds ratio (95%) <i>P</i> valor
<i>icaA</i>	17 (100)	18 (94,7)	NS
<i>icaB</i>	17 (100)	18 (94,7)	NS
<i>bbp</i>	3 (17,6)	11 (57,8)	0,15 (0,33-0,73), 0,013
<i>bap</i>	0	0	NS
<i>cna</i>	7 (41,1)	1 (5,2)	12,6 (1,3-117,5), 0,016
<i>clfA</i>	17 (100)	19 (100)	NS
<i>clfB</i>	2 (11,7)	1 (5,2)	NS
<i>fib</i>	9 (52,9)	9 (47,3)	NS
<i>fnbA</i>	3 (17,6)	1 (5,2)	NS
<i>fnbB</i>	3 (17,6)	3 (15,7)	NS
<i>ebpS</i>	9 (52,9)	15 (79,9)	0,3 (0,07-1,28), 0,013
<i>eno</i>	17 (100)	19 (100)	NS

Tabla 5.9 Comparación de la presencia de genes asociados a las proteínas de adhesión (MRSRAMM) en los diferentes aislados de *S.aureus* de los grupos de poliposis nasal y de colonización nasal sin poliposis nasal.

- **Análisis comparativo de las enterotoxinas**

Cuando se realizó el análisis de la presencia de las enterotoxinas *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *sem*, *seo* y *tsst-I* en los *S.aureus* del grupo de poliposis nasal y en los *S.aureus* de colonización nasal sin poliposis nasal, se observó que existe mayor presencia de enterotoxinas en los *S.aureus* del grupo de colonización nasal que los *S.aureus* del grupo de poliposis nasal. Se detectó al menos una enterotoxina en el 89,5% del grupo de colonización frente al 42,2% del *S.aureus* de grupo de poliposis nasal. En ambos grupos la enterotoxinas que más se detectaron fueron la *sem* y *seo*.

No se encontraron diferencias significativas entre la presencia de estas enterotoxinas y cada grupo estudiado, excepto en el análisis de la enterotoxina *seo* donde se observaron diferencias estadísticamente significativas estando más presente en los *S.aureus* del grupo de colonización nasal que en los *S.aureus* del grupo de poliposis nasal con un Odds ratio de 0,05 (0,01-0,3), $p < 0,01$ (tabla 5.10). A pesar de que observa que la enterotoxina *sed* tiene mayor presencia en el grupo de colonización que en el grupo de pólipos nasal, es necesario aumentar el tamaño muestral para poder estudiar la significación estadística de esta diferencia.

Gen	N° (%) aislados		
	Polipos nasal (n=17)	Colonización nasal (n=19)	Odds ratio (95%) <i>P</i> valor
<i>sea</i>	3 (17,6)	3 (15,7)	NS
<i>seb</i>	0	0	NS
<i>sec</i>	0	3 (15,7)	NS
<i>sed</i>	0	5 (26,3)	---
<i>sem</i>	7 (41,1)	8 (42,1)	NS
<i>seo</i>	3 (17,6)	15 (100)	0,05 (0,01-0,3), <0,01
<i>tsst-1</i>	0	0	NS

Tabla 5.10 Comparación de la presencia de genes asociados a enterotoxinas en los diferentes aislados de *S.aureus* de los grupos de poliposis nasal y de colonización nasal.

6. DISCUSIÓN

6.1 Con respecto al diseño experimental.

Los pacientes del grupo de la patología a estudio se incluyeron de forma aleatoria y su detección se realizó mediante el seguimiento del calendario de intervenciones quirúrgicas programadas de polipsectomías. Este método de selección empleado es el más utilizado en los estudios consultados, de esta forma los grupos de estudio presentan grados de poliposis avanzados (79, 128). En nuestra serie el 76,3% de nuestros pacientes presentaron grado 2 y 3. Aunque se había fijado como criterio de exclusión los pacientes pediátricos con poliposis nasal, ninguno acudió a la intervención quirúrgica mediante CENS.

Para el estudio se han seleccionado los datos clínicos que presentaban menor grado de subjetividad, para evitar las variaciones relativas a la percepción sintomatológica de los pacientes. Así los datos demográficos y los datos clínicos pudieron ser comparados con los datos experimentales obtenidos. El conjunto de las variables estudiadas generó información suficiente para poder ser analizada con detalle y sobre todo nos permitió reducir el campo de investigación, dentro del amplio tema de la poliposis nasal, para responder a los objetivos planteados.

El tamaño de la muestra sin ser excesivamente amplio, es algo superior al tamaño muestral de otros estudios similares, concretamente en aquellos que intentan asociar los *biofilms* bacterianos con las poliposis nasal, que pueden ir desde los 12 pacientes analizados en el estudio de Zernotti y col. hasta los 50 pacientes que estudió Toth y col. (128-130). A la dificultad de inclusión de los pacientes en el estudio, que por motivos éticos no se modificó el calendario de intervenciones quirúrgicas programadas en el servicio de Otorrinolaringología, hay que sumarle el tiempo que requiere el análisis de cada muestra y en especial de las características de los *S.aureus* aislados, objeto principal de nuestro estudio. No obstante, consideramos como una de las características más importantes y relevantes de nuestro estudio, el elevado número de pacientes con Síndrome de ASA triada, más de la mitad de los casos de las póliposis nasales estudiadas.

A pesar de la existencia de otras muchas variables que pueden ser estudiadas en las poliposis nasales, como se ha indicado en la introducción, consideramos que la implicación de *S.aureus* y especialmente las características de los *S.aureus* aislados, como su capacidad de producir *biofilms* o el patrón de proteínas de adhesión celular, en los pacientes con poliposis nasal han sido poco estudiados.

6.2 Con respecto a la detección de *Staphylococcus aureus* en las poliposis nasales

a) Cultivo e identificación bacteriológica

Existen varios procedimientos para el cultivo bacteriológico de muestras de tejido. Por lo general, las muestras de mayor tamaño suelen ser homogeneizadas previamente antes de ser depositadas sobre el medio de cultivo. En nuestro caso, al ser fragmentos pequeños y para evitar la pérdida de muestra en el proceso previo de homogenización, realizamos el cultivo por impronta, de forma semejante a la técnica Maki utilizadas en los catéteres. Como se indica en numerosos estudios, también decidimos optimizar la rentabilidad del cultivo bacteriológico, añadiendo un medio líquido de enriquecimiento.

La identificación de la especie *S.aureus* por los dos métodos elegidos en el estudio, el semiautoanalizador Microscan Walkaway (Siemens®) y el espectómetro de masas MALDI-TOF mostraron una elevada concordancia entre los datos proporcionados. Únicamente pudimos encontrar una discrepancia en un aislamiento, el cual fue identificado por Microscan como *Staphylococcus schleiferi* y el MALDI-TOF lo identificó como *S.aureus*. En este caso, y para obtener una identificación correcta, se decidió realizar la secuenciación de un pequeño fragmento del rDNA 16S, cuyo resultado coincidió con el informado por MALDI-TOF, *Staphylococcus aureus*.

Estas pequeñas discrepancias también han sido encontradas por otros autores al realizar estudios comparativos entre varios métodos de identificación bacteriana y la espectrometría de masas. Todos los estudios proporcionaron mejores resultados en la identificación a nivel de especie, especialmente en el género *Staphylococcus*, mediante la espectrometría de masas que con los métodos microbiológicos convencionales todos ellos basados en pruebas bioquímicas.

La incorporación de esta nueva herramienta de identificación basada en la espectrometría de masas ha permitido, a parte de mejorar en la identificación bacteriana, como sucedió en nuestro estudio, agilizar los tiempos de respuesta ya que en menos de 10 min. proporciona una identificación bacteriana fiable. Este tiempo es mucho menor que 17-24 horas que tardan los métodos de identificación convencionales, lo que ayuda a mejorar el diagnóstico.

b) Resistencia antibiótica de *S.aureus*

En cuanto a la resistencia antibiótica encontrada cabe destacar la homogeneidad de los aislados. No se detectó ningún MRSA ni tampoco ningún *S.aureus* resistente a macrólidos, siendo esta familia antibiótica habitualmente utilizada en la pauta antimicrobiana de este tipo de pacientes. Exactamente en nuestra serie, a 37 pacientes (67,27%) se les pautó al menos una vez, alguna clase de macrólido antes de su inclusión.

Actualmente, en España aproximadamente el 30% de los *S.aureus* aislados son MRSA. Las causas de este porcentaje tan elevado, son múltiples, pero fundamentalmente se deben a la elevada presión antibiótica, lo que beneficia la adaptación biológica de MRSA frente a las cepas MSSA, especialmente en ámbitos asociados a centros sanitarios (131). En nuestro estudio no se aisló ningún MRSA a pesar de la prevalencia y presión antibiótica existente.

En los últimos años cada vez se conoce más sobre la eficiencia o *fitness* biológico que ocasiona la acumulación de factores de resistencia antibiótica en las bacterias (132). Uno de los trabajos más destacables a este respecto, fue el publicado por Laurent y col., donde analizaron el *fitness* biológico de cepas MSSA con respecto a cepas MRSA y concluyeron que las cepas sensibles, son un 20% más eficientes en su crecimiento (tiempo de generación) que las cepas MRSA. Además, también demostraron, mediante el desplazamiento de diferentes clones de MRSA, que existía una acumulación de mutaciones en cepas resistentes para corregir este déficit de eficiencia (133). Desde este prisma de *fitness* biológico, se podría explicar la no detección de cepas MRSA en nuestro estudio. La capacidad de formar *biofilms*, proporciona a *S.aureus* una mayor tolerancia antibiótica, y la poca relación existente entre los pacientes estudiados y el ámbito sanitario, donde existe una mayor presión antibiótica, son factores que podrían estar favoreciendo la presencia del tipo de *S.aureus* MSSA que encontramos en nuestro estudio.

c) Prevalencia

La bacteria mayoritariamente aislada en nuestro estudio fue *Staphylococcus epidermidis* en un 49,1% de las muestras. Es la bacteria más frecuentemente aislada en los laboratorios de microbiología y debido a su amplia distribución, superficies inanimadas o la piel, y a sus pocos factores de patogenicidad es comúnmente considerada como probable contaminante cutáneo (134).

Aunque en los últimos años, *S.epidermidis* está apareciendo con mayor presencia como agente etiológico en estudios de procesos infecciosos lentos, persistentes e insidiosos, generalmente asociados a cuerpos extraños como en endocarditis de válvula protésica, infecciones asociadas a catéteres o a implantes. Así lo detallan los estudios de ENVIN-UCI publicados en España, donde cerca del 40% de las bacteriemias asociadas a catéteres en personas ingresadas en servicios intensivos está causada por *S.epidermidis* (135).

A pesar de estos datos, la localización del aislamiento en este estudio de *S.epidermidis* y la no existencia de ningún factor exógeno que pudiera actuar como un cuerpo extraño, nos ha permitido considerar a este aislamiento como contaminante de origen cutáneo.

Staphylococcus aureus fue la segunda bacteria más frecuentemente aislada con un 30,9%. Como ya hemos indicado en la introducción, *S.aureus* es una bacteria con un gran potencial patogénico y se encuentra relacionada con múltiples procesos infecciosos. *S.aureus* es un colonizador habitual de las fosas nasales anteriores, siendo este su principal nicho ecológico en humanos. Está ampliamente demostrado que el estado de portador de *S.aureus* es un factor de riesgo importante de padecer infecciones en otras localizaciones como bacteriemias e infecciones postquirúrgicas (136, 137).

En nuestra serie de estudio la prevalencia de *Staphylococcus aureus* muestra unos valores muy elevados con respecto a la población general. Se estima que cerca del 10-15% de la población mundial se encuentra en estado portador con respecto a la presencia asintomática de *Staphylococcus aureus* en las fosas nasales. Esta prevalencia es mayor en aquellos grupos de personas íntimamente relacionados con los sistemas sanitarios, personas ingresadas en hospitales, en residencias de la tercera edad o personas que acuden asiduamente a centros sanitarios como centros de hemodiálisis u hospitales de día. En estos casos, la prevalencia puede llegar a ser superior al 30% (138).

La prevalencia *Staphylococcus aureus* de los pacientes con poliposis nasal es del 47,2% frente al 30% del grupo control. Prevalencia algo más elevada de lo esperable de un grupo de pacientes íntimamente relacionados con centros hospitalarios. No obstante, a pesar de ser pacientes que acuden con cierta periodicidad, no menor de 6 meses, al servicio de Consultas Externas no creemos que puedan ser considerados como pacientes con elevada relación con centros sanitarios como en los casos anteriormente descritos. Tampoco ninguno de los pacientes estudiados posee alguna patología de base diagnosticada que explique una mayor relación hospitalaria. Por lo tanto, se podría concluir que *Staphylococcus aureus* tiene una elevada incidencia en los pacientes con poliposis nasal.

Estos datos de prevalencia corroboran los publicados por otros autores que oscilan entre un 34% y un 86%, siendo destacable la variación de prevalencia existente entre los diferentes estudios (139)

Uno de los aspectos más importantes a los que se puede atribuir dicha variación, es a las distintas metodologías utilizadas para la detección de *Staphylococcus aureus* en cada estudio. De tal manera que los valores de menor prevalencia de *Staphylococcus aureus* se observan en aquellos estudios donde únicamente se ha utilizado el cultivo bacteriológico en sus dos variantes, el cultivo en medio en placa y el cultivo en medio líquido enriquecido (79, 128). Mientras que los valores de prevalencia más elevados, los encontramos en estudios que han empleado métodos moleculares para la detección *Staphylococcus aureus* bien mediante amplificación de su material genético por PCR Real-Time o bien mediante la detección del material genético con sondas fluorescentes (FISH) (140)

Todo ello, parece indicar que la elección del método empleado en la detección de *Staphylococcus aureus* es clave para obtener resultados de mayor o menor frecuencia. Las causas que originan estas diferencias con respecto a método convencional del cultivo bacteriológico pueden ser varias:

En primer lugar, puede deberse a una menor sensibilidad del cultivo con respecto a las técnicas moleculares. No obstante y aunque esto es cierto, no explica la amplia diferencia de incidencia existente. Estudios comparativos de sensibilidad entre ambos métodos, PCR y cultivo bacteriológico (cultivo en placa y utilización de subcultivos tras incubación en medio de enriquecimiento) muestran un aumento de sensibilidad, pero este no es superior al 1% (141). Por lo que parece indicar que existen otras causas que justifiquen estas diferencias. Otra de las explicaciones que cobra mayor relevancia, y al igual que sucede en otras infecciones bacterianas asociadas a cultivos bacteriológicos negativos, es la que se atribuye a la especial disposición en que se encuentran las bacterias en el tejido estudiado, como es la formación de *biofilms* donde se encuentran embebidas las bacterias. Gracias a esta estructura, las bacterias se encuentran inmovilizadas al estar adheridas al tejido y en un estado de “latencia” con una reducida actividad metabólica. Esto dificulta notablemente la dispersión de las bacterias e impacta directamente sobre la capacidad de crecimiento en los medios de cultivo, comprometiendo de esta forma la sensibilidad del cultivo bacteriológico.

Otra de las teorías sugeridas que explicarían la menor capacidad de detección del cultivo es la supervivencia de *S.aureus* en el interior de las células epiteliales de la mucosa nasal. Este estado intracelular le permitiría a la bacteria ser refractaria a los tratamientos antibióticos además de no poder ser detectada su presencia mediante el cultivo bacteriológico. En un estudio reciente, realizado a 51 pacientes

con RSC, mediante sondas FISH específicas de *S.aureus* y microscopía confocal, se detectó *S.aureus* intracelular en el 39% de los pacientes, y además todos ellos estaban asociados también con la formación de *biofilms* (142).

d) Asociación con los factores clínicos.

- **Edad y sexo**

La media de edad del grupo fue de 55,3 años, aunque el rango de edad donde mayor número de pacientes se concentraron fue entre 60-65 años. Existe significación estadística con respecto al sexo ya que se observó mayor proporción de hombres que de la de mujeres (1,5:1) con respecto a la presencia de poliposis nasal. Estos datos de prevalencia de poliposis nasal, con predominancia en hombres, son los observados en las series de estudios similares (16). No obstante, cuando se analizó el grupo de Síndrome ASA triada se observó como el número de mujeres fue bastante más elevado que el de los hombres. Estas proporciones de mujeres con respecto a hombres en cuanto a la incidencia del Síndrome de Widal mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la proporciones de género del resto de poliposis nasales. Otros estudios del Síndrome de ASA triada como el realizado por Tudorache y col. que analizaron la prevalencia de dicho síndrome entre 473 pacientes asmáticos, detectaron que el 4,8% eran ASA triada con una proporción de mujeres 3:1 con respecto a los hombres (143).

Cuando realizamos una búsqueda del comportamiento de los factores demográficos (edad y sexo) en los estudios de prevalencia de colonización por *S.aureus* observamos que el factor ser hombre y el de tener una edad inferior a 65 años, tienen un mayor riesgo de ser colonizados, que con respecto a ser mujer o tener más de 65 años (144). No obstante, cuando se analizó nuestra serie, no encontramos asociación significativa entre la detección de *S.aureus* y los hombres, de hecho, no se detectó ninguna diferencia entre la detección de *S.aureus* y el género de los pacientes (15 hombres y 11 mujeres), aunque sí se puede apreciar una mayor frecuencia de detección en los hombres.

- **Grupos clínicos**

Los grupos clínicos de nuestro estudio se describieron utilizando los factores asociados a la poliposis nasal más característicos. Esta distribución la encontramos habitualmente en los estudios asociados a las

poliposis nasal. En nuestra serie destaca el elevado número de pacientes con ASA triada (50,9%), lo que ha obligado a agrupar en muchas ocasiones el resto de grupos clínicos (PN aislada, PN asociada a asma y PN asociada a alergia) para homogeneizar el número de pacientes por grupo y facilitar los cálculos estadísticos, de esta forma se realizaron las comparaciones entre PN con ASA triada (n=28) y PN sin ASA triada (n=27).

Los pacientes con poliposis nasal sin ASA triada tienen una prevalencia de detección de *S.aureus* del 25,9% mientras que los pacientes con Síndrome de ASA triada alcanzan el 62,8%. Es decir, el padecer el Síndrome de ASA triada aumenta de forma significativa la detección de *S.aureus* mientras que el resto de pacientes con poliposis nasal podríamos decir que se encuentran en valores esperados de detección de *S.aureus* dentro de la población general. Según los resultados de nuestro estudio, la detección de *S.aureus* es algo más de nueve veces más probable en los pacientes con ASA triada que en los pacientes con poliposis nasal que no tienen asociado dicho Síndrome.

Existen pocos estudios que corroboran estas observaciones. El estudio más citado es el que realizó Van Zele y col. que analizó la colonización por *S.aureus*, mediante cultivo bacteriológico de escobillón nasal en 55 pacientes con poliposis nasal, destacando el grupo de pacientes asociados a asma (n=18) y el grupo asociado a ASA triada formado solo por 8 pacientes. Los datos de colonización fueron del 66,7% y 87,5% respectivamente. En nuestro estudio, a pesar de utilizar técnicas moleculares como la PCR Real-Time, observando diferencias significativas con respecto al cultivo, y a pesar de detectar porcentajes elevados de *S. aureus*, especialmente significativos en el grupo de ASA triada (62,8%), no alcanzamos ese nivel.

Consideramos dos aspectos importantes a tener en cuenta en nuestro estudio, que son: el número más elevado de pacientes con ASA triada, 28 con respecto a los 8 pacientes del estudio de Van Zele y col., y la calidad de la muestra estudiada, el material utilizado en nuestro estudio fue una porción de biopsia del pólipo nasal recogida mediante intervención quirúrgica, mientras que en el estudio de Van Zele se utilizaron frotis nasales recogidos mediante escobillones (145).

Por otro lado, es ampliamente conocido que *S.aureus* es una de las principales causas de infecciones adquiridas en el hospital. Especialmente en infecciones asociadas a unidades de cuidados intensivos, y de infecciones postquirúrgica del lugar de la incisión (146, 147).

También, es relevante que el estado de portador en la zona nasal por *S.aureus* es un importante factor de riesgo de padecer infecciones por esta bacteria, ya sea por translocación endógena o por transmisión exógena a otras personas que comparten lugares cercanos (148). Por ello, actualmente existen numerosos programas de detección del estado portador nasal asintomático para prevenir estas infecciones. Estos programas pueden tener un carácter universal o pueden depender de criterios de búsqueda asociados a las características de los pacientes, como haber estado ingresado previamente, haber tomado antibióticos como quinolonas o ser pacientes hemodializados. En todos estos criterios se ha demostrado su asociación directa con una mayor prevalencia del estado de portador nasal por *S.aureus*.

La eficacia de estos programas también ha sido ampliamente estudiada tanto a nivel de prevención de las infecciones asociadas a *S.aureus* como a nivel de coste-eficacia de su implantación. Dando todos ellos, unos excelentes resultados especialmente a nivel de prevención de infecciones nosocomiales (149). Además, en una revisión de estos programas de cribado realizada por Collins y col. que analizó la coste-eficacia de estos programas, se demostró que los programas que utilizan criterios de inclusión de los pacientes son programas con mayor coste-eficacia que los programas de carácter universal (150).

En este aspecto, nuestro estudio con los datos de prevalencia obtenidos en los pacientes con poliposis nasales, especialmente en aquellos con síndrome de ASA triada, contribuye a considerar que padecer esta enfermedad, podría ser uno de los criterios de inclusión en todos los programas de cribado o búsqueda de *S.aureus* que están siendo implantados en los diferentes centros sanitarios para la prevención de enfermedades nosocomiales.

- **Grado de eosinofilia en el tejido polipoide.**

Hay que destacar que no existe unanimidad entre los autores en los criterios a seguir para cuantificar los eosinófilos, ya que algunos estudios proporcionan datos de cuantificación en valores absolutos y otros en valores relativos. Además, hay que tener en cuenta que los eosinófilos no se distribuyen homogéneamente por el tejido polipoide, teniendo mayor presencia en la zona intraepitelial. En nuestro estudio hemos decidido, con el fin de simplificar los datos, expresar los resultados en valor relativo, de forma semicuantitativa, como porcentaje de eosinófilos respecto al total de células inflamatorias (151).

La eosinofilia en el tejido polipoide está presente en la mayoría de los pacientes estudiados (90%). Hubo 6 pacientes que no mostraron una eosinofilia mayor del 10%, hecho que puede estar en relación con

las fluctuaciones en la evolución de la enfermedad que también observamos en la clínica. Aún con la existencia de esta posible desviación, se pudieron obtener diferencias significativas entre el grado de infiltración eosinofílica y las variables estudiadas.

Se pudo observar una estrecha asociación entre la elevada presencia de infiltración eosinofílica en el tejido polipoide y el grupo de PN asociada a ASA triada. En un estudio realizado por Jankowsky y col. con 263 pacientes operados de polipeptomías, analizaron el porcentaje de eosinófilos y encontraron que más del 75% de los pacientes con el Síndrome de Widal presentaron valores elevados de eosinófilos y concluyeron, al igual que en nuestro estudio que existe una clara correlación entre la PN con Síndrome de ASA triada y la respuesta eosinofílica del tejido polipoide (152, 153).

Cuando comparamos el grado de infiltrado eosinofílico y la detección *S.aureus*, se observa que existen diferencias significativas, lo que pone de manifiesto que existe una relación entre el infiltrado eosinofílico del tejido polipoide y la presencia de *S.aureus*. Todavía, no está claro el papel que desempeñan los eosinófilos en la respuesta inmunitaria que genera la infección por *S.aureus*, y especialmente en infecciones de vías respiratorias. En los últimos años, han sido muchos los estudios que intentan explicar esta respuesta, algunos como el estudio publicado por Rodríguez-Fernández y col. asocian esta respuesta eosinofílica como indicador de buen pronóstico en la evolución de neumonías asociadas a ventilación mecánica por *S.aureus* en pacientes graves. Otros estudios, realizados en pacientes asmáticos, relacionan de forma significativa el aumento de eosinófilos con infecciones bacterianas respiratorias producidas por *S.aureus*, mientras que las infecciones ocasionadas por otros patógenos como *Haemophilus influenzae* o *Pseudomonas aeruginosa* no generan este tipo de respuesta eosinofílica (154, 155).

A su vez, un interesante estudio realizado por Horokio y col. sobre personas con dermatitis atópicas, cuyo estado de colonización por *S.aureus* está estrechamente relacionado con las exacerbaciones de la enfermedad, puso de manifiesto la capacidad que tiene *S. aureus* de activar directamente a los eosinófilos mediante la vía de los receptores del factor activador plaquetario (PAFR) (156). Recientemente, en estudios con modelos murinos han demostrado que los receptores CD48 de los eosinófilos juegan un importante papel en la unión y activación celular producida por *S.aureus* (157).

Con todo ello, la presencia de *S.aureus* en el pólipo nasal y la respuesta eosinofílica encontrada podrían estar estrechamente relacionadas, y además como se ha indicado en el apartado anterior esta

relación adquiere mayor significación cuando nos encontramos ante pacientes diagnosticados de ASA triada.

- **Grado de la poliposis nasal.**

Con respecto a la extensión del tejido polipoide no se pudo determinar ninguna relación con el resto de variables estudiadas. Es importante tener en cuenta el diseño utilizado en el estudio para la selección de los pacientes. Todos los pacientes estaban programados para realización de polipectomías por indicación del otorrinolaringólogo, lo que se vio reflejado en el hecho de que más del 80% de los pacientes presentaban pólipos de grado 2 o superior. Este sesgo en la selección de los pacientes no ha permitido poder asociar el grado de la poliposis nasal con ninguna variable estudiada.

- **Cirugía previa endoscópica.**

Hemos encontrado diferencias significativas entre el número de polipectomías previas en los distintos grupos clínicos. Los pacientes con Síndrome de ASA triada presentaban un número mayor de polipectomías realizadas, lo que indica que en estos pacientes el proceso polipoide ha tenido mayor recurrencia y exacerbaciones en comparación con los otros grupos clínicos. Estos datos coinciden con los observados en otros estudios donde los pacientes con el Síndrome de ASA triada presentan mayor número de exacerbaciones y recurrencias (158).

- **Duración de la poliposis nasal**

En nuestro estudio al igual que lo que sucede con estudios similares el factor Síndrome de ASA triada está asociado a un mayor tiempo de evolución de la poliposis nasal, con una media de 7,10 años (159).

A pesar de que no hemos detectado diferencias estadísticamente significativas entre la duración de la poliposis nasal y la presencia de *S.aureus*, cuando se realizó el estudio estadístico se observó una clara tendencia de asociación entre ambas variables tanto en el conjunto de los pacientes con poliposis nasal estudiados como cuando se restringió el análisis al grupo de Síndrome de ASA triada ($0,10 < p > 0,05$).

No hemos encontrado referencias en la literatura sobre esta asociación. Consideramos que el aumento en el número de pacientes estudiados ayudaría a sustentar la hipótesis del papel de *S.aureus* en la duración de la poliposis nasal.

6.3 Con respecto a la producción de *biofilms* y conjunto de adhesinas de los *Staphylococcus aureus*.

a) Productores de *biofilms*

Son numerosos los estudios en los últimos años que intentan poner de manifiesto la presencia de *biofilms* bacterianos en ciertos tipos de infecciones. Las relaciones más notables son las infecciones asociadas a cuerpos extraños como se ha comentado anteriormente. No obstante, existe otro grupo de infecciones sin presencia de material exógeno, donde se ha visto que la formación de *biofilms* tiene especialmente interés, como es el caso de las otitis media, colesteatoma, amigdalitis, neumonías asociadas a pacientes EPOC.

Todos los *S.aureus* aislados en los pacientes del grupo de estudio fueron productores de *biofilms*. Se detectó en el 100% de las cepas el operón *ica ABCD*, imprescindible para la producción del principal componente de la matriz exopolisacárida que forma el *biofilm* en *S.aureus*. Además, *in vitro* se pudo observar la capacidad productora de *biofilms* cuando existen elevadas concentraciones de glucosa (inductor de *biofilms*), mediante el ensayo de adherencia en placa de *microtiter* y en el ensayo de Agar Rojo Congo.

Existen varios métodos empleados para el estudio del cultivo y cuantificación *in vitro* de los *biofilms* bacterianos, pero ninguno está estandarizado lo que dificulta en gran medida poder evaluar en las diferentes especies bacterianas su capacidad de producción de *biofilms*.

Actualmente el método más empleado es el cultivo en placa *microtiter*. No obstante, existen numerosas modificaciones de este método, que pueden afectar a la cantidad de inoculación bacteriana, al medio de crecimiento empleado, el tiempo de incubación y el tipo de colorante utilizado. Todo ello, impide notablemente la posible comparación de los resultados obtenidos entre los diferentes estudios.

En nuestro estudio, los dos métodos utilizados tuvieron un comportamiento muy similar, siendo el método de cultivo en placa *microtiter* el que más concordancia tuvo con la caracterización genotípica de presencia del operón *ica ABCD*, 100% con respecto al 95% observado en el cultivo Agar Rojo Congo. Además, el método de cultivo en placa *microtiter* permitió cuantificar de forma objetiva la capacidad de producción de *biofilms* evitando las tonalidades subjetivas del color, en las colonias producidas en el medio Agar Rojo Congo. La mayoría de los aislados se encontraban en valores de producción moderada, resultados algo inferiores cuando se comparan con los obtenidos por el método Agar Rojo Congo. Esta disminución también se puede apreciar en otros estudios que comparan ambos métodos (160).

No se pudo realizar la visualización *in vivo* de formaciones compatibles con *biofilms* en todas las muestras estudiadas. Sobre las ocho muestras que pudieron analizar se observaron formas bacterianas agrupadas compatibles con la presencia de *biofilms* y en todas ellas se detectó la presencia de *S.aureus* (figura 6.1).

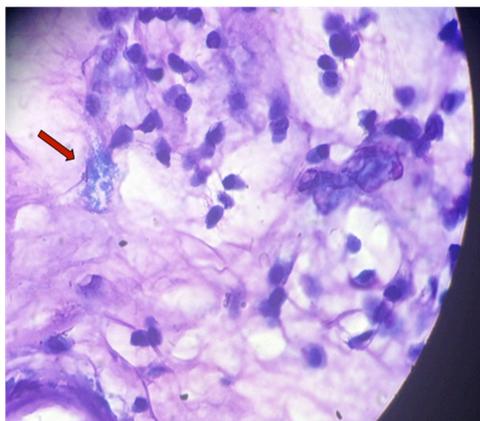


Figura 6.1. Fotografía microscopía óptica (x1000). Tinción Giemsa de pólipos nasal, la flecha indica agrupaciones de bacterias en forma de cocos.

Desde que en 1978 Bill Costerton estableció un nuevo paradigma microbiológico, la teoría del *biofilm*, son muchos los estudios que han asociado la presencia de *biofilms* bacterianos en procesos infecciosos. Recientemente, se han publicado algunos artículos que revelan la presencia de estos *biofilms* en la mucosa nasal de las RSC. La mayoría de estos estudios se han realizado mediante el análisis de imágenes obtenidas por microscopía confocal (CSLM). Uno de los primeros fue el publicado por Psaltis y col. donde analizaron la mucosa del meato medio o de la cavidad etmoidal en 38 pacientes con RSC y en

más de la mitad de los pacientes (17) se obtuvieron imágenes mediante CSLM compatibles con formas bacterianas con arquitectura de *biofilms* (79).

En nuestra serie utilizando el mismo método empleado por Psaltis pudimos realizar este análisis sobre el tejido polipoide en 8 pacientes del grupo de estudio y sobre la mucosa de un paciente del grupo control, intervenido de septorinoplastia. En los 8 casos se detectaron imágenes compatibles con *biofilms* bacterianos y en todos ellos se detectó presencia de *S.aureus*, ya fuese por cultivo bacteriológico o por PCR Real-Time.

Una de los inconvenientes de este método es no poder identificar la especie bacteriana que se está observando en las imágenes del CSLM. Existen unos pocos estudios que han intentado abordar este problema, uno de los más destacados es el realizado por Foreman y col. donde emplearon sondas moleculares específicas que hibridaban con el material genético de especies bacterianas a estudio (sondas FISH) (161).

En nuestro estudio hemos intentado abordar este inconveniente poniendo de manifiesto la presencia en los *S.aureus* aislados, los principales genes implicados en la síntesis del material que compone los *biofilms*, el operón *ica ABCD*. Todos los aislados poseían este operón. Lo que indica la posibilidad de poder desarrollar *biofilms* si se establecen las condiciones ambientales adecuadas para su formación. Como se ha indicado en la introducción existen algunas condiciones de estrés, como altas temperaturas, anaerobiosis, elevada osmolaridad que actúan como inductores de establecimiento de *biofilms*.

No obstante, en la mayoría de los ambientes naturales, las bacterias establecen estructuras de *biofilms* como estilo de vida predominante, lo que les permite adherirse a una superficie y crear un ambiente idóneo para su supervivencia. En el otro extremo, se pueden encontrar bacterias de estilo de vida libre, que en muchas ocasiones proceden de *biofilms*, y que es el principal mecanismo de dispersión y traslocación bacteriana de una nueva superficie a otra, para invadir nuevos nichos (162).

En este sentido, la detección de *biofilms* de *S.aureus* y la presencia en todas las cepas estudiadas de los genes necesarios para poder establecer *biofilms*, es un indicador de que el pólipo nasal es un nicho que cumple las condiciones adecuadas para el establecimiento de *S.aureus*. La mayor prevalencia de *S.aureus* encontrados en las poliposis asociada a ASA triada (62,8%) con respecto a la población general así lo corrobora y hace sospechar que existen algunas características particulares que facilitan su establecimiento.

Estas condiciones especiales están actualmente poco estudiadas, aunque todo parece indicar que pueden estar implicados varios aspectos relacionados con factores dependientes de la bacteria, como son las proteínas de adhesión, los mecanismos reguladores de la formación de *biofilms* o la resistencia al ataque del sistema inmunitario; y también con factores dependientes del hospedador, como la existencia de mayor superficie que permita la adhesión bacteriana o aspectos relacionados con el sistema inmunitario, como la producción de mucinas y enzimas bactericidas, o la desregulación de la inmunidad celular (hipersensibilidad), que se encuentra íntimamente ligado a la respuesta eosinofílica.

Esto explicaría el aumento de prevalencia de *S.aureus*, debido a su mayor adherencia y dificultad de eliminación, también explicaría la mayor observación de estructuras compatibles con *biofilms* en el tejido *in vivo* y por último, la presencia del operón *ica ABCD* en todos los aislados de *S.aureus* asociados a la poliposis nasal también respaldaría esta hipótesis.

Con respecto a la regulación del operón *ica ABCD*, como se ha comentado en la introducción, la regulación de la formación de *biofilms* es muy compleja. Se conocen diferentes vías de comunicación que les permite a las bacterias responder a los factores externos, mediante la estimulación del operón *ica ABCD*. No obstante, pensamos que el estudio de las principales familias involucradas en su regulación, como SarA, SarX, sigmaB o TcaR, podría aclarar si existe una vía específica de formación de *biofilms* en los *S.aureus* aislados en los pólipos nasales.

En nuestro estudio, también analizamos la presencia de la proteína *bap*, que es una proteína íntimamente relacionada con las mastitis crónicas producidas por *S.aureus* en el ganado bovino. Esta proteína es capaz de formar *biofilms* en ausencia del operón *ica ABCD*, y además si aparece conjuntamente con este operón, se ha asociado a una mayor persistencia de las mastitis crónicas (123). Ninguna de las cepas de *S.aureus* estudiadas contenían la proteína *bap*. Estos resultados se observan también en otros estudios publicados (163), lo que corrobora la hipótesis de que esta proteína únicamente se encuentra en las cepas de *S.aureus* presentes en infecciones crónicas de animales.

b) Adhesinas.

En *S.aureus* las proteínas de adhesión, familia MRSRAMM, juegan un importante papel en la capacidad de unión y del establecimiento inicial bacteriano sobre la matriz de las células humanas. Esta

característica de las proteínas MRSRAMM, permite englobarlas dentro de los factores de patogenicidad de *S.aureus*.

Son numerosos los estudios que sugieren que patrones específicos de proteínas de adhesión se asocian a cepas de *S.aureus* aisladas en determinados procesos infecciosos. Los primeros estudios realizados fueron los de Moreillon y col. que relacionaron cepas de *S.aureus* que expresaban receptores específicos frente a fibrinógeno y fibronectina en endocarditis infecciosas; y el estudio de Johansson y col. que observó una mayor presencia de receptores de colágeno, fibronectina y de sialoproteína ósea en cepas de *S.aureus* aisladas en osteomielitis y artritis (164, 165).

En la tabla 6.1 se resume el papel como factor de virulencia de estas proteínas en la colonización o procesos infecciosos.

Papel colonización /infección	Proteína	Mecanismo	Referencia
Colonización piel	<i>clfB</i>	Adhesión a locricrina en epitelio escamosas	(166)
Endocarditis	<i>clfA</i>	Adhesión a trombos	(165)
	<i>fnbA</i>	Adhesión a trombos en invasión a epitelio adyacente	(167)
Mastitis	<i>fnbs</i>	Invasión cél. epiteliales en glándulas mamarias.	(168)
Infección cuerpos extraños	<i>fnbs</i>	Adhesión a parches intraaórticos.	(169)
Sepsis	<i>clfA</i>	Aumento de la supervivencia en sangre	
Artritis séptica	<i>clfA</i>	Aumento de la supervivencia en sangre	(170)
	<i>cna</i>	Adhesión a cartílago	(171)

Tabla 6.1 Principales proteínas de adhesión de *S.aureus* y procesos infecciosos en el que están involucradas.

No obstante, son numerosas las proteínas que forman parte de las llamadas MRSRAMM, y además algunas de estas proteínas son redundantes, es decir, *S.aureus* es capaz de sintetizar diferentes proteínas MRSRAMM, que se unen a un mismo ligando, como por ejemplo las proteínas *fib*, *clfA* y *clfB* que comparten el mismo ligando, el fibrinógeno. Estos dos aspectos dificultan poder encontrar asociaciones entre estas proteínas y los diferentes procesos infecciosos producidos por *S.aureus*.

En nuestro estudio, observamos que las proteínas MRSRAMM mayormente involucradas en los *S.aureus* aislados con poliposis nasal son *clfA* (proteína de unión al fibrinógeno), *eno* (proteína de unión a la laminina) y en un segundo grupo de importancia se encuentran las proteínas *ebpS* (proteína de unión a la elastina), *fib* (proteína de unión al fibrinógeno) y *cna* (proteína de unión al colágeno).

Según estudios realizados por Garín y col. el tejido predominante de los pólipos nasales es el tejido conectivo laxo y en ocasiones se encuentra asociados a tejido conectivo denso, que contiene un mayor predominio de fibras de colágeno involucradas en la remodelación tisular (172). Entre las principales glicoproteínas que forman la matriz extracelular de estos tejidos se encuentran la laminina y la fibronectina. En cuanto a las proteínas fibrilares más abundantes destacan las fibras de elastina.

Por lo que, podemos afirmar que las proteínas de adhesión MRSRAMM, encontradas en los *S.aureus* en nuestro estudio responden directamente a las características particulares del tejido polipoide estudiado.

6.4 Con respecto a las enterotoxinas producidas por *Staphylococcus aureus*

Recientemente algunos autores han postulado la hipótesis de que las toxinas de *S.aureus* y su rol como superantígenos podrían estar involucradas en los cambios observados en la mucosa inflamatoria de las RSCcPN. En un metaanálisis realizado por Ou y col. sobre 12 estudios, concluyó que la detección de IgE específicas frente a las enterotoxinas clásicas (*sea*, *seb*, *sec* y *sed*) es significativamente más elevada en las RSCcPN que en el grupo control. También, encontró más elevado el recuento de linfocitos CD4(+) en los pacientes que presentaban IgE de enterotoxinas. Sin embargo, no se encontraron diferencias en la cantidad de eosinófilos entre los pacientes con IgE específicas de enterotoxinas y el grupo control (173).

En nuestro estudio, encontramos una escasa presencia de enterotoxinas en los *S.aureus* aislados en los pólipos nasales, especialmente cuando estudiamos las enterotoxinas clásicas donde únicamente en 2 aislados (11,7%) se detectó las enterotoxina *sea*.

Al estudiar las enterotoxinas del *cluster egc* (*sem*, *seo*) se aprecia un aumento en la prevalencia, 47,1% en la enterotoxina *sem* y 17,6% en la enterotoxina *seo*.

Existen pocos estudios de la detección de enterotoxinas en las cepas de *S.aureus* aisladas en los pólipos nasales, ya que la mayoría de los estudios hacen referencia a la detección de IgE específicas de

enterotoxinas clásicas de *S.aureus*. No obstante, nuestros datos no alcanzan a los publicados por Van Zele y col que obtuvieron porcentajes del 38,4% en la detección de enterotoxinas clásicas y 73,1% en las enterotoxinas del grupo *egc*. Estas variaciones pueden deberse a que en nuestro estudio, a diferencia del estudio de Van Zele, no estudiamos la enterotoxina clásica *see* ni las enterotoxinas del grupo *egc*, *sel* ni *sek* (174).

Al igual que sucede en la regulación de la formación de *biofilms*, la regulación de la síntesis de enterotoxinas no está bien conocida, aunque todo parece indicar que el sistema *agr* del *quorum-sensing* es el principal regulador (109). Este sistema regulador está ubicado en el gen *agr*. El estudio de las regiones variables de este *locus* ha permitido dividir a los *S.aureus* en cuatro principales genotipos, *agrI*, *agrII*, *agrIII* y *agrIV* (175). Además, se han encontrado que existen asociaciones entre los distintos genotipos de *agr* de los *S.aureus* y los diferentes procesos infecciosos. De esta forma, Jarraud y col. encontraron que el genotipo IV fue el predominante en las enfermedades de *S.aureus* producidas por sus toxinas (síndrome exfoliativo) y que los genotipos *agrI* y *agrII* estuvieron mas asociados a infecciones supurativas (126). Monk y col. encontraron asociación entre los genotipos de *agrI* y los *S.aureus* aislados de abscesos e infecciones asociadas a ADVP (176). En cuanto a los *S.aureus* aislados en los pacientes con pólipos nasales, Van Zele y col. observaron mayor prevalencia de los grupos *agrI* y *agrII* (174).

6.5 Con respecto a las características encontradas en los *Staphylococcus aureus* en las poliposis nasales

Cuando comparamos los patrones genotípicos de las proteínas de adhesión MRSRAMM entre los *S.aureus* aislados en los pólipos nasales y los *S.aureus* de portadores nasales apenas se encuentran diferencias significativas entre ambos grupos.

Cabe destacar el aumento significativo de la presencia de la proteína *cna* con respecto al grupo de colonización nasal que pasa del 5,4% en este grupo, al 41,1% en el grupo de estudio, con una significación de odds ratio 12,6 (1,3-117,5), $p= 0,016$. Estos resultados indican que existe una selección positiva de la presencia de la proteína *cna*, cuyo ligando es el colágeno, en las cepas de *S.aureus* presentes en los pólipos nasales con respecto a las cepas encontradas en los portadores nasales sin poliposis.

No obstante, no hemos encontrado estudios publicados similares que puedan corroborar esta afirmación, por lo que consideramos que se deben ampliar los grupos de estudio para constatar esta hipótesis.

A su vez, hemos encontrado dos proteínas de adhesión, *bbp* y *ebpS*, que se encuentran significativamente en menor prevalencia en el grupo de poliposis nasal que en el grupo de portadores nasales sin poliposis. La presencia de *bbp* en los *S.aureus* del grupo de estudio es muy baja, algo más del 3%, con respecto al grupo control que alcanza el 57% (OD 0,15 (0,33-0,73), 0,013). Tampoco existen estudios que corroboren estos resultados. En el estudio de Tristan y col. encontraron una prevalencia del 38% de esta proteína en cepas de *S.aureus* aisladas de un grupo de pacientes con infecciones hematógenas como la osteomielitis y la artritis (124).

Con respecto a los patrones genotípicos encontrados al estudiar las diferentes enterotoxinas, existe una mayor prevalencia de enterotoxinas en el grupo de portadores sanos que en el grupo de estudio. Nuestros resultados aunque no alcancen los porcentajes que los publicados por Van Zele y col., comparten esta tendencia de menor prevalencia en el grupo de las cepas de *S.aureus* aisladas en los pólipos nasales. Además, al igual que sucede en nuestro estudio apenas encontraron diferencias significativas cuando se analizó cada enterotoxina de forma independiente (174).

La enterotoxina *seo* es la única en la que encontramos diferencias significativas (OD 0,05 (0,01-0,3), $p < 0,01$), con una mayor prevalencia en el grupo de colonización nasal sin poliposis. El estudio realizado por Belkum y col. obtuvieron resultados similares donde encontraron mayor prevalencia de enterotoxinas del grupo *egc* en portadores nasales que en los *S.aureus* asociados a infecciones invasivas (101).

Una de las hipótesis que explicarían la menor presencia de estas enterotoxinas en las cepas de *S.aureus* asociadas a infecciones es que estas toxinas se expresan en menor cantidad y además tienen una menor capacidad inmunogénica con respecto a las denominadas enterotoxinas clásicas, lo que podría explicar porque estas cepas son toleradas en las fosas nasales (177). El estudio de Beckert y col. ofrecen también resultados similares con respecto al total de la prevalencia de enterotoxinas donde no encontraron diferencias significativas entre los *S.aureus* causantes de bacteriemias y las cepas de portadores sanos sin poliposis. No obstante, cuando se analizaron las enterotoxinas individualmente, sí que se observó una mayor prevalencia de enterotoxina *sed* en los *S.aureus* asociados a bacteriemias frente a los *S.aureus* de portadores sanos (178).

Nuestros resultados no explican la presencia tan elevada de IgE específicas frente a las enterotoxinas clásicas que se encuentran en los pacientes con RSCcPN y que han sido publicados en diferentes estudios (82, 139, 173, 179), ya que los *S.aureus* estudiados no presentan una prevalencia tan elevada de enterotoxinas, ni en el grupo de *S.aureus* aislados en los polipos nasales ni en los del grupo de colonización nasal sin poliposis. Además, a diferencia de los *S.aureus* aislados en la piel de las personas con dermatitis atópica donde al menos el 65% secretan algún superantígeno o enterotóxina clásica (180), en ninguna de las series de *S.aureus* aislados en procesos infecciosos de otros estudios revisados, al igual que en nuestro estudio, pueden explicar esta elevada presencia de IgE (140).

Para aclarar esta controversia sería necesario realizar nuevos estudios donde se pueda comparar en un mismo grupo de pacientes afectados por RSCcPN los niveles de IgE específicos frente a enterotoxinas de *S.aureus* y el patrón genotípico de las enterotoxinas tanto clásicas como del *cluster egc* que se encuentren en los *S.aureus* aislados en el pólipos nasales de estos pacientes.

Además, debido a la capacidad de las enterotoxinas de actuar como superantígenos, pudiendo activar directamente a los linfocitos T y estos a su vez estimular una respuesta policlonal de IgE mediada por los linfocitos B, sería interesante en el futuro estudiar si todas las enterotoxinas de *S.aureus* son capaces de generar respuestas policlonales de IgE y en especial las enterotoxinas del *cluster egc*.

7. CONCLUSIONES

1. Existe una elevada prevalencia de *Staphylococcus aureus*, sensibles a los antibióticos estudiados (MSSA), en los pólipos nasales de las personas con rinosinusitis crónica eosinofílica idiopática, especialmente en el grupo diagnosticado de ASA triada. Esta elevada prevalencia permite considerar la inclusión de este grupo en los programas de prevención de infecciones nosocomiales y postquirúrgicas por *Staphylococcus aureus*.
2. El incremento en la detección de *Staphylococcus aureus* mediante PCR Real-time con respecto al cultivo bacteriológico permite concluir que la PCR Real-time debería ser considerado como el método de elección para la detección de *Staphylococcus aureus* en los pacientes con poliposis nasal.
3. Existe una clara correlación entre la detección de *Staphylococcus aureus* y la presencia de un elevado infiltrado eosinofílico en el tejido polipoide.
4. Los *Staphylococcus aureus* asociados a la rinosinusitis crónica con poliposis nasal presentan una moderada capacidad de producir *biofilms*, estudiada mediante el método de adherencia en placa *microtiter* y el método de cultivo en Agar Rojo Congo.
5. Los genes de las proteínas de adhesión más predominantes en los *Staphylococcus aureus* asociados a las poliposis nasales son los genes *eno*, *clfA*, *fib*, *ebpS* y *cna*. Siendo éste último, cuyo ligando es el colágeno, el único que se detecta con mayor prevalencia respecto a *Staphylococcus aureus* procedentes de colonizaciones nasales sin poliposis nasal.
6. Es infrecuente la presencia de genes codificadores para enterotoxinas clásicas y del *cluster egc* en los *Staphylococcus aureus* asociados a las poliposis nasales. La detección de estos genes relacionados con la producción de enterotoxinas en los *Staphylococcus aureus* procedentes de colonizaciones nasales sin poliposis nasal (aun siendo baja) es mayor que los *Staphylococcus aureus* asociados a las poliposis nasales.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Fokkens W, Lund V, Mullol J. EP3OS 2007: European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2007. A summary for otorhinolaryngologists. *Rhinology*. 2007;45(2):97-101.
2. Alobid I, Anton E, Armengot M, Chao J, Colas C, del Cuvillo A, et al. SEAIC-SEORL. Consensus Document on Nasal Polyposis. POLINA Project. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2011;21 Suppl 1:1-58.
3. Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J, Bachert C, Alobid I, Baroody F, et al. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2012. *Rhinol Suppl*. 2012;(23):3 p preceding table of contents, 1-298.
4. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(9):881-90.
5. Collins JG. Prevalence of selected chronic conditions: United States, 1990-1992. *Vital Health Stat* 10. 1997;(194):1-89.
6. Blackwell DL, Collins JG, Coles R. Summary health statistics for U.S. adults: National Health Interview Survey, 1997. *Vital Health Stat* 10. 2002;(205):1-109.
7. Shashy RG, Moore EJ, Weaver A. Prevalence of the chronic sinusitis diagnosis in Olmsted County, Minnesota. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004;130(3):320-3.
8. Hastan D, Fokkens WJ, Bachert C, Newson RB, Bislimovska J, Bockelbrink A, et al. Chronic rhinosinusitis in Europe--an underestimated disease. A GA(2)LEN study. *Allergy*. 2011;66(9):1216-23.
9. Lange B, Thilsing T, Baelum J, Holst R, Kjeldsen A. Diagnosing chronic rhinosinusitis: comparing questionnaire-based and clinical-based diagnosis. *Rhinology*. 2013;51(2):128-36.
10. Bohnhorst I, Jawad S, Lange B, Kjeldsen J, Hansen JM, Kjeldsen AD. Prevalence of chronic rhinosinusitis in a population of patients with gastroesophageal reflux disease. *Am J Rhinol Allergy*. 2015;29(3):70-4.

11. Chen Y, Dales R, Lin M. The epidemiology of chronic rhinosinusitis in Canadians. *Laryngoscope*. 2003;113(7):1199-205.
12. Johansson L, Akerlund A, Holmberg K, Melen I, Bende M. Prevalence of nasal polyps in adults: the Skovde population-based study. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2003;112(7):625-9.
13. Cerejeira R, Veloso-Teles R, Lousan N, Moura CP. Prevalence of nasal polyps in Northern Portugal: a cadaver endoscopic study. *Rhinology*. 2014;52(4):386-9.
14. el Hasnaoui A, Jankowski R, Serrano E, Pribil C, Neukirch F, Klossek JM. Evaluation of a diagnostic questionnaire for nasal polyposis: an observational, cross-sectional study. *Rhinology*. 2004;42(1):1-7.
15. Klossek JM, Neukirch F, Pribil C, Jankowski R, Serrano E, Chanal I, et al. Prevalence of nasal polyposis in France: a cross-sectional, case-control study. *Allergy*. 2005;60(2):233-7.
16. Larsen K, Tos M. The estimated incidence of symptomatic nasal polyps. *Acta Otolaryngol*. 2002;122(2):179-82.
17. Davidsson A, Hellquist HB. The so-called 'allergic' nasal polyp. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 1993;55(1):30-5.
18. Salib RJ, Drake-Lee A, Howarth PH. Allergic rhinitis: past, present and the future. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 2003;28(4):291-303.
19. Demoly P, Bencherioua AM, Crampette L, Dhivert-Donnadieu H, Godard P, Michel FB. From allergic rhinitis to sinus diseases (sinusitis/nasal polyps): epidemiologic and experimental links. *Rev Mal Respir*. 2000;17(5):925-30.
20. Delaney JC. Aspirin idiosyncrasy in patients admitted for nasal polypectomy. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 1976;1(1):27-30.

21. Wilson KF, McMains KC, Orlandi RR. The association between allergy and chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps: an evidence-based review with recommendations. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2014;4(2):93-103.
22. Rugina M, Serrano E, Klossek JM, Crampette L, Stoll D, Bebear JP, et al. Epidemiological and clinical aspects of nasal polyposis in France; the ORLI group experience. *Rhinology.* 2002;40(2):75-9.
23. Munoz del Castillo F, Jurado-Ramos A, Fernandez-Conde BL, Soler R, Barasona MJ, Cantillo E, et al. Allergenic profile of nasal polyposis. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2009;19(2):110-6.
24. Szczeklik A, Nizankowska E, Duplaga M. Natural history of aspirin-induced asthma. AIANE Investigators. European Network on Aspirin-Induced Asthma. *Eur Respir J.* 2000;16(3):432-6.
25. Collins MM, Pang YT, Loughran S, Wilson JA. Environmental risk factors and gender in nasal polyposis. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 2002;27(5):314-7.
26. Settipane GA. Epidemiology of nasal polyps. *Allergy Asthma Proc.* 1996;17(5):231-6.
27. Ogino S, Harada T, Okawachi I, Irifune M, Matsunaga T, Nagano T. Aspirin-induced asthma and nasal polyps. *Acta Otolaryngol Suppl.* 1986;430:21-7.
28. Szczeklik A, Gryglewski RJ, Czerniawska-Mysik G. Clinical patterns of hypersensitivity to nonsteroidal anti-inflammatory drugs and their pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol.* 1977;60(5):276-84.
29. Kowalski ML. Rhinosinusitis and nasal polyposis in aspirin sensitive and aspirin tolerant patients: are they different? *Thorax.* 2000;55 Suppl 2:S84-6.
30. Vallano A, Pedros C. [Aspirin-induced asthma]. *Med Clin (Barc).* 2001;117(7):274-5.

31. Kowalski ML, Grzegorzczak J, Wojciechowska B, Poniatowska M. Intranasal challenge with aspirin induces cell influx and activation of eosinophils and mast cells in nasal secretions of ASA-sensitive patients. *Clin Exp Allergy*. 1996;26(7):807-14.
32. Greisner WA, 3rd, Settipane GA. Hereditary factor for nasal polyps. *Allergy Asthma Proc*. 1996;17(5):283-6.
33. Cohen NA, Wideltitz JS, Chiu AG, Palmer JN, Kennedy DW. Familial aggregation of sinonasal polyps correlates with severity of disease. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2006;134(4):601-4.
34. Alexiou A, Sourtzi P, Dimakopoulou K, Manolis E, Velonakis E. Nasal polyps: heredity, allergies, and environmental and occupational exposure. *J Otolaryngol Head Neck Surg*. 2011;40(1):58-63.
35. Benito Pescador D, Isidoro-Garcia M, Garcia-Solaesa V, Pascual de Pedro M, Sanz C, Hernandez-Hernandez L, et al. Genetic association study in nasal polyposis. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2012;22(5):331-40.
36. Kim J, Hanley JA. The role of woodstoves in the etiology of nasal polyposis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2002;128(6):682-6.
37. Sanchez-Segura A, Brieva JA, Rodriguez C. T lymphocytes that infiltrate nasal polyps have a specialized phenotype and produce a mixed TH1/TH2 pattern of cytokines. *J Allergy Clin Immunol*. 1998;102(6 Pt 1):953-60.
38. Van Zele T, Claeys S, Gevaert P, Van Maele G, Holtappels G, Van Cauwenberge P, et al. Differentiation of chronic sinus diseases by measurement of inflammatory mediators. *Allergy*. 2006;61(11):1280-9.
39. Jokl E. Paul Ehrlich; man and scientist. *Bull N Y Acad Med*. 1954;30(12):968-75.
40. Lehrer RI, Szklarek D, Barton A, Ganz T, Hamann KJ, Gleich GJ. Antibacterial properties of eosinophil major basic protein and eosinophil cationic protein. *J Immunol*. 1989;142(12):4428-34.

41. Frigas E, Loegering DA, Solley GO, Farrow GM, Gleich GJ. Elevated levels of the eosinophil granule major basic protein in the sputum of patients with bronchial asthma. *Mayo Clin Proc.* 1981;56(6):345-53.
42. Schleimer RP, Kato A, Peters A, Conley D, Kim J, Liu MC, et al. Epithelium, inflammation, and immunity in the upper airways of humans: studies in chronic rhinosinusitis. *Proc Am Thorac Soc.* 2009;6(3):288-94.
43. Liu TY, Dong Z. [Effect of proinflammatory cytokines on human leucocyte antigen expression of epithelial cells of nasal polyps]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi.* 2003;38(3):183-6.
44. Shin SH, Lee YH, Jeon CH. Protease-dependent activation of nasal polyp epithelial cells by airborne fungi leads to migration of eosinophils and neutrophils. *Acta Otolaryngol.* 2006;126(12):1286-94.
45. Sachse F, Becker K, von Eiff C, Metz D, Rudack C. *Staphylococcus aureus* invades the epithelium in nasal polyposis and induces IL-6 in nasal epithelial cells in vitro. *Allergy.* 2010;65(11):1430-7.
46. Jahnsen FL, Haraldsen G, Aanesen JP, Haye R, Brandtzaeg P. Eosinophil infiltration is related to increased expression of vascular cell adhesion molecule-1 in nasal polyps. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1995;12(6):624-32.
47. Bachert C, Wagenmann M, Hauser U, Rudack C. IL-5 synthesis is upregulated in human nasal polyp tissue. *J Allergy Clin Immunol.* 1997;99(6 Pt 1):837-42.
48. Seto H, Suzaki H, Shioda S. Immunohistochemical localization of eotaxin immunoreactivity in nasal polyps. *Acta Otolaryngol Suppl.* 2004;(553):99-104.
49. Perez-Novo CA, Watelet JB, Claeys C, Van Cauwenberge P, Bachert C. Prostaglandin, leukotriene, and lipoxin balance in chronic rhinosinusitis with and without nasal polyposis. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115(6):1189-96.

50. Moniaux N, Escande F, Porchet N, Aubert JP, Batra SK. Structural organization and classification of the human mucin genes. *Front Biosci.* 2001;6:D1192-206.
51. Kim DH, Chu HS, Lee JY, Hwang SJ, Lee SH, Lee HM. Up-regulation of MUC5AC and MUC5B mucin genes in chronic rhinosinusitis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004;130(6):747-52.
52. Ding GQ, Zheng CQ. The expression of MUC5AC and MUC5B mucin genes in the mucosa of chronic rhinosinusitis and nasal polyposis. *Am J Rhinol.* 2007;21(3):359-66.
53. Ding GQ, Zheng CQ, Bagga SS. Up-regulation of the mucosal epidermal growth factor receptor gene in chronic rhinosinusitis and nasal polyposis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2007;133(11):1097-103.
54. Burgel PR, Escudier E, Coste A, Dao-Pick T, Ueki IF, Takeyama K, et al. Relation of epidermal growth factor receptor expression to goblet cell hyperplasia in nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;106(4):705-12.
55. Shao MX, Ueki IF, Nadel JA. Tumor necrosis factor alpha-converting enzyme mediates MUC5AC mucin expression in cultured human airway epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(20):11618-23.
56. Soyka MB, Wawrzyniak P, Eiwegger T, Holzmann D, Treis A, Wanke K, et al. Defective epithelial barrier in chronic rhinosinusitis: the regulation of tight junctions by IFN-gamma and IL-4. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;130(5):1087-96 e10.
57. Richer SL, Truong-Tran AQ, Conley DB, Carter R, Vermynen D, Grammer LC, et al. Epithelial genes in chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps. *Am J Rhinol.* 2008;22(3):228-34.
58. Woods CM, Lee VS, Hussey DJ, Irandoust S, Ooi EH, Tan LW, et al. Lysozyme expression is increased in the sinus mucosa of patients with chronic rhinosinusitis. *Rhinology.* 2012;50(2):147-56.
59. Psaltis AJ, Bruhn MA, Ooi EH, Tan LW, Wormald PJ. Nasal mucosa expression of lactoferrin in patients with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope.* 2007;117(11):2030-5.

60. Psaltis AJ, Wormald PJ, Ha KR, Tan LW. Reduced levels of lactoferrin in biofilm-associated chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope*. 2008;118(5):895-901.
61. Tsou YA, Peng MT, Wu YF, Lai CH, Lin CD, Tai CJ, et al. Decreased PLUNC expression in nasal polyps is associated with multibacterial colonization in chronic rhinosinusitis patients. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2014;271(2):299-304.
62. Seshadri S, Lin DC, Rosati M, Carter RG, Norton JE, Suh L, et al. Reduced expression of antimicrobial PLUNC proteins in nasal polyp tissues of patients with chronic rhinosinusitis. *Allergy*. 2012;67(7):920-8.
63. Lee SH, Kim JE, Lim HH, Lee HM, Choi JO. Antimicrobial defensin peptides of the human nasal mucosa. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2002;111(2):135-41.
64. Tieu DD, Kern RC, Schleimer RP. Alterations in epithelial barrier function and host defense responses in chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(1):37-42.
65. Tieu DD, Peters AT, Carter RG, Suh L, Conley DB, Chandra R, et al. Evidence for diminished levels of epithelial psoriasin and calprotectin in chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(3):667-75.
66. Chen PH, Fang SY. The expression of human antimicrobial peptide LL-37 in the human nasal mucosa. *Am J Rhinol*. 2004;18(6):381-5.
67. Thienhaus ML, Wohlers J, Podschun R, Hedderich J, Ambrosch P, Laudien M. Antimicrobial peptides in nasal secretion and mucosa with respect to *Staphylococcus aureus* colonization in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Rhinology*. 2011;49(5):554-61.
68. Sha Q, Truong-Tran AQ, Plitt JR, Beck LA, Schleimer RP. Activation of airway epithelial cells by toll-like receptor agonists. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004;31(3):358-64.

69. Lane AP, Truong-Tran QA, Schleimer RP. Altered expression of genes associated with innate immunity and inflammation in recalcitrant rhinosinusitis with polyps. *Am J Rhinol*. 2006;20(2):138-44.
70. Pitzurra L, Bellocchio S, Nocentini A, Bonifazi P, Scardazza R, Gallucci L, et al. Antifungal immune reactivity in nasal polyposis. *Infect Immun*. 2004;72(12):7275-81.
71. Schlosser RJ, Mulligan RM, Casey SE, Varela JC, Harvey RJ, Atkinson C. Alterations in gene expression of complement components in chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol Allergy*. 2010;24(1):21-5.
72. Gaunsbaek MQ, Lange B, Kjeldsen AD, Svane-Knudsen V, Skjoedt K, Henriksen ML, et al. Complement defects in patients with chronic rhinosinusitis. *PLoS One*. 2012;7(11):e47383.
73. Shi LL, Xiong P, Zhang L, Cao PP, Liao B, Lu X, et al. Features of airway remodeling in different types of Chinese chronic rhinosinusitis are associated with inflammation patterns. *Allergy*. 2013;68(1):101-9.
74. Van Bruaene N, Derycke L, Perez-Novo CA, Gevaert P, Holtappels G, De Ruyck N, et al. TGF-beta signaling and collagen deposition in chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(2):253-9.
75. Li X, Meng J, Qiao X, Liu Y, Liu F, Zhang N, et al. Expression of TGF, matrix metalloproteinases, and tissue inhibitors in Chinese chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(5):1061-8.
76. Kou W, Hu GH, Yao HB, Wang XQ, Shen Y, Kang HY, et al. Transforming growth factor-beta1 promotes Treg commitment in nasal polyposis after intranasal steroid treatment. *Inflamm Res*. 2013;62(3):283-9.
77. Bhattacharyya N, Kepnes LJ. The microbiology of recurrent rhinosinusitis after endoscopic sinus surgery. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1999;125(10):1117-20.
78. Wertheim HF, Verbrugh HA. Global prevalence of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 2006;368(9550):1866; author reply -7.

79. Psaltis AJ, Ha KR, Beule AG, Tan LW, Wormald PJ. Confocal scanning laser microscopy evidence of biofilms in patients with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope*. 2007;117(7):1302-6.
80. Foreman A, Jervis-Bardy J, Wormald PJ. Do biofilms contribute to the initiation and recalcitrance of chronic rhinosinusitis? *Laryngoscope*. 2011;121(5):1085-91.
81. Bachert C, Gevaert P, van Cauwenberge P. *Staphylococcus aureus* superantigens and airway disease. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2002;2(3):252-8.
82. Bachert C, van Steen K, Zhang N, Holtappels G, Cattaert T, Maus B, et al. Specific IgE against *Staphylococcus aureus* enterotoxins: an independent risk factor for asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(2):376-81.
83. Wedi B, Wiczorek D, Stunkel T, Breuer K, Kapp A. Staphylococcal exotoxins exert proinflammatory effects through inhibition of eosinophil apoptosis, increased surface antigen expression (CD11b, CD45, CD54, and CD69), and enhanced cytokine-activated oxidative burst, thereby triggering allergic inflammatory reactions. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;109(3):477-84.
84. Bachert C, Gevaert P, van Cauwenberge P. *Staphylococcus aureus* enterotoxins: a key in airway disease? *Allergy*. 2002;57(6):480-7.
85. Weschta M, Rimek D, Formanek M, Polzehl D, Riechelmann H. Local production of *Aspergillus fumigatus* specific immunoglobulin E in nasal polyps. *Laryngoscope*. 2003;113(10):1798-802.
86. Ricchetti A, Landis BN, Maffioli A, Giger R, Zeng C, Lacroix JS. Effect of anti-fungal nasal lavage with amphotericin B on nasal polyposis. *J Laryngol Otol*. 2002;116(4):261-3.
87. Naghibzadeh B, Razmpa E, Alavi S, Emami M, Shidfar M, Naghibzadeh G, et al. Prevalence of fungal infection among Iranian patients with chronic sinusitis. *Acta Otorhinolaryngol Ital*. 2011;31(1):35-8.
88. Ogston A. Report upon Micro-Organisms in Surgical Diseases. *Br Med J*. 1881;1(1054):369 b2-75.

89. Ogston A. Micrococcus Poisoning. *J Anat Physiol*. 1882;17(Pt 1):24-58.
90. Cheyne WW. Lectures on Suppuration and Septic Diseases. *Br Med J*. 1888;1(1419):524-30.
91. Cheyne WW. Lectures on Suppuration and Septic Diseases. *Br Med J*. 1888;1(1418):452-8.
92. Hidalgo-Garcia FI, Galarraga-Gay Mdel C, Gomez-Fontanil M, Saez-Nieto JA. Catalase-negative *Staphylococcus aureus subsp. aureus*: a new case in Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(9):708-9.
93. Gilbert I. Dissociation in an Encapsulated *Staphylococcus*. *J Bacteriol*. 1931;21(3):157-60.
94. O'Riordan K, Lee JC. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17(1):218-34.
95. Aly R, Shinefield HR, Litz C, Maibach HI. Role of teichoic acid in the binding of *Staphylococcus aureus* to nasal epithelial cells. *J Infect Dis*. 1980;141(4):463-5.
96. Gordon RJ, Lowy FD. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis*. 2008;46 Suppl 5:S350-9.
97. Heying R, van de Gevel J, Que YA, Moreillon P, Beekhuizen H. Fibronectin-binding proteins and clumping factor A in *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis: FnBPA is sufficient to activate human endothelial cells. *Thromb Haemost*. 2007;97(4):617-26.
98. Elasri MO, Thomas JR, Skinner RA, Blevins JS, Beenken KE, Nelson CL, et al. *Staphylococcus aureus* collagen adhesin contributes to the pathogenesis of osteomyelitis. *Bone*. 2002;30(1):275-80.
99. de Bentzmann S, Tristan A, Etienne J, Brousse N, Vandenesch F, Lina G. *Staphylococcus aureus* isolates associated with necrotizing pneumonia bind to basement membrane type I and IV collagens and laminin. *J Infect Dis*. 2004;190(8):1506-15.

100. Kang M, Ko YP, Liang X, Ross CL, Liu Q, Murray BE, et al. Collagen-binding microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule (MSCRAMM) of Gram-positive bacteria inhibit complement activation via the classical pathway. *J Biol Chem*. 2013;288(28):20520-31.
101. van Belkum A, Melles DC, Snijders SV, van Leeuwen WB, Wertheim HF, Nouwen JL, et al. Clonal distribution and differential occurrence of the enterotoxin gene cluster, *egc*, in carriage- versus bacteremia-associated isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2006;44(4):1555-7.
102. Montanaro L, Poggi A, Visai L, Ravaioli S, Campoccia D, Speziale P, et al. Extracellular DNA in biofilms. *Int J Artif Organs*. 2011;34(9):824-31.
103. Cue D, Lei MG, Lee CY. Genetic regulation of the intercellular adhesion locus in staphylococci. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012;2:38.
104. Fitzpatrick F, Humphreys H, O'Gara JP. Evidence for *icaADBC*-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J Clin Microbiol*. 2005;43(4):1973-6.
105. Rachid S, Ohlsen K, Witte W, Hacker J, Ziebuhr W. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(12):3357-63.
106. Conlon KM, Humphreys H, O'Gara JP. *icaR* encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of *ica* operon expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol*. 2002;184(16):4400-8.
107. Conlon KM, Humphreys H, O'Gara JP. Regulation of *icaR* gene expression in *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol Lett*. 2002;216(2):171-7.
108. Jefferson KK, Pier DB, Goldmann DA, Pier GB. The teicoplanin-associated locus regulator (TcaR) and the intercellular adhesin locus regulator (IcaR) are transcriptional inhibitors of the *ica* locus in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2004;186(8):2449-56.

109. Vuong C, Saenz HL, Gotz F, Otto M. Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. J Infect Dis. 2000;182(6):1688-93.
110. Beenken KE, Mrak LN, Griffin LM, Zielinska AK, Shaw LN, Rice KC, et al. Epistatic relationships between sarA and agr in *Staphylococcus aureus* biofilm formation. PLoS One. 2010;5(5):e10790.
111. Chang YM, Jeng WY, Ko TP, Yeh YJ, Chen CK, Wang AH. Structural study of TcaR and its complexes with multiple antibiotics from *Staphylococcus epidermidis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(19):8617-22.
112. Valle J, Toledo-Arana A, Berasain C, Ghigo JM, Amorena B, Penades JR, et al. SarA and not sigmaB is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol. 2003;48(4):1075-87.
113. Scherr TD, Heim CE, Morrison JM, Kielian T. Hiding in Plain Sight: Interplay between Staphylococcal Biofilms and Host Immunity. Front Immunol. 2014;5:37.
114. Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. Int J Antimicrob Agents. 2010;35(4):322-32.
115. Lewis K, Epstein S, D'Onofrio A, Ling LL. Uncultured microorganisms as a source of secondary metabolites. J Antibiot (Tokyo). 2010;63(8):468-76.
116. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science. 1999;284(5418):1318-22.
117. Lildholdt T, Rundcrantz H, Lindqvist N. Efficacy of topical corticosteroid powder for nasal polyps: a double-blind, placebo-controlled study of budesonide. Clin Otolaryngol Allied Sci. 1995;20(1):26-30.
118. Lund VJ, Kennedy DW. Staging for rhinosinusitis. Otolaryngol Head Neck Surg. 1997;117(3 Pt 2):S35-40.

119. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol.* 1989;42(8):872-4.
120. Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukic S, Cirkovic I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS.* 2007;115(8):891-9.
121. Mack D, Rohde H, Dobinsky S, Riedewald J, Nedelmann M, Knobloch JK, et al. Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. *Infect Immun.* 2000;68(7):3799-807.
122. Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J Clin Microbiol.* 2001;39(6):2151-6.
123. Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penades JR. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol.* 2001;183(9):2888-96.
124. Tristan A, Ying L, Bes M, Etienne J, Vandenesch F, Lina G. Use of multiplex PCR to identify *Staphylococcus aureus* adhesins involved in human hematogenous infections. *J Clin Microbiol.* 2003;41(9):4465-7.
125. Becker K, Roth R, Peters G. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. *J Clin Microbiol.* 1998;36(9):2548-53.
126. Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, et al. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infect Immun.* 2002;70(2):631-41.

127. Mehrotra M, Wang G, Johnson WM. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J Clin Microbiol.* 2000;38(3):1032-5.
128. Zernotti ME, Angel Villegas N, Roques Revol M, Baena-Cagnani CE, Arce Miranda JE, Paredes ME, et al. Evidence of bacterial biofilms in nasal polyposis. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2010;20(5):380-5.
129. Toth L, Csomor P, Sziklai I, Karosi T. Biofilm detection in chronic rhinosinusitis by combined application of hematoxylin-eosin and gram staining. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2011;268(10):1455-62.
130. Sanclement JA, Webster P, Thomas J, Ramadan HH. Bacterial biofilms in surgical specimens of patients with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope.* 2005;115(4):578-82.
131. Johnson AP. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the European landscape. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66 Suppl 4:iv43-iv8.
132. Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance?. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(4):260-71.
133. Laurent F, Lelievre H, Cornu M, Vandenesch F, Carret G, Etienne J, et al. Fitness and competitive growth advantage of new gentamicin-susceptible MRSA clones spreading in French hospitals. *J Antimicrob Chemother.* 2001;47(3):277-83.
134. Otto M. *Staphylococcus epidermidis*--the 'accidental' pathogen. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7(8):555-67.
135. Alvarez Lerma F, Olaechea Astigarraga P, Palomar Martinez M, Insausti Ordenana J, Lopez Pueyo MJ. Epidemiology of the primary and vascular catheter-related bacteriemias in critical patients admitted to an Intensive Medicine Department. *Med Intensiva.* 2010;34(7):437-45.

136. von Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. N Engl J Med. 2001;344(1):11-6.
137. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. Lancet Infect Dis. 2005;5(12):751-62.
138. Kuehnert MJ, Kruszon-Moran D, Hill HA, McQuillan G, McAllister SK, Fosheim G, et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in the United States, 2001-2002. J Infect Dis. 2006;193(2):172-9.
139. Zhang N, Gevaert P, van Zele T, Perez-Novo C, Patou J, Holtappels G, et al. An update on the impact of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in chronic sinusitis with nasal polyposis. Rhinology. 2005;43(3):162-8.
140. Corriveau MN, Zhang N, Holtappels G, Van Roy N, Bachert C. Detection of *Staphylococcus aureus* in nasal tissue with peptide nucleic acid-fluorescence in situ hybridization. Am J Rhinol Allergy. 2009;23(5):461-5.
141. Farley JE, Stamper PD, Ross T, Cai M, Speser S, Carroll KC. Comparison of the BD GeneOhm methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) PCR assay to culture by use of BBL CHROMagar MRSA for detection of MRSA in nasal surveillance cultures from an at-risk community population. J Clin Microbiol. 2008;46(2):743-6.
142. Tan NC, Foreman A, Jardeleza C, Douglas R, Vreugde S, Wormald PJ. Intracellular *Staphylococcus aureus*: the Trojan horse of recalcitrant chronic rhinosinusitis? Int Forum Allergy Rhinol. 2013;3(4):261-6.
143. Tudorache V, Mihaicuta S, Potre R, Melcescu E. Is Widal syndrome always a severe disease?. Pneumologia. 2006;55(3):105-8.
144. Graham PL, 3rd, Lin SX, Larson EL. A U.S. population-based survey of *Staphylococcus aureus* colonization. Ann Intern Med. 2006;144(5):318-25.

145. Van Zele T, Gevaert P, Watelet JB, Claeys G, Holtappels G, Claeys C, et al. *Staphylococcus aureus* colonization and IgE antibody formation to enterotoxins is increased in nasal polyposis. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114(4):981-3.
146. Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP. Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Crit Care Med*. 1999;27(5):887-92.
147. Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP. Nosocomial infections in pediatric intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Pediatrics*. 1999;103(4):e39.
148. Kluytmans JA, Wertheim HF. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and prevention of nosocomial infections. *Infection*. 2005;33(1):3-8.
149. Sarma JB, Marshall B, Cleeve V, Tate D, Oswald T. Impact of universal screening on MRSA bacteremias in a single acute NHS organisation (2006-12): interrupted time-series analysis. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2013;2(1):2.
150. Collins J, Raza M, Ford M, Hall L, Brydon S, Gould FK. Review of a three-year meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* screening programme. *J Hosp Infect*. 2011;78(2):81-5.
151. Wei JL, Kita H, Sherris DA, Kern EB, Weaver A, Ponikau JU. The chemotactic behavior of eosinophils in patients with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope*. 2003;113(2):303-6.
152. Prades JM, Chelikh L, Dumollard JM, Merzougui N, Timoshenko A, Martin C. Nasal polyposis: quantification of the eosinophil and granulocyte infiltrates. Anatomico-clinical correlations. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac*. 2003;120(5):279-85.
153. Jankowski R, Bouchoua F, Coffinet L, Vignaud JM. Clinical factors influencing the eosinophil infiltration of nasal polyps. *Rhinology*. 2002;40(4):173-8.

154. Rodriguez-Fernandez A, Andaluz-Ojeda D, Almansa R, Justel M, Eiros JM, Ortiz de Lejarazu R. Eosinophil as a protective cell in *S. aureus* ventilator-associated pneumonia. *Mediators Inflamm.* 2013;1529-43.
155. Hosoki K, Nakamura A, Kainuma K, Sugimoto M, Nagao M, Hiraguchi Y, et al. Differential activation of eosinophils by bacteria associated with asthma. *Int Arch Allergy Immunol.* 2013;161 Suppl 2:16-22.
156. Hosoki K, Nakamura A, Nagao M, Hiraguchi Y, Tanida H, Tokuda R, et al. *Staphylococcus aureus* directly activates eosinophils via platelet-activating factor receptor. *J Leukoc Biol.* 2012;92(2):333-41.
157. Minai-Fleminger Y, Gangwar RS, Migalovich-Sheikhet H, Seaf M, Leibovici V, Hollander N, et al. The CD48 receptor mediates *Staphylococcus aureus* human and murine eosinophil activation. *Clin Exp Allergy.* 2014;44(11):1335-46.
158. Mrowka-Kata K, Czecior E, Kata D, Namyslowski G, Dziechciarz-Werbowska J, Sowa P. Current view on nasal polyps management in Samter's triad patients. *Otolaryngol Pol.* 2012;66(6):373-8.
159. Xu JJ, Sowerby L, Rotenberg BW. Aspirin desensitization for aspirin-exacerbated respiratory disease (Samter's Triad): a systematic review of the literature. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2013;3(11):915-20.
160. Atshan SS, Nor Shamsudin M, Sekawi Z, Lung LT, Hamat RA, Karunanidhi A, et al. Prevalence of adhesion and regulation of biofilm-related genes in different clones of *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Biotechnol.* 2012; (9): 769-72.
161. Foreman A, Psaltis AJ, Tan LW, Wormald PJ. Characterization of bacterial and fungal biofilms in chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol Allergy.* 2009;23(6):556-61
162. Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol.* 2000;182(10):2675-9.

163. Vautor E, Abadie G, Pont A, Thiery R. Evaluation of the presence of the *bap* gene in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from human and animals species. *Vet Microbiol.* 2008;127(3-4):407-11.
164. Johansson A, Flock JI, Svensson O. Collagen and fibronectin binding in experimental staphylococcal osteomyelitis. *Clin Orthop Relat Res.* 2001;(382):241-6.
165. Moreillon P, Entenza JM, Francioli P, McDevitt D, Foster TJ, Francois P, et al. Role of *Staphylococcus aureus* coagulase and clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis. *Infect Immun.* 1995;63(12):4738-43.
166. Mulcahy ME, Geoghegan JA, Monk IR, O'Keeffe KM, Walsh EJ, Foster TJ, et al. Nasal colonisation by *Staphylococcus aureus* depends upon clumping factor B binding to the squamous epithelial cell envelope protein loricrin. *PLoS Pathog.* 2012;8(12):e1003092.
167. Que YA, Haefliger JA, Piroth L, Francois P, Widmer E, Entenza JM, et al. Fibrinogen and fibronectin binding cooperate for valve infection and invasion in *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis. *J Exp Med.* 2005;201(10):1627-35.
168. Brouillette E, Grondin G, Shkreta L, Lacasse P, Talbot BG. In vivo and in vitro demonstration that *Staphylococcus aureus* is an intracellular pathogen in the presence or absence of fibronectin-binding proteins. *Microb Pathog.* 2003;35(4):159-68.
169. Arrecubieta C, Asai T, Bayern M, Loughman A, Fitzgerald JR, Shelton CE, et al. The role of *Staphylococcus aureus* adhesins in the pathogenesis of ventricular assist device-related infections. *J Infect Dis.* 2006;193(8):1109-19.
170. Palmqvist N, Foster T, Tarkowski A, Josefsson E. Protein A is a virulence factor in *Staphylococcus aureus* arthritis and septic death. *Microb Pathog.* 2002;33(5):239-49.
171. Patti JM, Bremell T, Krajewska-Pietrasik D, Abdelnour A, Tarkowski A, Ryden C, et al. The *Staphylococcus aureus* collagen adhesin is a virulence determinant in experimental septic arthritis. *Infect Immun.* 1994;62(1):152-61.

172. Garin L, Armengot M, Alba JR, Carda C. Correlations between clinical and histological aspects in nasal polyposis. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2008;59(7):315-20.
173. Ou J, Wang J, Xu Y, Tao ZZ, Kong YG, Chen SM, et al. *Staphylococcus aureus* superantigens are associated with chronic rhinosinusitis with nasal polyps: a meta-analysis. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2014;271(10):2729-36.
174. Van Zele T, Vaneechoutte M, Holtappels G, Gevaert P, van Cauwenberge P, Bachert C. Detection of enterotoxin DNA in *Staphylococcus aureus* strains obtained from the middle meatus in controls and nasal polyp patients. *Am J Rhinol.* 2008;22(3):223-7.
175. Gilot P, Lina G, Cochard T, Poutrel B. Analysis of the genetic variability of genes encoding the RNA III-activating components Agr and TRAP in a population of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis. *J Clin Microbiol.* 2002;40(11):4060-7.
176. Monk AB, Curtis S, Paul J, Enright MC. Genetic analysis of *Staphylococcus aureus* from intravenous drug user lesions. *J Med Microbiol.* 2004;53(Pt 3):223-7.
177. Ferry T, Thomas D, Genestier AL, Bes M, Lina G, Vandenesch F, et al. Comparative prevalence of superantigen genes in *Staphylococcus aureus* isolates causing sepsis with and without septic shock. *Clin Infect Dis.* 2005;41(6):771-7.
178. Becker K, Friedrich AW, Lubritz G, Weilert M, Peters G, Von Eiff C. Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens. *J Clin Microbiol.* 2003;41(4):1434-9.
179. Bachert C, Gevaert P, Holtappels G, Johansson SG, van Cauwenberge P. Total and specific IgE in nasal polyps is related to local eosinophilic inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;107(4):607-14.
180. Breuer K, Kapp A, Werfel T. Bacterial infections and atopic dermatitis. *Allergy.* 2001;56(11):1034-41.

9. ANEXO

TABLAS DE RESULTADOS

CASO	EDAD	SEXO	GRUPO	CIR.PRE	EOSINO	GRADO	EVOLUCION	DETECC	BDMAX	SAUR
1	50	0	3	1	3	3	3	2	1	1
2	69	1	3	0	2	2	3	2	1	1
3	73	1	3	1	3	3	10	2	1	1
4	74	1	3	0	1	1	2	0	0	0
5	49	0	3	2	3	3	12	2	1	1
6	64	1	3	2	3	3	16	2	1	1
7	56	0	1	0	1	3	15	0	0	0
8	58	0	3	0	3	2	2	1	1	0
9	54	0	2	1	2	2	4	1	1	0
10	53	1	3	0	3	3	1	0	0	0
11	35	1	1	1	1	3	8	0	0	0
12	61	0	1	0	3	1	2	0	0	0
13	69	1	3	1	1	3	10	2	1	1
14	74	0	1	1	1	3	2	0	0	0
15	61	1	3	1	1	3	4	0	0	0
16	60	0	2	1	2	3	2	0	0	0
17	37	0	1	1	2	3	2	0	0	0
18	62	0	2	0	3	2	2	1	1	0
19	44	0	3	2	3	2	7	0	0	0
20	71	1	1	0	3	3	4	0	0	0
21	35	0	2	1	0	1	2	1	1	0
22	69	1	3	2	3	3	19	1	1	0
23	49	1	3	2	3	2	10	0	0	0
24	53	0	3	2	2	3	12	0	0	0
25	52	0	3	1	2	3	8	1	1	0
26	45	0	2	1	2	3	2	0	0	0
27	45	0	3	1	3	3	7	1	1	0
28	51	1	3	2	3	2	13	2	1	1
29	39	1	3	1	2	2	2	1	1	0
30	79	0	3	0	3	3	1	0	0	0
31	35	1	3	4	3	3	8	2	1	1
32	69	0	1	0	1	0	8	0	0	0
33	60	0	3	3	2	3	14	1	1	0
34	33	1	3	3	3	2	16	2	1	1
35	61	1	3	0	2	3	1	0	0	0
36	43	0	1	0	1	2	3	0	0	0

37	69	1	3	1	2	1	3	0	0	0
38	40	0	1	2	1	1	8	0	0	0
39	60	0	2	0	1	2	1	0	0	0
40	68	0	1	1	1	3	5	0	0	0
41	63	0	1	0	0	2	1	2	1	1
42	25	1	3	0	1	3	3	2	1	1
43	51	1	3	1	3	3	8	2	1	1
44	55	1	2	0	0	1	1	0	0	
45	71	0	2	0	1	1	2	2	1	1
46	64	0	2	0	1	1	2	0	0	0
47	56	0	1	0	NA	1	2	0	0	0
48	55	0	1	1	0	2	8	2	1	1
49	71	1	2	0	0	1	0	0	0	0
50	51	0	1	1	1	3	13	0	0	0
51	64	0	3	0	0	1	2	2	1	1
52	44	0	3	2	3	3	2	2	1	1
53	55	0	1	0	1	2	5	0	0	0
54	48	0	1	1	1	1	2	2	1	1
55	37	0	2	0	NA	3	2	0	0	0

NORMALIDAD DE LA VARIABLE EDAD

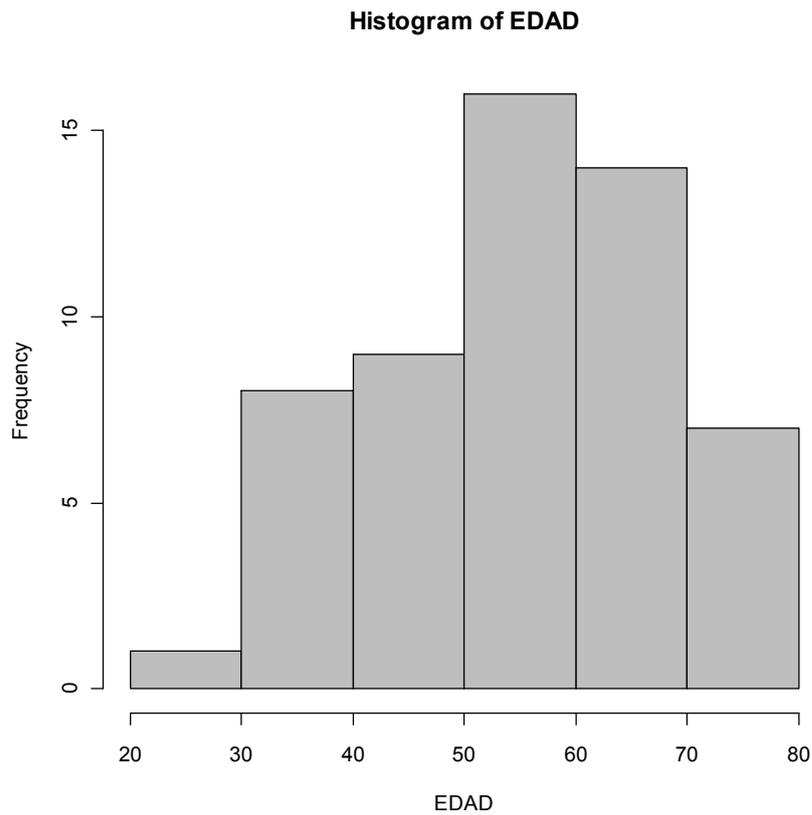
Min.	1st Qu.	Median	Mean	3rd Qu.	Max.
25.00	46.50	55.00	55.25	64.00	79.00

Estadísticos

EDAD		
N	Válidos	55
	Perdidos	0
Media		55,25
Mediana		55,00
Desv. típ.		12,617
Mínimo		25
Máximo		79
Percentiles	25	45,00
	50	55,00
	75	64,00

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

- a La distribución de contraste es la Normal.
b Se han calculado a partir de los datos.



TEST de normalidad (Shapiro-Wilk)

data: EDAD

W = 0.9754, p-value = 0.3175

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra. Test de normalidad.

- a La distribución de contraste es la Normal.
- b Se han calculado a partir de los datos.

		EDAD
N		55
Parámetros normales(a,b)	Media	55,25
	Desviación típica	12,617
Diferencias más extremas	Absoluta	,083
	Positiva	,053
	Negativa	-,083
Z de Kolmogorov-Smirnov		,615
Sig. asintót. (bilateral)		,844

Tablas de contingencia GRUPO CLÍNICO-SEXO

Resumen del procesamiento de los casos

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
GRUPO4 * SEXO	55	100,0%	0	,0%	55	100,0%

Tabla de Frecuencias

Tabla de contingencia GRUPO4 * SEXO

Recuento

	SEXO	SEXO		Total
		0	1	
GRUPO4 0		23	4	27
4		11	17	28
Total		34	21	55

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	12,269 ^b	1	,000		
Corrección por continuidad	10,401	1	,001		
Razón de verosimilitudes	12,972	1	,000		
Estadístico exacto de Fisher				,001	,000
N de casos válidos	55				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 10,31.

Regresión

Variables introducidas/eliminadas^b

Modelo	Variables introducidas	Variables eliminadas	Método
1	GRUPO ^a	.	Introducir

a. Todas las variables solicitadas introducidas

b. Variable dependiente: CGIAPRE

Resumen del modelo

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación
1	,339 ^a	,115	,098	,896

a. Variables predictoras: (Constante), GRUPO

ANOVA^b

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	5,529	1	5,529	6,882	,011 ^a
	Residual	42,580	53	,803		
	Total	48,109	54			

a. Variables predictoras: (Constante), GRUPO

b. Variable dependiente: CGIAPRE

Coefficientes^a

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.	Intervalo de confianza para B al 95%	
	B	Error típ.	Beta			Límite inferior	Límite superior
1	(Constante)	,120	,311	,385	,702	-,505	,744
	GRUPO	,259	,099	,339	,011	,061	,457

a. Variable dependiente: CGIAPRE

Tablas de contingencia Grupo Clínico-BDMax**Resumen del procesamiento de los casos**

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
GRUPO4 * BDMAX	55	100,0%	0	,0%	55	100,0%
GRUPO4 * SAUR	54	98,2%	1	1,8%	55	100,0%

Tabla de contingencia

			BDMAX		Total
			0	1	
GRUPO4	0	Recuento	20	7	27
		% del total	36,4%	12,7%	49,1%
	4	Recuento	9	19	28
		% del total	16,4%	34,5%	50,9%
Total		Recuento	29	26	55
		% del total	52,7%	47,3%	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	9,696 ^b	1	,002		
Corrección por continuidad	8,087	1	,004		
Razón de verosimilitudes	10,015	1	,002		
Estadístico exacto de Fisher				,003	,002
N de casos válidos	55				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 12,76.

Tablas de contingencia Grupo Clínico-Cultivo

Tabla de contingencia

			SAUR		Total
			0	1	
GRUPO4	0	Recuento	22	4	26
		% del total	40,7%	7,4%	48,1%
	4	Recuento	15	13	28
		% del total	27,8%	24,1%	51,9%
Total		Recuento	37	17	54
		% del total	68,5%	31,5%	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	6,023 ^b	1	,014		
Corrección por continuidad	4,670	1	,031		
Razón de verosimilitudes	6,275	1	,012		
Estadístico exacto de Fisher				,020	,014
N de casos válidos	54				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 8,19.

Regresión Conjunta años evolución-Sexo-Edad-Grupo clínico

Variables introducidas/eliminadas^a

Modelo	Variables introducidas	Variables eliminadas	Método
1	SEXO, EDAD, GRADO	.	Introducir

a. Todas las variables solicitadas introducidas

b. Variable dependiente: EVOLUCION

Resumen del modelo

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error tít. de la estimación
1	,357 ^a	,128	,076	4,660

a. Variables predictoras: (Constante), SEXO, EDAD, GRADO

ANOVA^b

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	162,045	3	54,015	2,488	,071 ^a
	Residual	1107,337	51	21,712		
	Total	1269,382	54			

a. Variables predictoras: (Constante), SEXO, EDAD, GRADO

b. Variable dependiente: EVOLUCION

Coeficientes^a

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.	Intervalo de confianza para B al 95%	
		B	Error típ.	Beta			Límite inferior	Límite superior
1	(Constante)	2,333	3,547		,658	,514	-4,789	9,455
	GRADO	1,629	,748	,291	2,178	,034	,128	3,131
	EDAD	-,019	,051	-,049	-,367	,715	-,121	,084
	SEXO	1,600	1,305	,162	1,226	,226	-1,020	4,220

a. Variable dependiente: EVOLUCION

Regresión años evolución-Grado poliposis

Variables introducidas/eliminadas^b

Modelo	Variables introducidas	Variables eliminadas	Método
1	GRADO ^c	.	Introducir

a. Todas las variables solicitadas introducidas

b. Variable dependiente: EVOLUCION

Resumen del modelo

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación
1	,317 ^a	,101	,084	4,641

a. Variables predictoras: (Constante), GRADO

ANOVA^b

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	127,684	1	127,684	5,927	,018 ^a
	Residual	1141,698	53	21,541		
	Total	1269,382	54			

a. Variables predictoras: (Constante), GRADO

b. Variable dependiente: EVOLUCION

Coeficientes^a

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.	Intervalo de confianza para B al 95%	
	B	Error típ.	Beta			Límite inferior	Límite superior
1 (Constante)	1,576	1,761		,895	,375	-1,956	5,107
GRADO	1,777	,730	,317	2,435	,018	,313	3,241

a. Variable dependiente: EVOLUCION

Regresión logística Detección-Grado poliposis-Grupo Clínico-Sexo-Edad

Resumen del procesamiento de los casos

Casos no ponderados ^a		N	Porcentaje
Casos seleccionados	Incluidos en el análisis	55	100,0
	Casos perdidos	0	,0
	Total	55	100,0
Casos no seleccionados		0	,0
Total		55	100,0

a. Si está activada la ponderación, consulte la tabla de clasificación para ver el número total de casos.

Codificación de la variable dependiente

Valor original	Valor interno
0	0
1	1

Tabla de clasificación^{a,b}

Observado			Pronosticado		Porcentaje correcto
			DETECC		
			0	1	
Paso 0	DETECC	0	29	0	100,0
		1	26	0	,0
Porcentaje global					52,7

a. En el modelo se incluye una constante.

b. El valor de corte es ,500

Variables en la ecuación

	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)
Paso 0 Constante	-,109	,270	,163	1	,686	,897

Variables que no están en la ecuación

			Puntuación	gl	Sig.
Paso 0	Variables	EDAD	1,103	1	,294
		SEXO	,356	1	,551
		GRUPO	8,680	1	,003
		GRADO	,563	1	,453
Estadísticos globales			11,193	4	,024

Pruebas omnibus sobre los coeficientes del modelo

		Chi-cuadrado	gl	Sig.
Paso 1	Paso	12,125	4	,016
	Bloque	12,125	4	,016
	Modelo	12,125	4	,016

Resumen de los modelos

Paso	-2 log de la verosimilitud	R cuadrado de Cox y Snell	R cuadrado de Nagelkerke
1	63,957 ^a	,198	,264

a. La estimación ha finalizado en el número de iteración 4 porque las estimaciones de los parámetros han cambiado en menos de ,001.

Tabla de clasificación^f

Observado		Pronosticado			
		DETECC		Porcentaje correcto	
		0	1		
Paso 1	DETECC	0	18	11	62,1
		1	9	17	65,4
Porcentaje global					63,6

a. El valor de corte es ,500

Variables en la ecuación

		B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)
Paso 1 ^a	EDAD	-,030	,025	1,503	1	,220	,970
	SEXO	-,807	,734	1,207	1	,272	,446
	GRUPO	,978	,338	8,360	1	,004	2,660
	GRADO	-,205	,384	,285	1	,594	,815
	Constante	-,548	1,738	,099	1	,752	,578

a. Variable(s) introducida(s) en el paso 1: EDAD, SEXO, GRUPO, GRADO.

Regresión logística Grupo clínico-Detección

Regresion grupo deteccion

Classification Table^{a,b}

Observed		Predicted		
		Deteccion		Percentage Correct
		No	Si	
Step 0	Deteccion No	29	0	100,0
	Deteccion Si	26	0	,0
Overall Percentage				52,7

a. Constant is included in the model.

b. The cut value is ,500

Variables in the Equation

		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Step 0	Constant	-,109	,270	,163	1	,686	,897

Variables not in the Equation

		Score	df	Sig.
Step 0	Variables Grupo	10,512	3	,015
	Grupo(1)	,656	1	,418
	Grupo(2)	1,641	1	,200
	Grupo(3)	9,696	1	,002
	Overall Statistics	10,512	3	,015

Omnibus Tests of Model Coefficients

	Chi-square	df	Sig.
Step	11,062	3	,011
Step 1 Block	11,062	3	,011
Model	11,062	3	,011

Model Summary

Step	-2 Log likelihood	Cox & Snell R Square	Nagelkerke R Square
1	65,020 ^a	,182	,243

a. Estimation terminated at iteration number 4 because parameter estimates changed by less than ,001.

Classification Table^a

	Observed	Predicted		
		Deteccion		Percentage Correct
		No	Si	
Step 1	Deteccion No	20	9	69,0
	Si	7	19	73,1
	Overall Percentage			70,9

a. The cut value is ,500

Variables in the Equation

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Grupo			9,429	3	,024			
Step 1 ^a Grupo(1)	,944	1,002	,888	1	,346	2,571	,361	18,326
Grupo(2)	,118	1,364	,007	1	,931	1,125	,078	16,307
Grupo(3)	2,251	,880	6,541	1	,011	9,500	1,692	53,334
Constant	-1,504	,782	3,702	1	,054	,222		

a. Variable(s) entered on step 1: Grupo.

Correlation Matrix

		Constant	Grupo(1)	Grupo(2)	Grupo(3)
Step 1	Constant	1,000	-,780	-,573	-,888
	Grupo(1)	-,780	1,000	,447	,693
	Grupo(2)	-,573	,447	1,000	,509
	Grupo(3)	-,888	,693	,509	1,000

Resumen del procesamiento de los casos

Casos no ponderados ^a		N	Porcentaje
Casos seleccionados	Incluidos en el análisis	55	100,0
	Casos perdidos	0	,0
	Total	55	100,0
Casos no seleccionados		0	,0
Total		55	100,0

a. Si está activada la ponderación, consulte la tabla de clasificación para ver el número total de casos.

Codificación de la variable dependiente

Valor original	Valor interno
0	0
1	1

Tabla de clasificación^{a,b}

Observado			Pronosticado		Porcentaje correcto
			DETECC		
			0	1	
Paso 0	DETECC	0	29	0	100,0
		1	26	0	,0
Porcentaje global					52,7

a. En el modelo se incluye una constante.

b. El valor de corte es ,500

Variables en la ecuación

		B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)
Paso 0	Constante	-,109	,270	,163	1	,686	,897

Variables que no están en la ecuación

			Puntuación	gl	Sig.
Paso 0	Variables	GRUPO	8,680	1	,003
	Estadísticos globales		8,680	1	,003

Pruebas omnibus sobre los coeficientes del modelo

		Chi-cuadrado	gl	Sig.
Paso 1	Paso	9,153	1	,002
	Bloque	9,153	1	,002
	Modelo	9,153	1	,002

Resumen de los modelos

Paso	-2 log de la verosimilitud	R cuadrado de Cox y Snell	R cuadrado de Nagelkerke
1	66,930 ^a	,153	,205

a. La estimación ha finalizado en el número de iteración 4 porque las estimaciones de los parámetros han cambiado en menos de ,001.

Tabla de clasificación^a

Observado		Pronosticado		
		DETECC		Porcentaje correcto
		0	1	
Paso 1	DETECC	0	1	
		20	9	69,0
		7	19	73,1
	Porcentaje global			70,9

a. El valor de corte es ,500

Variables en la ecuación

		B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)
Paso	GRUPO	,722	,258	7,850	1	,005	2,059
1	Constante	-2,257	,844	7,150	1	,007	,105

a. Variable(s) introducida(s) en el paso 1: GRUPO.

Tabla contingencia Grado Eosinofilia-Grupo clínico

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Grupo * Eosinofilia	53	100,0%	0	0,0%	53	100,0%

Grupo * Eosinofilia Crosstabulation

		Eosinofilia		Total	
		NO	SI		
Grupo	NO	Count	18	7	25
		% within Grupo	72,0%	28,0%	100,0%
SI	Count	5	23	28	
		% within Grupo	17,9%	82,1%	100,0%
Total	Count	23	30	53	
		% within Grupo	43,4%	56,6%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	15,762 ^a	1	,000		
Continuity Correction ^b	13,635	1	,000		
Likelihood Ratio	16,622	1	,000		
Fisher's Exact Test				,000	,000
N of Valid Cases	53				

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 10,85.

b. Computed only for a 2x2 table

Risk Estimate

	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for Grupo (NO / SI)	11,829	3,214	43,528
For cohort Eosinofilia = NO	4,032	1,756	9,258
For cohort Eosinofilia = SI	,341	,178	,654
N of Valid Cases	53		

Tabla contingencia Grado eosinofilia -Detección

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Eosinofilia * Deteccion	53	100,0%	0	0,0%	53	100,0%

Eosinofilia * Deteccion Crosstabulation

		Deteccion		Total	
		NO	SI		
Eosinofilia	NO	Count	21	13	34
		% within Eosinofilia	61,8%	38,2%	100,0%
	SI	Count	6	13	19
		% within Eosinofilia	31,6%	68,4%	100,0%
Total		Count	27	26	53
		% within Eosinofilia	50,9%	49,1%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	4,444 ^a	1	,035		
Continuity Correction ^b	3,318	1	,069		
Likelihood Ratio	4,522	1	,033		
Fisher's Exact Test				,047	,034
N of Valid Cases	53				

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 9,32.

b. Computed only for a 2x2 table

Risk Estimate

	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for Eosinofilia (NO / SI)	3,500	1,066	11,495
For cohort Deteccion = NO	1,956	,959	3,989
For cohort Deteccion = SI	,559	,331	,945
N of Valid Cases	53		

Regresión años evolución-grupo clínico**Variables introducidas/eliminadas[§]**

Modelo	Variables introducidas	Variables eliminadas	Método
1	AGRUPADO4 ^a	.	Introducir

- a. Todas las variables solicitadas introducidas
b. Variable dependiente: EVOLUCION

Resumen del modelo[§]

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error tít. de la estimación
1	,323 ^a	,105	,088	4,631

- a. Variables predictoras: (Constante), AGRUPADO4
b. Variable dependiente: EVOLUCION

ANOVA^b

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	132,703	1	132,703	6,188	,016 ^a
	Residual	1136,679	53	21,447		
	Total	1269,382	54			

- a. Variables predictoras: (Constante), AGRUPADO4
b. Variable dependiente: EVOLUCION

Coefficientes^a

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta		
1	(Constante)	4,000	,891		4,488	,000
	AGRUPADO4	3,107	1,249	,323	2,487	,016

a. Variable dependiente: EVOLUCION

Tabla contingencia Evolución-Detección**Omnibus Tests of Model Coefficients**

		Chi-square	df	Sig.
Step		3,713	1	,054
Step 1	Block	3,713	1	,054
	Model	3,713	1	,054

Model Summary

Step	-2 Log likelihood	Cox & Snell R Square	Nagelkerke R Square
1	72,369 ^a	,065	,087

a. Estimation terminated at iteration number 3 because parameter estimates changed by less than ,001.

Classification Table^a

	Observed	Predicted		
		Detección		Percentage Correct
		NO	SI	
Step 1	Detección NO	21	8	72,4
	SI	13	13	50,0
	Overall Percentage			61,8

a. The cut value is ,500

Variables in the Equation

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)		
							Lower	Upper	
Step 1 ^a	Años	,113	,061	3,396	1	,065	1,119	,993	1,262
	Constant	-,734	,433	2,877	1	,090	,480		

a. Variable(s) entered on step 1: Años.

Dicotomizado en tres categorías, Años (0-5=1 er grupo, 6-10=2 y >11 años=3

Model Summary

Step	-2 Log likelihood	Cox & Snell R Square	Nagelkerke R Square
1	73,098 ^a	,053	,070

a. Estimation terminated at iteration number 3 because parameter estimates changed by less than ,001.

Classification Table^a

	Observed	Predicted		
		Detección		Percentage Correct
		NO	SI	
Step 1	Detección NO	21	8	72,4
	Detección SI	13	13	50,0
	Overall Percentage			61,8

a. The cut value is ,500

Variables in the Equation

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)		
							Lower	Upper	
							Step 1 ^a	anos_trescat	,631
	Constant	-1,082	,637	2,883	1	,090	,339		

a. Variable(s) entered on step 1: anos_trescat.

Años evolución- Grupo Asa triada

Model Summary

Step	-2 Log likelihood	Cox & Snell R Square	Nagelkerke R Square
1	31,709 ^a	,116	,162

a. Estimation terminated at iteration number 4 because parameter estimates changed by less than ,001.

Classification Table^a

	Observed	Predicted		
		Detección		Percentage Correct
		NO	SI	
Step 1	Detección NO	3	6	33,3
	SI	0	19	100,0
Overall Percentage				78,6

a. The cut value is ,500

Variables in the Equation

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)		
							Lower	Upper	
Step 1 ^a	Años	,164	,098	2,789	1	,095	1,178	,972	1,428
	Constant	-,277	,684	,164	1	,685	,758		

a. Variable(s) entered on step 1: Años.

Dicotomizando:

Model Summary

Step	-2 Log likelihood	Cox & Snell R Square	Nagelkerke R Square
1	32,699 ^a	,084	,118

a. Estimation terminated at iteration number 4 because parameter estimates changed by less than ,001.

Classification Table^a

	Observed	Predicted		
		Detección		Percentage Correct
		NO	SI	
Step 1	Detección NO	0	9	,0
	SI	0	19	100,0
Overall Percentage				67,9

a. The cut value is ,500

Variables in the Equation

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for	
							EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 ^a anos_trescat	,846	,577	2,146	1	,143	2,330	,751	7,226
Constant	-,673	1,000	,453	1	,501	,510		

a. Variable(s) entered on step 1: anos_trescat.

Tabla contingencia polipectomias-Grupo clínico

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
	Polipectomias * Grupo	55	100,0%	0	0,0%	55

Polipectomias * Grupo Crosstabulation

		Grupo			Total	
		1,00	2,00	3,00		
Polipectomias	,00	Count	8	7	8	23
		% within Polipectomias	34,8%	30,4%	34,8%	100,0%
	1,00	Count	7	4	9	20
		% within Polipectomias	35,0%	20,0%	45,0%	100,0%
	2,00	Count	1	0	8	9
		% within Polipectomias	11,1%	0,0%	88,9%	100,0%
	3,00	Count	0	0	2	2
		% within Polipectomias	0,0%	0,0%	100,0%	100,0%
	4,00	Count	0	0	1	1
		% within Polipectomias	0,0%	0,0%	100,0%	100,0%
	Total	Count	16	11	28	55
		% within Polipectomias	29,1%	20,0%	50,9%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	11,304 ^a	8	,185
Likelihood Ratio	14,054	8	,080
Linear-by-Linear Association	6,540	1	,011
N of Valid Cases	55		

a. 11 cells (73,3%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,20.

Risk Estimate

	Value
Odds Ratio for Polipeptomias (.00 / 1,00)	a

a. Risk Estimate statistics cannot be computed. They are only computed for a 2*2 table without empty cells.

Grupos agrupados

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Polipeptomias * Grupoagr	55	100,0%	0	0,0%	55	100,0%

Polipeptomias * Grupoagr Crosstabulation

		Grupoagr		Total	
		,00	1,00		
Polipeptomias	,00	Count	15	8	23
		% within Polipeptomias	65,2%	34,8%	100,0%
Polipeptomias	1,00	Count	11	9	20
		% within Polipeptomias	55,0%	45,0%	100,0%

2,00	Count	1	8	9
	% within Polipectomias	11,1%	88,9%	100,0%
3,00	Count	0	2	2
	% within Polipectomias	0,0%	100,0%	100,0%
4,00	Count	0	1	1
	% within Polipectomias	0,0%	100,0%	100,0%
Total	Count	27	28	55
	% within Polipectomias	49,1%	50,9%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	10,760 ^a	4	,029
Likelihood Ratio	12,703	4	,013
Linear-by-Linear Association	9,112	1	,003
N of Valid Cases	55		

a. 6 cells (60,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,49.

Grupo * Polipectomias Crosstabulation

		Polipectomias		Total	
		NO	SI		
Grupo	NO	Count	26	1	27
		% within Grupo	96,3%	3,7%	100,0%
SI	Count	17	11	28	
	% within Grupo	60,7%	39,3%	100,0%	
Total	Count	43	12	55	
	% within Grupo	78,2%	21,8%	100,0%	

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	10,202 ^a	1	,001		
Continuity Correction ^b	8,223	1	,004		
Likelihood Ratio	11,631	1	,001		
Fisher's Exact Test				,002	,001
N of Valid Cases	55				

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 5,89.

b. Computed only for a 2x2 table

Risk Estimate

	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for Grupo (NO / SI)	16,824	1,986	142,483
For cohort Polipectomias = NO	1,586	1,167	2,156
For cohort Polipectomias = SI	,094	,013	,681
N of Valid Cases	55		

Adhesinas *cna*

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Adhesinasna * Grupos	36	100,0%	0	0,0%	36	100,0%

Adhesinasna * Grupos Crosstabulation

			Grupos		Total
			NO	SI	
Adhesinasna	NO	Count	18	1	19
		% within Adhesinasna	94,7%	5,3%	100,0%
	SI	Count	10	7	17
		% within Adhesinasna	58,8%	41,2%	100,0%
Total	Count	28	8	36	
	% within Adhesinasna	77,8%	22,2%	100,0%	

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	6,695 ^a	1	,010		
Continuity Correction ^b	4,779	1	,029		
Likelihood Ratio	7,269	1	,007		
Fisher's Exact Test				,016	,013
N of Valid Cases	36				

a. 2 cells (50,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3,78.

b. Computed only for a 2x2 table

Risk Estimate

	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for Adhesinasca (NO / SI)	12,600	1,350	117,570
For cohort Grupos = NO	1,611	1,067	2,431
For cohort Grupos = SI	,128	,017	,936
N of Valid Cases	36		

Adhesina *bbp*

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Adhesinasbbp * Grupos	36	100,0%	0	0,0%	36	100,0%

Adhesinasbbp * Grupos Crosstabulation

		Grupos		Total	
		NO	SI		
Adhesinasbbp	NO	Count	8	14	22
		% within Adhesinasbbp	36,4%	63,6%	100,0%
Adhesinasbbp	SI	Count	11	3	14
		% within Adhesinasbbp	78,6%	21,4%	100,0%
Total		Count	19	17	36
		% within Adhesinasbbp	52,8%	47,2%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	6,116 ^a	1	,013		
Continuity Correction ^b	4,539	1	,033		
Likelihood Ratio	6,406	1	,011		
Fisher's Exact Test				,019	,015
N of Valid Cases	36				

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 6,61.

b. Computed only for a 2x2 table

Risk Estimate

	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for Adhesinasbbp (NO / SI)	,156	,033	,730
For cohort Grupos = NO	,463	,250	,858
For cohort Grupos = SI	2,970	1,038	8,500
N of Valid Cases	36		

Adhesina *ebpS*

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
AdhesinasebpS * Grupos	36	100,0%	0	0,0%	36	100,0%

AdhesinasebpS * Grupos Crosstabulation

			Grupos		Total
			NO	SI	
AdhesinasebpS	NO	Count	4	8	12
		% within AdhesinasebpS	33,3%	66,7%	100,0%
	SI	Count	15	9	24
		% within AdhesinasebpS	62,5%	37,5%	100,0%
Total	Count	19	17	36	
	% within AdhesinasebpS	52,8%	47,2%	100,0%	

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	2,731 ^a	1	,098		
Continuity Correction ^b	1,686	1	,194		
Likelihood Ratio	2,764	1	,096		
Fisher's Exact Test				,158	,097
N of Valid Cases	36				

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 5,67.

b. Computed only for a 2x2 table

Risk Estimate

	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for AdhesinasebpS (NO / SI)	,300	,070	1,288
For cohort Grupos = NO	,533	,226	1,258
For cohort Grupos = SI	1,778	,925	3,417
N of Valid Cases	36		

Enterotoxina sem

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
semo * Grupos	36	100,0%	0	0,0%	36	100,0%

semo * Grupos Crosstabulation

		Grupos		Total	
		NO	SI		
semo	NO	Count	4	15	19
		% within semo	21,1%	78,9%	100,0%
semo	SI	Count	14	3	17
		% within semo	82,4%	17,6%	100,0%
Total		Count	18	18	36
		% within semo	50,0%	50,0%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	13,486 ^a	1	,000		
Continuity Correction ^b	11,146	1	,001		
Likelihood Ratio	14,506	1	,000		
Fisher's Exact Test				,001	,000
N of Valid Cases	36				

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 8,50.

b. Computed only for a 2x2 table

Risk Estimate

	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for semo (NO / SI)	,057	,011	,302
For cohort Grupos = NO	,256	,104	,628
For cohort Grupos = SI	4,474	1,561	12,820
N of Valid Cases	36		