



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

ANDRESSA CORTES CAVALLERI

**ASSOCIAÇÃO ENTRE *Staphylococcus aureus* E PARÂMETROS
LABORATORIAIS DE PACIENTES COM RINOSSINUSITE CRÔNICA COM
POLIPOSE NASOSSINUSAL**

Presidente Prudente - SP
2020

ANDRESSA CORTES CAVALLERI

**ASSOCIAÇÃO ENTRE *Staphylococcus aureus* E PARÂMETROS
LABORATORIAIS DE PACIENTES COM RINOSSINUSITE CRÔNICA COM
POLIPOSE NASOSSINUSAL**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde – Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientadora:
Profa. Dra. Valéria Cataneli Pereira

Coorientador:
Prof. Dr. Luiz Euribel Prestes Carneiro

616
C377a

Cavalleri, Andressa Côrtes.

Associação entre *Staphylococcus aureus* e parâmetros laboratoriais de pacientes com rinossinusite crônica com polipose nasossinusal / Andressa Côrtes Cavalleri ; orientadora Valéria Cataneli Pereira ; coorientador Luiz Euribel Prestes Carneiro. – Presidente Prudente, 2020.

45 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2020.

Bibliografia.

1. Sinusite. 2. Pólipos nasais. 3. *Staphylococcus aureus*. 4. Enterotoxinas. 4. Biofilme. I. Pereira, Valéria Cataneli. II. Carneiro, Luiz Euribel Prestes. III. Título.

ANDRESSA CORTES CAVALLERI

**ASSOCIAÇÃO ENTRE *Staphylococcus aureus* E PARÂMETROS
LABORATORIAIS DE PACIENTES COM RINOSSINUSITE CRÔNICA COM
POLIPOSE NASOSSINUSAL**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de concentração: Ciências da Saúde

Presidente Prudente, 20 de fevereiro de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Valéria Cataneli Pereira
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Euribel Prestes Carneiro
Universidade do Oeste Paulista - Unoeste
Presidente Prudente - SP

Prof.^a Dr.^a Lizziane Kretli Winkelstroter Eller
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Prof. Dr. Maurício Domingues Ferreira
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP
São Paulo - SP

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para o meu desenvolvimento, principalmente à minha família pela compreensão nos momentos em que a dedicação aos estudos fez-me ausente.

Não deixando de lembrar daqueles que sofrem com a rinosinusite crônica com polipose nasal e buscam por uma cura. Nunca desistam.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse ao longo da minha vida, e que em todos os momentos é o maior mestre que alguém pode conhecer.

A Unoeste, pela oportunidade de fazer o curso e todo seu corpo docente por tornar o ambiente de conhecimento amigável e criativo.

A Prof.^a Dr.^a Valéria Cataneli Pereira pela orientação, apoio e confiança, pela segurança e carinho que sempre me passou. Sinto-me privilegiada em conhecê-la e tê-la como minha orientadora.

Ao Prof. Dr. Luiz Euribel Prestes Carneiro que mostrou que seria possível estar no mestrado, me orientou desde o começo e nunca duvidou da minha capacidade.

Aos alunos de iniciação científica Thaísa Piccinini de Souza, Iranildo do Amarante Fernandes, Rafael da Silva Rosa, Nathália Rebolho Turozi, Gabriel Henrique Maximino Santos e Giovana do Nascimento Pereira, da graduação dos cursos de Ciências Biológicas e Biomedicina da Unoeste, que estiveram sempre presentes e dispostos a ajudar, sem hesitar.

Aos queridos residentes de otorrinolaringologia do Hospital Regional de Presidente Prudente, que muitas vezes tiveram seus horários de almoço as quintas-

feiras reduzidos, que tiveram paciência com tantas coletas realizadas. Nunca deixaram de me ajudar, sempre em prontidão para o que precisar. Que Deus abençoe vocês como profissionais e pessoas.

Ao laboratório São José por realizar toda a coleta de amostras de sangue e ao Laboratório Unilab pelo carinho e profissionalismo com que lidaram com nossas amostras.

Aos componentes da banca que despenderam seu tempo precioso para estar conosco nesse momento e colaboraram para o crescimento e enriquecimento da nossa pesquisa.

Aos pacientes que aceitaram o convite e dedicaram-se a realização dessa pesquisa, confiaram sua saúde em nossas mãos, sem vocês não seria possível não haveria melhorias na qualidade de vida e na saúde.

Aos meus pais Carla e Edson e meus irmãos Gabriela e Igor, que nunca deixaram de acreditar em mim mesmo nos momentos de dificuldades. Vocês são minha base, obrigada por sempre confiarem em mim.

Meu agradecimento em especial ao meu marido Caio, que suportou minhas angústias, meu estresse, minha ausência, que sentou ao meu lado para ajudar a manter-me acordada nas madrugadas de correções e estudos. Nunca duvidou da minha capacidade, mesmo quando eu já não acreditava mais. E hoje também ao meu amado filho Augusto, que é a razão da minha motivação, da minha felicidade,

que tornou o mestrado mais desafiador. Divido com vocês hoje a vitória de poder defender minha dissertação.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (Brasil) CAPES – Código de Financiamento 001”.

A todos que oraram por mim e confiaram, meu muito obrigada.

***“Prefiram a minha instrução à prata, e o conhecimento ao ouro puro,
pois a sabedoria é mais preciosa do que rubis, nada do que vocês possam
desejar compara-se a ela”.***

(Provérbios: 8: 10-11)

LISTA DE SIGLAS

BHI	Brain Heart Infusion
CV	Coeficiente de Variação
DV	Desvio Padrão
ECN	Estafilococos coagulase negativa
ELISA	Enzyrna-Linked Immunosorbent Assay
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-1	Interleucina-1
IL-2	Interleucina-2
IL-5	Interleucina-5
Índice MAR	Índice de múltipla resistência aos antimicrobianos
MRSA	<i>S. aureus</i> resistentes à metilina
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia
PIA	Polissacarídeo de adesão intracelular
R	Resistente
RAST	Radio-allergo-sorbent-test
RS	Rinossinusite
RSC	Rinossinusite Crônica
RSCcP	Rinossinusite Crônica com Polipose Nasossinusal
RSCsP	Rinossinusite sem Polipose Nasossinusal
S	Sensível
TSST-1	Toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Frequência dos genes de enterotoxinas (*sea*, *seb*, *sec-1*) de *S. aureus* isolados das cavidades nasais e/ou orofaringe de pacientes com RSCcP..... 24
- Figura 2 - Distribuição dos níveis séricos de IgM e IgG em pacientes com RSCcP..... 27
- Figura 3 - Determinação da associação entre o carregamento de *S. aureus* por pacientes com RSCcP e o aumento nos níveis de monócitos e linfócitos..... 27
- Figura 4 - Determinação da associação entre o gene *sec-1* e os níveis de Imunoglobulina E (IgE) em pacientes com RSCcP carregadores de *S. aureus*..... 28

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Perfil sócio demográfico, carreamento de *S. aureus* e condições clínicas de pacientes com RSCcP 23
- Tabela 2 - Determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos por *S. aureus* isolados da orofaringe e cavidade nasal de pacientes com RSCcP..... 25
- Tabela 3 - Valores dos níveis de imunoglobulinas (kU/L) e leucócitos (K/ul) dosados em pacientes com RSCcP..... 26

SUMÁRIO

ARTIGO CIENTÍFICO	13
INTRODUÇÃO	16
CAUSUÍSTICA E MÉTODOS	18
Considerações éticas	18
Amostras	19
Isolamento e identificação bacteriana	19
Extração do DNA de estafilococos	19
Identificação genotípica de <i>S. aureus</i>	20
Técnica de disco-difusão dos antimicrobianos em Ágar	20
Produção de β-lactamase	21
Produção de biofilme por estafilococos	21
Detecção dos genes icaA	21
Detecção dos genes de superantígenos	21
Determinação das imunoglobulinas totais e contagem diferencial dos leucócitos	21
Análise dos resultados	22
RESULTADOS	22
DISCUSSÃO	28
REFERÊNCIAS	32
APÊNDICES	37
APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	38
APÊNDICE B - QUESTIONÁRIO APLICADO AOS SUJEITOS DA PESQUISA NO MOMENTO DA COLETA DOS SWABS	40
ANEXO - NORMAS DE SUBMISSÃO RHINOLOGY – OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN AND INTERNATIONAL SOCIETIES	42

ARTIGO CIENTÍFICO

Associação entre *Staphylococcus aureus* e parâmetros laboratoriais de pacientes com rinosinusite crônica com polipose nasossinusal

Andressa Côrtes Cavalleri¹, Thaísa Piccinini de Souza², Iranildo do Amarante Fernandes², Rafael da Silva Rosa², Giovana do Nascimento Pereira³, Gabriel Henrique Maximino Santos³, Nathalia Rebolho Turozi², Luiz Euribel Prestes Carneiro¹, Valéria Cataneli Pereira¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

² Faculdade de Artes, Ciências, Letras e Educação de Presidente Prudente (FACLEPP). Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE). Campus de Presidente Prudente, SP, Brasil.

³ Faculdade de Biomedicina. Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE). Campus de Presidente Prudente, SP, Brasil.

Autor correspondente: Andressa Côrtes Cavalleri

Faculdade Ciências da Saúde

Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE)

Rua José Bongiovani, 700 - Cidade Universitária,

Presidente Prudente - SP, Brasil

CEP: 19050-920

E-mail: dessacavalleri@hotmail.com

O trabalho está apresentado sob a forma de artigo, segundo as normas do periódico ao qual será submetido: Rhinology, Fator de impacto: 3,35, Classificação Qualis: A1

Título curto:

Staphylococcus aureus e RSCcP

TIPO DE ARTIGO
ORIGINAL

Título

Associação entre *Staphylococcus aureus* e parâmetros laboratoriais de pacientes com rinossinusite crônica com polipose nasossinusal

Autores

Andressa Côrtes Cavalleri¹, Thaísa Piccinini de Souza², Iranildo do Amarante Fernandes², Rafael da Silva Rosa², Giovana do Nascimento Pereira³, Gabriel Henrique Maximino Santos³, Nathalia Rebolho Turozi², Luiz Euribel Prestes Carneiro¹, Valéria Cataneli Pereira¹

Afiliação

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

²Faculdade de Artes, Ciências, Letras e Educação de Presidente Prudente (FACLEPP). Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE). Campus de Presidente Prudente, SP, Brasil.

³Faculdade de Biomedicina. Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE). Campus de Presidente Prudente, SP, Brasil.

RESUMO

Introdução: A Rinossinusite Crônica com Pólipose Nasossinusal (RSCcP) é uma doença inflamatória dos seios paranasais e cavidades nasais que pode estar relacionada com a presença da bactéria do gênero *Staphylococcus*. **Metodologia:** Foram selecionados 50 pacientes com RSCcP, coletadas informações sócio epidemiológicas e amostras bacterianas nasal e da orofaringe. Os *S. aureus* identificados foram submetidos ao teste de susceptibilidade aos antimicrobianos e os genes das enterotoxinas estafilocócicas clássicas e do biofilme foram pesquisados. As imunoglobulinas totais foram dosadas assim como o leucograma. **Resultados:** Foram identificadas 35 amostras de *S. aureus* dos 27 pacientes colonizados por essa bactéria, todos com capacidade de produzir biofilme. Detectou-se múltipla resistência aos antimicrobianos em 74,3% dos isolados. Foi verificada associação entre carregamento bacteriano, dosagem de imunoglobulinas e contagem de leucócitos, observando aumento nos níveis de monócitos e linfócitos com a presença de *S. aureus*, assim como correlação entre os níveis de IgE e a presença do gene *sec-1*. **Conclusão:** Houve carregamento de *S. aureus* multirresistentes, com potencial de formação do biofilme e associação negativa entre o gene da enterotoxina C com produção de IgE, sugerindo que essa enterotoxina pode estar associada a não formação dos pólipos nasais em alguns pacientes.

Palavras-chave: RSCcP, polipose nasal, enterotoxinas estafilocócicas, biofilme.

Running title:

Staphylococcus aureus and RSCwP

TYPE OF ARTICLE

ORIGINAL CONTRIBUTION

Title

Association between *Staphylococcus aureus* and laboratorial parameters of patients with chronic rhinosinusitis with nasosinusal polyps

Authors

Andressa Côrtes Cavalleri¹, Thaísa Piccinini de Souza², Iranildo do Amarante Fernandes², Rafael da Silva Rosa², Giovana do Nascimento Pereira³, Gabriel Henrique Maximino Santos³, Nathalia Rebolho Turozi², Luiz Euribel Prestes Carneiro¹, Valéria Cataneli Pereira¹

Affiliation

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

² Faculdade de Artes, Ciências, Letras e Educação de Presidente Prudente (FACLEPP). Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE). Campus de Presidente Prudente, SP, Brasil.

³ Faculdade de Biomedicina. Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE). Campus de Presidente Prudente, SP, Brasil.

SUMMARY

Background: Chronic rhinosinusitis with Nasosinusal Polyps (CRSwP) is an inflammatory disease of the paranasal sinuses and nasal cavities that may be related to the presence of the bacterium of the genus *Staphylococcus*. **Methodology:** We selected 50 patients with CRSwP and socio-epidemiological information, nasal and oropharyngeal bacterial samples were collected. Isolated *S. aureus* samples were submitted to the antimicrobial susceptibility test. The classic staphylococcal enterotoxin and biofilm genes were determined. Total immunoglobulins as well as leukogram were measured. **Results:** 35 *S. aureus* samples were identified from the 27 patients colonized by this bacterium, all of them with capacity to produce biofilm. Multiple antimicrobial resistances were detected in 74.3% of the isolates. An association between bacterial carrier, immunoglobulin levels and leukocyte count was verified, observing an increase in the levels of monocytes and lymphocytes with the presence of *S. aureus*. Levels of IgE and the presence of the sec-1 gene were correlated. **Conclusion:** There was a carrying of multiresistant *S. aureus* with potential for biofilm formation and a negative association between the enterotoxin C gene and IgE production, suggesting that this enterotoxin may be associated with no formation of nasal polyps in some patients.

Keywords: *CRSwP*, *nasal polyposis*, *staphylococcal enterotoxins*, *biofilm*.

INTRODUÇÃO

A Rinossinusite (RS) é definida como uma doença inflamatória dos seios paranasais e cavidades nasais caracterizada por dois ou mais sintomas, um dos quais deve ser obstrução, congestão ou secreção nasal com gotejamento anterior ou posterior, além de sintomas que podem ou não estar presentes, tais como dor ou pressão facial e anosmia ou hiposmia⁽¹⁾. Trata-se de uma doença com grande impacto financeiro na sociedade, já que leva ao absenteísmo e efeitos prejudiciais à qualidade de vida^(1,2).

A RS pode ser classificada em aguda, caracterizada por persistência dos sintomas clínicos por até quatro semanas de duração, e crônica (RSC), por apresentar mais de 12 semanas de duração dos sintomas e sinais inflamatórios ao exame endoscópico e tomografia dos seios da face^(3,4). A RSC pode ainda ser dividida em: Rinossinusite Crônica com Polipose Nasossinusal (RSCcP) e Rinossinusite Crônica sem Polipose Nasossinusal (RSCsP).

Nas RSCcP há dificuldades no tratamento, visto as falhas nas terapias medicamentosas que requerem um tratamento cirúrgico para extração dos pólipos, que podem reincidir⁽⁵⁾. A RC apresenta prevalência de 4,5 a 12% na população geral, sendo que a polipose nasal é relatada em 0,5 a 4,3% desses indivíduos, com a maior prevalência observada nos países ocidentais⁽⁶⁾.

A imunoglobulina E (IgE) desempenha um papel central nas reações alérgicas agudas e doenças inflamatórias crônicas. Em indivíduos geneticamente susceptíveis a exposição a alérgenos específicos resulta em um aumento de IgE específica, que pode se ligar às células efectoras através de um receptor de alta afinidade expresso em mastócitos e basófilos e a ligação a esses receptores aumenta a sobrevivência da IgE no plasma. O contato com um alérgeno específico induz a liberação de mediadores farmacológicos ativos armazenados nos grânulos dos mastócitos e basófilos do sangue periférico, resultando em manifestações clínicas de hipersensibilidade do tipo 1⁽⁷⁾.

Alguns estudos relatam a associação dos resultados de testes positivos de IgE, eosinofilia e radio-allergo-sorbent-test (RAST) na doença sinusal extensa^(8, 9). Lemos-Rodriguez et al⁽¹⁰⁾, testaram uma terapia medicamentosa no tratamento da RSC, no qual os pacientes com maiores níveis de IgE (≥ 150 UI) apresentaram maiores falhas no tratamento realizado comparado aqueles com níveis inferiores de IgE. Além disso, a relação entre os níveis de IgE total e a espessura da mucosa do seio na tomografia computadorizada em pacientes com RSC também foi descrita. A produção local de IgE é um evento marcante em

poliposes nasais e algumas bactérias podem estar relacionadas à maior produção de IgE, como aquelas do gênero *Staphylococcus* ^(11, 12).

Staphylococcus aureus é um patógeno oportunista que coloniza aproximadamente 40% da população humana ⁽¹³⁾. Essa bactéria coloniza principalmente as cavidades nasais, mas pode também ser encontrada em diferentes regiões da pele e no trato gastrointestinal. Estudos sugerem que a RSCcP está associada a colonização das cavidades nasais por *S. aureus*, principalmente quando esses microrganismos são produtores de toxinas tais como, as enterotoxinas estafilocócicas e a toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1), que são potentes superantígenos e estimulam de forma inespecífica a proliferação de células T ^(14, 15).

As enterotoxinas são exoproteínas hidrossolúveis, com peso molecular de 26000 a 29000 Da, caracterizadas por uma alça de dissulfeto próxima ao centro da molécula. A purificação e a caracterização das enterotoxinas estafilocócicas tiveram início em 1959 ⁽¹⁶⁾ e, atualmente, são 18 as enterotoxinas sorologicamente distintas e designadas pelas letras EEA a EEU, sendo as enterotoxinas clássicas: EEA, EEB, EEC, EED e EEE que são expressas pelos genes plasmidiais *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*, respectivamente ⁽¹⁷⁾.

A ativação inespecífica de células T por superantígenos se dá através da ligação direta à molécula da classe II do complexo principal de histocompatibilidade e à cadeia $v\beta$ do receptor de antígeno da célula T. Sem o processamento típico de antígenos normais, há a estimulação exacerbada de células T, resultando em produção excessiva de citocinas, tais como interleucina I (IL-1), IL-2, interferon gama e fator de necrose tumoral alfa ⁽¹⁸⁾.

Desta forma, as enterotoxinas estafilocócicas e TSST-1 induzem a síntese de imunoglobulinas, incluindo IgE, por células B. Bachert et al ⁽¹⁹⁾ detectaram a colonização por *S. aureus* em 60% dos pacientes com polipose nasossinusal e os anticorpos IgE contra enterotoxinas estafilocócicas estavam presentes em 27% desses pacientes. Segundo Tantilipikorn et al ⁽¹⁵⁾, a prevalência de IgE contra enterotoxinas estafilocócica é de 50% em pacientes europeus com RSCcP.

Além das enterotoxinas estafilocócicas e da TSST-1, o biofilme pode estar associado à RSCcP. O biofilme é definido como uma interação complexa de microrganismos incorporados em uma matriz extracelular de polissacarídeo, proteínas e ácido nucleico, que confere proteção aos microrganismos envolvidos e lhes permite fugirem do sistema imune do hospedeiro durante a infecção ^(20, 21). O biofilme contribui para as mais severas infecções relacionadas à polipose nasossinusal, principalmente quando *S. aureus* compõem essa estrutura ⁽¹⁵⁾. Pacientes com polipose nasossinusal apresentam inflamação eosinofílica e níveis

significativamente maiores de IL-5 e Proteína Eosinofílica Catiônica quando são detectados biofilmes formados por *S. aureus* ⁽²²⁾.

O tratamento de pacientes com RSC com antimicrobianos não é estabelecido como um tratamento efetivo de consenso pelos profissionais da saúde. O papel patogênico das bactérias está bem delimitado nas formas agudas de rinosinusite, no entanto, a colonização da mucosa nasal por bactérias patogênicas parece estar relacionada à severidade da RSC ^(23, 24).

A detecção de *S. aureus* multirresistentes deixa poucas alternativas para o tratamento das infecções causadas por estes patógenos. Os testes fenotípicos, tais como o de disco difusão, podem detectar *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA), que apresentam baixa afinidade aos beta-lactâmicos, e os *S. aureus* com resistência induzida aos macrolídeos, além da resistência aos demais antimicrobianos utilizados nas infecções estafilocócicas ⁽²⁵⁾. Desta forma, a detecção da suscetibilidade aos antimicrobianos é de grande importância para o direcionamento do tratamento do paciente.

Considerando a dificuldade do tratamento das RSC, é importante o conhecimento dos microrganismos presentes nas vias aéreas superiores desses pacientes e a caracterização dos fatores de virulência das bactérias envolvidas nos processos inflamatórios. Existem estudos sugerindo a associação da resposta inflamatória da RSCcP com os superantígenos estafilocócicos, porém não há um consenso em relação a qual toxina está envolvida nesse processo ^(24, 26, 27). Além disso, é de grande importância o conhecimento da susceptibilidade aos antimicrobianos das bactérias que estão sendo carregadas e dos níveis de imunoglobulinas e leucócitos desses pacientes.

Desta forma, este estudo objetivou identificar *S. aureus* carregados por pacientes com RSCcP e caracterizar essas bactérias em relação aos fatores de virulência e resistência aos antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções estafilocócicas. Além disso, visou correlacionar os níveis de imunoglobulinas e contagem leucocitária desses pacientes com o carregamento bacteriano.

CAUSUÍSTICA E MÉTODOS

Considerações éticas

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa através da Plataforma Brasil (Protocolo: CAAE 91934418.3.0000.5515). Todos os participantes assinaram e forneceram o termo livre e esclarecido de consentimento para o uso das amostras em pesquisas (Apêndice A).

Amostras

Foram convidados a participarem do estudo todos os pacientes atendidos no ambulatório de otorrinolaringologia do Hospital Regional de Presidente Prudente/SP com diagnóstico prévio de RSCcP (diagnóstico clínico, tomográfico e endoscópico) e com indicação cirúrgica para remoção do pólipó nasal, entre os meses de setembro de 2018 e agosto de 2019. Para o cálculo amostral foi utilizado um erro amostral de 5%, nível de confiança de 95%, com uma população de 120 pessoas e percentual máximo de 10%. Foram excluídos da pesquisa todos participantes menores de 18 anos e os que estavam em uso de agentes antimicrobiano.

Todos participantes responderam a um questionário sócio epidemiológico que incluiu: dados demográficos, escolaridade, comorbidades, uso de medicamentos no último ano, tratamentos prévios para RSC, uso de álcool, tabaco e drogas ilícitas (Apêndice B).

Desses pacientes foram coletadas amostras bacterianas nasais utilizando swab estéril *Stuart*, umedecido com solução salina (0,85%) previamente esterilizada, que foi introduzido na altura do meado médio, fazendo movimentos circulares delicados por três vezes e outro swab que foi passado levemente nas amígdalas. Coletou-se também amostras de sangue periférico para determinação de imunoglobulinas e contagem diferencial dos leucócitos.

Isolamento e identificação bacteriana

As amostras bacterianas foram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia, situado no Campus 1 da UNOESTE, Presidente Prudente/SP, onde foram semeadas em ágar Baird Parker e incubadas a 37°C por 24 horas. Após o crescimento das colônias, as amostras foram submetidas à coloração de Gram e ao teste de catalase para diferenciação entre os gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*. Os estafilococos foram submetidos ao teste de coagulase para diferenciação de estafilococos coagulase-positiva e coagulase-negativa (ECN)⁽²⁸⁾.

Todos isolados foram congelados a -70°C em caldo nutriente contendo 10% de glicerol.

Extração do DNA de estafilococos

Para a extração do DNA bacteriano foi utilizado o Kit Illustra (GE healthcare) que consistiu na digestão inicial das células de estafilococos com lisozima (10 mg/ml) e

proteínase K (20 mg/ml), seguindo as normas dos fabricantes e protocolo adaptado de Pereira et al⁽²⁹⁾.

Identificação genotípica de S. aureus

Para a detecção de *S. aureus* foi realizada a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a detecção do gene *sau*, específico para essa espécie. Os primers utilizados foram: *sau327* (GGA CGA CAT TAG ACG AAT CA) e *sau1645* (CGG GCA CCT ATT TTC TAT CT). As reações foram realizadas segundo os parâmetros estabelecidos por Riffon et al⁽³⁰⁾.

A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 2% e corado com Brometo de etídeo. Em todas as reações realizadas, foram utilizadas *S. aureus* ATCC 25923 (controle para *S. aureus*) e *S. epidermidis* ATCC 12228 (controle negativo).

Técnica de disco-difusão dos antimicrobianos em Ágar

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos foi realizado pela técnica da difusão da droga em ágar a partir de discos impregnados com os antimicrobianos. Para o preparo dos inóculos foram utilizadas culturas em caldo Brain Heart Infusion (BHI), previamente incubadas por 4 a 6 horas e ajustadas anteriormente com a turbidez da escala 0.5 de McFarland.

Uma vez ajustada a densidade do inóculo, a semeadura foi realizada através de swab estéril na superfície de ágar Mueller Hinton, e a seguir foram aplicados os discos impregnados com as drogas: cefoxitina (30µg), penicilina (10 µg), clindamicina (2 µg), eritromicina (15 µg), claritromicina (15 µg), levofloxacina (5 µg), tetraciclina (30 µg), amoxicilina com ácido clavulânico (20/10 µg) e linezolida (30 µg).

As placas foram incubadas a temperatura de 37°C por 24 horas sendo a atividade do antimicrobiano avaliada pelo diâmetro do halo de inibição através de interpretação em base das normas estabelecidas pelo CLSI⁽³¹⁾.

Os discos de eritromicina (15 µg) e clindamicina (15 µg) foram dispostos próximos para observação do fenótipo de resistência aos macrolídeos (Teste D).

O índice de múltipla resistência aos antimicrobianos (índice MAR) foi calculado a partir do número de antimicrobianos ao qual determinado isolado foi resistente sobre o número total testado⁽³²⁾.

Produção de β -lactamase

Os discos de Nitrocefina foram inseridos nas colônias bacterianas para a detecção da produção de β -lactamase, segundo as normas do fabricante. O teste positivo foi evidenciado pela mudança da coloração do disco, adquirindo a cor rosa ⁽²⁹⁾.

Produção de biofilme por estafilococos

Os estafilococos foram semeados em Ágar Vermelho Congo e após a incubação das placas a 37°C por 24-48 horas, as colônias produtoras de biofilme apresentaram coloração negra enquanto as que apresentaram cores vermelhas a bordô foram consideradas sem a capacidade de produzir essa estrutura ⁽³³⁾.

Detecção dos genes icaA

A produção do biofilme por meio da síntese do Polissacarídeo de Adesão Intercelular (PIA) foi determinada através da pesquisa do gene *icaA*.

As reações de PCR para a detecção do gene *icaA* foram realizadas conforme os parâmetros descritos por Arciola et al ⁽³⁴⁾. A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 2% e corado com brometo de etídeo. Em todas as reações realizadas, foram utilizadas linhagens de referência internacional: *S. epidermidis* ATCC 35985 (produtora de biofilme) e *S. epidermidis* ATCC 12228 (não produtora de biofilme).

Detecção dos genes de superantígenos

As reações de PCR para a detecção dos genes das enterotoxinas A, B, C e D (*sea*, *seb*, *sec-1* e *sed*) e da TSST-1 (*tst*) foram realizadas conforme os parâmetros descritos por Johnson et al ⁽³⁵⁾ e adaptado por Cunha et al. ⁽³⁶⁾. A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 2% e corado com brometo de etídeo.

Linhagens de *S. aureus* toxigênicas de referência internacional foram utilizadas como controle positivo, incluindo, ATCC 13565 (Enterotoxina estafilocócica A - EEA), ATCC 14458 (EEB), ATCC 19095 (EEC) e ATCC 23235 (EED).

Determinação das Imunoglobulinas totais e contagem diferencial dos leucócitos

As amostras de sangue periférico foram utilizadas para determinação das imunoglobulinas totais (IgG, IgM, IgE e IgA) e contagem de neutrófilos, eosinófilos, basófilos e linfócitos. As amostras foram centrifugadas e os soros foram armazenados a -20°C

em tubo Eppendorf®. Os anticorpos totais foram dosados pelo método de ELISA. Todos os testes foram realizados em um laboratório terceirizado.

Análise dos resultados

Para análise dos dados foram utilizados os softwares Action Stat e R. Para todos os testes foi adotado nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Primeiramente foi realizada uma análise descritiva dos dados com apresentação de medidas numéricas (valor mínimo e máximo, média, mediana, desvio-padrão e coeficiente de variação) para as variáveis quantitativas e frequências percentuais para as variáveis qualitativas, além de representações gráficas para melhor compreensão dos dados.

Para verificar a existência de associação entre os pares de variáveis quantitativas foi realizada a análise de correlação por meio do teste de *Pearson*, e para o caso de variáveis categóricas utilizou-se o *Teste Qui-Quadrado* ou *Teste Exato de Fisher*.

RESULTADOS

Entre os pacientes com RSCcP, 50 aceitaram participar do estudo, porém 10 não realizaram a coleta de sangue periférico para a determinação dos testes sorológicos. Dos 50 participantes, a bactéria *S. aureus* foi isolada em 27 (54%), sendo em 8 pacientes detectada apenas nas cavidades nasais, 11 na orofaringe e 8 em ambos os sítios.

Foram identificados 35 *S. aureus*, sendo 54,3% provenientes da orofaringe e 45,7% das cavidades nasais. A Tabela 1 apresenta os dados demográficos e clínico desses pacientes, porém não houve associação significativa entre as variáveis e a presença de *S. aureus*.

Tabela 1. Perfil sócio demográfico, carregamento de *S. aureus* e condições clínicas de pacientes com RSCcP

Pacientes com RSCcP		<i>S. aureus</i>		p-valor
		carreadores	não carreadores	
Aspectos demográficos				
Sexo	Feminino	12	14	0,3818
	Masculino	15	9	
Idade	Média ± desvio padrão	50,5 ± 14,8	49 ± 16,8	-
Escolaridade	Analfabeto	1	1	0,5008
	Fundamental	14	14	
	Médio	7	7	
	Superior	5	1	
Comorbidades				
Doença crônica ¹	Não	9	7	1,0000
	Sim	18	16	
Uso de medicamentos				
Medicação para sinusite ²	Não	7	5	0,9894
	Sim	20	18	
Uso de antimicrobianos	há menos de 1 ano	12	10	1,0000
	há mais de 1 ano	15	13	
Esteróide ³	Não	21	17	1,0000
	Sim	06	06	
Tratamentos prévios				
Cirurgia	Não	18	19	-
	Sim	9	4	
Número de cirurgias	Média ± desvio padrão	1,1 ± 0,4	2,0 ± 1,7	-
Tempo (anos)	Média ± desvio padrão	5,7 ± 4,0	5,8 ± 3,1	-

Valores significativos para $p < 0,05$. RSCcP: Rinossinusite crônica com polipose nasossinusal.¹ doenças crônicas: Hipertensão arterial sistêmica, Diabetes Mellitus, Hipotireoidismo, Gastrite, Úlcera Gástrica, Esteatose hepática, Hipercolesterolemia, Pitíriase, Asma, Migrânea, Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica, Artrose.² medicação para sinusite: antibiótico, antialérgico, corticosteroide nasal, corticosteroide sistêmico, soro nasal, vasoconstritor nasal, cauterização de conchas nasais inferiores.³ esteróide: prednisolona, dipropionato de betametasona, fosfato dissódico de betametasona, dexametasona.

Todos os isolados de *S. aureus* apresentaram a capacidade de produzir o biofilme e 32 (91,4%) carregavam o gene *icaA*. Em relação aos genes de superantígenos, os genes das

enterotoxinas A, B e C (genes *sea*, *seb* e *sec-1*) foram detectados em 8,6%, 2,8% e 42,8% de *S. aureus*, respectivamente. Já os genes *sed* e *tst*, referentes às enterotoxinas D e à toxina 1 da síndrome do choque tóxico, não foram detectados nesses isolados (Figura 1).

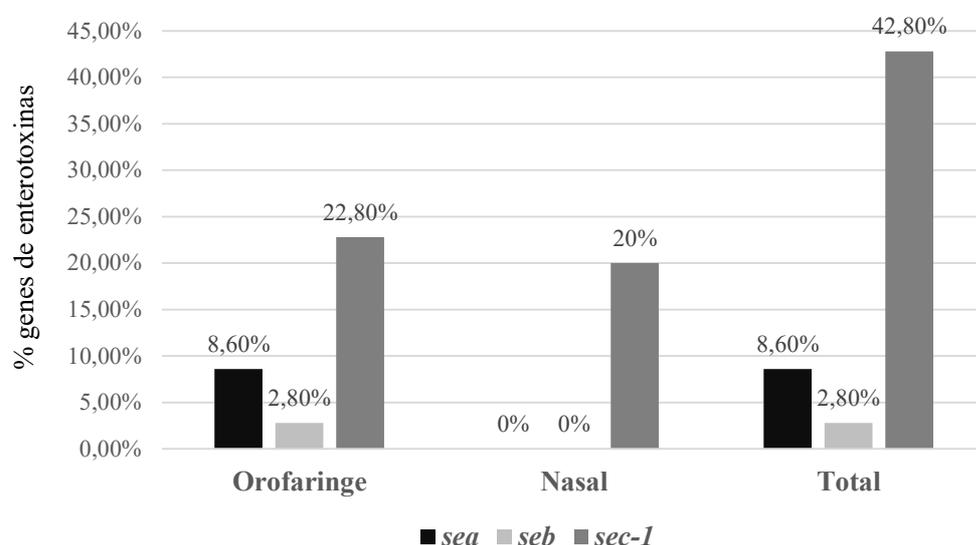


Figura 1. Frequência dos genes de enterotoxinas (*sea*, *seb*, *sec-1*) de *S. aureus* isolado das cavidades nasais e/ou orofaringe de pacientes com RSCcP.

A determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizada e a resistência de *S. aureus* à penicilina foi verificada em 71,4% dos isolados, à claritromicina em 65,7%, à cefoxitina em 17,1%, à amoxicilina com ácido clavulânico em 5,7%, à linezolida em 5,7%, à eritromicina em 60,0%, à levofloxacina em 5,7% e à tetraciclina em 20,0% (Tabela 2).

O teste de produção de β -lactamase, detectou a produção desta enzima em 26 (74,3%) *S. aureus* e a concordância entre a produção de β -lactamase e a resistência à penicilina foi de 65,7%.

O teste D foi detectado em 14 (40%) isolados, de acordo com a observação de um halo em forma da letra D entre os discos de clindamicina e eritromicina, sugerindo a resistência induzida aos macrolídeos.

O disco de cefoxitina é utilizado para a detecção fenotípica da resistência à meticilina, e sugeriu a detecção de 17,1% de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e o índice de MAR determinou a múltipla resistência em 74,3% dos isolados.

Tabela 2. Determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos por *S. aureus* isolados da orofaringe e cavidade nasal de pacientes com RSCcP.

ANTIMICROBIANO		NASAL	ORAL	P-valor
Cefoxitina	R	4	2	0,3791
	S	12	17	
Amoxicilina com ácido clavulânico	R	1	1	1,000
	S	15	18	
Claritromicina	R	12	11	0,4759
	S	4	8	
Linezolida	R	1	11	1,000
	S	15	18	
Clindamicina	R	0	0	---
	S	16	19	
Eritromicina	R	11	10	0,4906
	S	5	9	
Levofloxacina	R	2	0	0,2017
	S	14	19	
Penicilina	R	12	13	0,7233
	S	4	6	
Tetraciclina	R	4	3	0,6772
	S	12	16	

R: resistente; S: sensível.

Considerando os 40 pacientes que realizaram os testes sorológicos, foram quantificados os leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos e linfócitos) e as imunoglobulinas e notou-se o aumento dos níveis séricos de IgA, IgG, IgM e IgE em 7,5%, 8,1%, 5,1% e 40%, respectivamente. Verificou-se a redução dos níveis de IgA em 2,5% e de IgM em 5,1% das amostras. Com exceção da IgG, que apresentou valores mais homogêneos, as demais imunoglobulinas e leucócitos apresentaram coeficiente de variação acima de 25%, apresentando variabilidade dos resultados (Tabela 3).

Tabela 3. Valores dos níveis de imunoglobulinas (kU/L) e leucócitos (K/ul) dosados em pacientes com RSCcP.

	Média	DP	CV	Mínimo	Máximo
<i>Imunoglobulinas</i>					
IgA (70 a 400 kU/L)	272,0	112,4	41%	10,0	608,0
IgG (700 a 1600 kU/L)	1193,1	232,3	19%	853,0	1736,0
IgM (40 a 230 kU/L)	104,8	59,0	56%	32,0	259,0
IgE (até 140 kU/L)	284,0	486,7	171%	3,7	2532,0
<i>Leucócitos</i>					
Neutrófilos (1,9 a 6,1 K/ul)	4,30	1,98	46,0%	1,52	10,88
Eosinófilos (0,03 A 0,38 K/ul)	0,46	0,34	72,3%	0,04	1,42
Basófilos (0,00 a 0,16 K/ul)	0,04	0,02	65,9%	0,01	0,09
Linfócitos (1,00 a 3 K/ul)	2,47	0,95	38,5%	1,30	5,21
Monócitos (0,2 a 0,8 K/ul)	0,60	0,24	39,6%	0,24	1,24
Leucócitos totais (4,2 a 9,5 K/ul)	7,89	2,68	33,9%	3,94	14,64

DP: desvio-padrão; CV: coeficiente de variação

A correlação entre os níveis de IgM e IgG foi significativa ($p=0,02$), sendo considerada moderada ($r=0,4$) e positiva, ou seja, quanto maior a concentração dos níveis de IgM nos pacientes com RSCcP, maior a concentração de IgG (Figura 2).

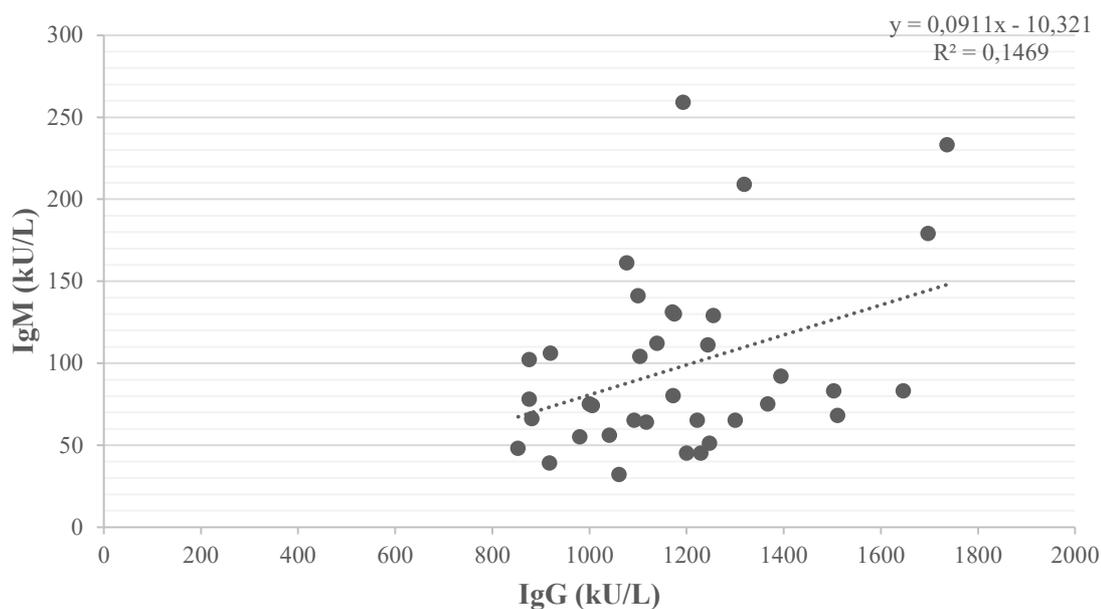


Figura 2. Distribuição dos níveis séricos de IgM e IgG em pacientes com RSCcP.

Foi verificada a associação entre o carregamento de *S. aureus* (nasal e/ou orofarínge) e a dosagem de imunoglobulinas e contagem de leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos e linfócitos) e houve associação entre a presença de *S. aureus* e o aumento nos níveis de monócitos ($p=0,0112$) e linfócitos ($p=0,0248$) (Figura 3).

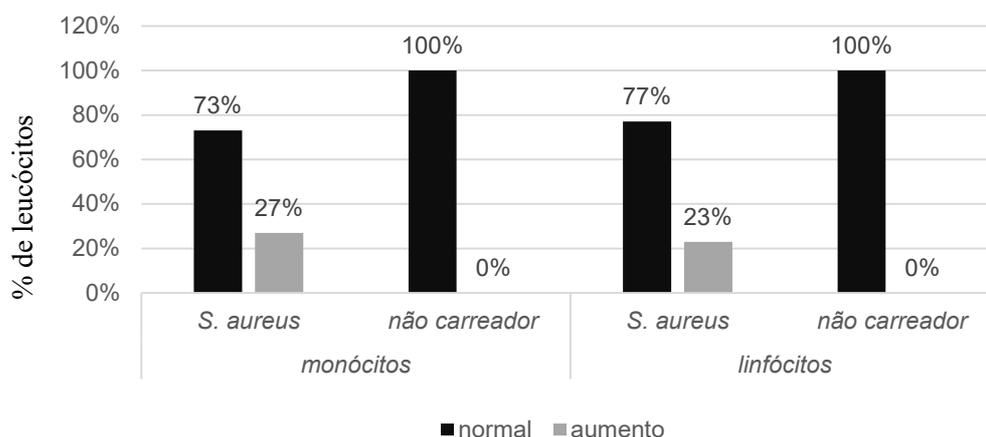


Figura 3. Determinação da associação entre o carregamento de *S. aureus* por pacientes com RSCcP e o aumento nos níveis de monócitos e linfócitos.

Entre os pacientes carreadores de *S. aureus*, foi verificada a associação dos genes de superantígenos e os níveis de leucócitos e imunoglobulinas, e houve uma associação significativa entre os níveis de IgE e a presença do gene *sec-1* ($p=0,0358$) (Figura 4).

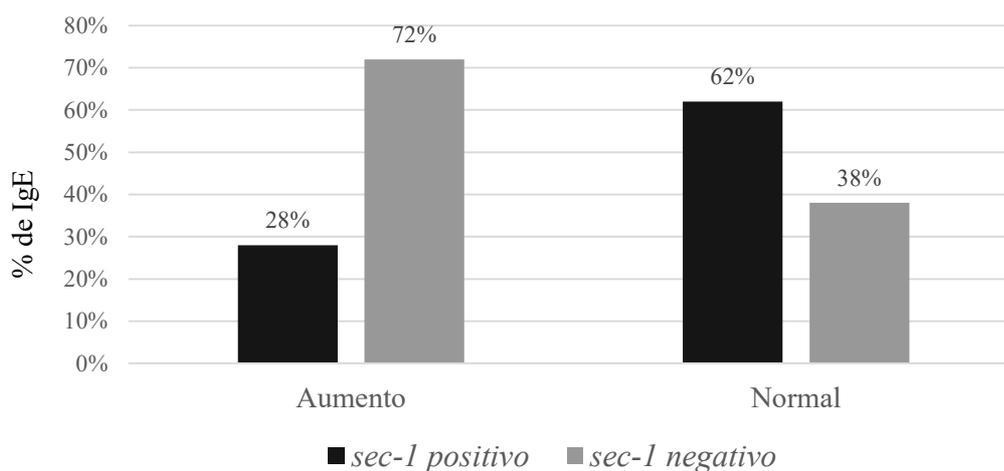


Figura 4. Determinação da associação entre o gene *sec-1* e os níveis de Imunoglobulina E (IgE) em pacientes com RSCcP carreadores de *S. aureus*.

DISCUSSÃO

A Rinossinusite crônica com polipose nasossinusal envolve um processo inflamatório multifatorial que inclui interações dos microrganismos com o ambiente e o perfil genético dos hospedeiros. Estudos apontam a colonização nasal por *S. aureus* em pacientes com essa doença^(37,38), e o presente estudo visou o isolamento de *S. aureus* em pacientes com RSCcP e a caracterização dos fatores de virulência associados ao processo inflamatório, além de verificar o perfil de susceptibilidades aos antimicrobianos.

O carreamento de *S. aureus* foi detectado em 54,0% dos pacientes com RSCcP, dados similares aos encontrados por Thienhaus et al⁽³⁹⁾ e Bachert et al⁽¹⁹⁾, que isolaram essa bactéria em 50% e 60% dos pacientes, respectivamente. A região da orofaringe apresentou maior frequência de isolamento quando comparada a região nasal, sendo um sítio que apresenta proximidade com a região de localização dos pólipos. Em oito pacientes foram isolados *S. aureus* de ambos locais (nasal e orofaringe) apontando a importância da coleta dessa bactéria em diferentes sítios devido a policlonalidade de *S. aureus* em um mesmo indivíduo. Segundo Muenks et al⁽⁴⁰⁾, o carreamento de mais de um subtipo de *S. aureus* pode favorecer a transferência horizontal de genes de resistência e de fatores de virulência entre essas bactérias, contribuindo para a patogenicidade do microrganismo.

Os dados demográficos e/ou clínicos dos pacientes estudados não foram associados ao carreamento de *S. aureus*. Estudo realizado por Mackenzie et al⁽⁴¹⁾ também não detectou diferença significativa na carga ou transporte de *S. aureus* entre os grupos de pacientes com RSCcP. Entretanto, esses autores ressaltam a versatilidade de *S. aureus* em estimular uma série de resposta imunológicas do hospedeiro e também evadir dessas defesas, sendo essas características associadas aos fatores de virulência da bactéria e não do paciente com RSC.

Entre os isolados de *S. aureus*, a multirresistência aos antimicrobianos utilizados no tratamento das infecções estafilocócicas foi detectada. As maiores frequências de resistência foram à penicilina, claritromicina e eritromicina. Segundo Mariante et al⁽⁴²⁾ as taxas de resistência dos estafilococos à penicilina variam de 74 a 97,6%. Nosso estudo ainda evidenciou que 74,3% dos isolados foram produtores de β -lactamase, que é uma enzima que hidrolisa o anel β -lactâmico antes de sua ligação no sítio de ação. A resistência à metilina foi detectada através do método de disco-difusão com o disco de cefoxitina, porém o gene *mecA* não foi pesquisado para confirmação desse resultado.

O presente estudo apresentou a melhor eficácia da amoxicilina com ácido clavulânico quando comparada à eritromicina, e detectou o perfil de resistência induzida aos

macrolídeos em 60% dos *S. aureus*. A amoxicilina com ácido clavulânico é considerada o antibiótico de primeira escolha em centros primários de saúde, por sua eficácia e baixo custo. Já os macrolídeos, tais como a eritromicina, apresentam eficácia comparável à amoxicilina com ácido clavulânico e são indicados para pacientes alérgicos aos β -lactâmicos⁽⁴³⁾.

Apesar da menor frequência da resistência dos estafilococos aos demais antimicrobianos testados (tetraciclina, levofloxacina, linezolida e clindamicina) esses dados são de extrema importância, visto que alguns desses agentes, tais como a linezolida, são utilizadas como últimas opções de tratamento em infecções graves causadas por *S. aureus* resistentes à meticilina⁽⁴⁴⁾.

Embora nas rinosinusites crônicas a antibioticoterapia é coadjuvante⁽⁴⁵⁾, essa doença representa 7,1% das prescrições de antimicrobianos, sendo mais do que qualquer outro diagnóstico primário^(46,47). A utilização indiscriminada de antimicrobianos nesses pacientes, pode selecionar microrganismos resistentes, dificultando o tratamento da doença e agravando o quadro clínico.

A capacidade de formação de biofilme também é um fator importante na RSCcP, já que está associada a doença mais grave, de difícil tratamento, com maior recidiva pós-operatória⁽⁴⁸⁾, além de contribuir para a lesão da mucosa nasal e aumentar o número de células inflamatórias no tecido⁽⁴⁹⁾. Singh et al⁽⁴⁹⁾ verificaram a produção de biofilme bacteriana em 52% dos pacientes com RSC e demonstraram a prevalência em 67% daqueles que apresentaram RSCcP. O presente estudo evidenciou capacidade de formação de biofilme em todos *S. aureus* isolados, sendo que 91,4% dos biofilmes tiveram sua formação mediada pelo polissacarídeo de adesão intercelular (PIA). O PIA é codificado pelo operon *ica*, sendo o gene *ica*, um dos principais codificantes desse polissacarídeo⁽⁵⁰⁾.

A pesquisa dos genes de superantígenos detectou os genes mediadores das enterotoxinas A, B e C, porém não houve associação das enterotoxinas A e B com os leucócitos e imunoglobulinas pesquisadas. Embora a enterotoxina B foi a mais estudada, por apresentar um perfil pró-inflamatório na mucosa nasal^(19,51,52), foi o gene da enterotoxina C que apresentou associação com a produção de IgE. Houve também a associação entre monócitos e linfócitos, indicando a resposta inflamatória. Sabe-se que os superantígenos são apontados como importantes fatores de virulência implicados na fisiopatologia dos pólipos nasais, associados a síntese local de IgE policlonal, o que pode contribuir para uma inflamação grave por meio de ativação de mastócitos⁽¹⁹⁾.

Cheng et al⁽²⁴⁾ detectaram as enterotoxinas A e B de *S. aureus* isolados de pacientes com RSCcP, porém não houve associação com IgE. Esses autores sugerem que as

enterotoxinas de *S. aureus* podem desempenhar um papel na gravidade da RSCcP, mas apontam a necessidade de mais estudos para avaliar outras enterotoxinas que possam desempenhar o papel de superantígeno na presença do pólipos nasal, já que a maioria dos estudos limitam-se as enterotoxinas A e B. A detecção do gene da enterotoxina C no presente estudo ressalta a importância de estudos que verifiquem a produção dessa enterotoxina por *S. aureus* em pacientes com RSCcP e a correlação desse superantígeno com a menor recidiva dos pólipos nasais nesses pacientes.

As limitações do estudo envolvem a não participação de 10 pacientes na coleta de sangue periférico para a dosagem de leucócitos e imunoglobulinas e também a obtenção de amostras bacterianas em apenas um momento do estudo, não sendo possível determinar se o indivíduo é colonizado permanentemente ou transitoriamente por *S. aureus*. Além disso, não foi comprovada a produção da enterotoxina C pelos isolados obtidos, que deverá ser pesquisada em etapas posteriores.

Os dados apontaram a importância da detecção dos fatores de virulência de *S. aureus* e da susceptibilidade aos antimicrobianos em pacientes com RSCcP carreadores de *S. aureus* para melhor conhecimento desse isolado e estratégias para o tratamento do paciente. A descolonização nasal visa diminuir a carga bacteriana afim de diminuir a disseminação e infecção e no caso de pacientes com RSCcP, diminuir a resposta inflamatória. Os agentes de descolonização tópica nasal incluem: mupirocina, bacitracina, ácido fusídico, iodopovidona, antisséptico nasal à base de álcool, terapia fotodinâmica, lisostafina, entre outros. Alguns agentes descolonizantes afirmam eliminar completamente a carga bacteriana, enquanto outros apenas a diminuem⁽⁵³⁾. Existem poucos dados sobre o nível em que a carga bacteriana deve ser reduzida para evitar a transmissão e infecções, porém pode ser uma estratégia para evitar a recidiva dos pólipos em pacientes após a cirurgia.

Portanto, o presente estudo detectou 54% de pacientes com RSCcP carreadores de *S. aureus* produtores de biofilme, sendo 74,3% multirresistentes aos antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções estafilocócicas. Houve associação negativa entre o gene da enterotoxina C e a produção de IgE, sugerindo que essa enterotoxina pode ser um fator protetor, não desencadeando uma resposta inflamatória que levaria a formação dos pólipos nasais nesses pacientes. Os dados ressaltam que conhecimento sobre o carreamento nasal de bactérias patogênicas, como *S. aureus* em pacientes com RSCcP deve ser investigado para melhores estratégias de tratamento, para evitar a recidiva dos pólipos nasais após a remoção cirúrgica.

AGRADECIMENTOS

Nosso agradecimento aos alunos de Ciências Biológicas e Biomedicina da Universidade do Oeste Paulista, que contribuíram imensamente nas análises laboratoriais.

CONTRIBUIÇÕES DAS AUTORIAS

Andressa Côrtes Cavalleri: elaboração, coleta e análise dos resultados

Tháísa Piccinini de Souza: detecção da produção de biofilme e susceptibilidade aos antimicrobianos

Iranildo do Amarante Fernandes: detecção dos genes de fatores de virulência

Rafael da Silva Rosa: extração de DNA bacteriano

Giovana do Nascimento Pereira: identificação das espécies bacterianas

Gabriel Henrique Maximino Santos: isolamento das culturas bacterianas

Nathalia Rebolho Turozi: detecção da susceptibilidade aos antimicrobianos

Luiz Euribel Prestes Carneiro: elaboração e correção dos resultados

Valéria Cataneli Pereira: elaboração, análise dos resultados correção final

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram que não houve conflitos de interesse.

FINANCIAMENTO

Universidade do Oeste Paulista.

REFERÊNCIAS

1. Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J, et al. POSITION PAPER EPOS 2012 : European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012 . A summary for otorhinolaryngologists 2012;1–12.
2. Yip J, Vescan AD, Witterick YJ, Monteiro E. The personal financial burden of chronic rhinosinusitis : A Canadian perspective. *Am J Rhinol Allergy* 2017;31(4):216–221.
3. Rosenfeld RM, Piccirillo JF, Chandrasekhar SS, Brook I, Kumar KA, Kramper M, et al. Clinical Practice Guideline (Update): Adult Sinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2015; 152 (2S): S1-S39.
4. Kashani S, Carr TF, Grammer LC, et al. Clinical Characteristics of Adults with Chronic Rhinosinusitis and Specific Antibody Deficiency. *J Allergy Clin Immunol Pr.* 2016;34(5):352–359.
5. Carr TF, Koterba AP, Chandra R, et al. Characterization of specific antibody deficiency in adults with medically refractory chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol Allergy* 2011;25(4):241–244.
6. Vickery TW, Ramakrishnan VR, Suh JD. The Role of *Staphylococcus aureus* in Patients with Chronic Sinusitis and Nasal Polyposis. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2017;176:139–148.
7. Navinés-ferrer A, Serrano-candelas E, Martín M. IgE-Related Chronic Diseases and Anti-IgE-Based Treatments. *J Immunol Res.* 2016; 2016:8163803.
8. Ramadan HH, Fornelli R, Ortiz AO, Rodman S. Correlation of Allergy and Severity of Sinus Disease. *Am J Rhinol.* 1999;13:345–347.
9. Newman LJ, Platts-Mills TA, Phillips CD. Chronic sinusitis. Relationship of computed tomographic findings to allergy, asthma, and eosinophilia. *JAMA.* 1994; 271: 363–367.
10. Lemos-Rodriguez AM, Farzal Z, Sreenath SB, Thorp BD, Jr CSE. The impact of total immunoglobulin E levels on outcomes of maximal medical therapy for chronic rhinosinusitis. *Allergy Rhinol (Providence).* 2017; 8 (1):5–12.
11. Kim DW, Cho SH. Emerging Endotypes of Chronic Rhinosinusitis and Its Application to Precision Medicine. *Allergy Astma Immunol Res.* 2017; 9(4):299–306.
12. Bachert C, Gevaert P, Holtappels G, Johansson SGO, Van Cauwenberge P. Total

- and specific IgE in nasal polyps is related to local eosinophilic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;107(4):607–614.
13. Euzéby JP. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. *Nucleic Acids Res*. 2014; 42(Database issue):D613-D616.
 14. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM, Dinges MM, Orwin PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus* Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinic Microbiol Rev*. 2000;13(1):16–34.
 15. Tantilipikorn P, Bunnag C, Nan Z, Bachert C. *Staphylococcus aureus* superantigens and their role in eosinophilic nasal polyp disease. *Asian Pacific J Allergy Immunol*. 2012;30(3):171–176.
 16. Bergdoll MS, Surgalla MJ, Dack GM. Staphylococcal enterotoxin: identification of a specific precipitating antibody with enterotoxin neutralizing property. *Journal Immunology*. 1959; 83:334-8.
 17. Jarraud S, Cozon G, Vandenesch F, Bes M, Etienne J, Lina G. Involvement of enterotoxins G and I in staphylococcal toxic shock syndrome and staphylococcal scarlet fever. *J Clin Microbiol*. 1999; 37:2446-49.
 18. Marrack P, Kappler J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science*. 1990; 248(4956):705–711.
 19. Bachert C, Zhang N, Patou J, van Zele T, Gevaert P. Role of staphylococcal superantigens in upper airway disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2008; 8(1):34–38.
 20. Fey PD, Olson ME. Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Future Microbiol*. 2010;5(6):917–933.
 21. Otto M. Virulence factors of the coagulase-negative staphylococci. *Front Biosci*. 2004;9:841-863.
 22. Pezato R, Balsalobre L, Lima M, et al. Convergence of two major pathophysiologic mechanisms in nasal polyposis: immune response to *Staphylococcus aureus* and airway remodeling. *J Otolaryngol Head Neck Surg*. 2013; 42:27.
 23. Gosepath J, Mann WJ. Current concepts in therapy of chronic rhinosinusitis and nasal polyposis. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 2005;67(3):125–136.
 24. Cheng KJ, Xu YY, Zhou ML, Zhou SH, Wang SQ. Role of local allergic inflammation and *Staphylococcus aureus* enterotoxins in Chinese patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Laryngol Otol*. 2017; 131: 707–713.

25. Khashei R, Malekzadegan Y, Ebrahim-Saraie HS, Razavi Z. Phenotypic and genotypic characterization of macrolide, lincosamide and streptogramin B resistance among clinical isolates of staphylococci in southwest of Iran. *BMC Res Notes*. 2018; 11:711.
26. Muluk NB, Altın F, Cingi C. Role of Superantigens in Allergic Inflammation: Their Relationship to Allergic Rhinitis, Chronic Rhinosinusitis, Asthma, and Atopic Dermatitis. *Am J Rhinol Allergy* 2018; 32: 502–517.
27. Langier S, Landsberg R, Sade K, Kivity S. Anti-IL5 immunomodulates the effect of *Staphylococcus aureus* enterotoxin on T cell response in nasal polyps. *Rhinology* 2011; 49: 570-576.
28. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC. *Color Atlas and Textbook of diagnostic microbiology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott; 1997. 1736 p.
29. Pereira VC, Martins A, de Souza Rugolo LM, de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha M. Detection of Oxacillin Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolated from the Neonatal and Pediatric Units of a Brazilian Teaching Hospital. 2009;3:23-31.
30. Riffon R, Sayasith K, Khalil H, Dubreuil P, Drolet M, Lagacé J. Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *J Clin Microbiol*. 2001;39(7): 2584-2589.
31. Clinical and Laboratory Standards (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, document M100-S23. 2016.
32. Krumperman PH. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Appl Environ Microbiol*. 1973; v.46, (1): 165-170.
33. Freeman D, Falkiner F, Keane C. New method for detecting slime production by coagulase-negative staphylococci. *J Clin Pathol*. 1989;42:872–874.
34. Arciola CR, Gamberini S, Campoccia D, et al. A multiplex PCR method for the detection of all five individual genes of the *ica* locus in *Staphylococcus epidermidis*. A survey on 400 clinical isolates from prosthesis-associated infections. *J Biomed Mater Res Part A*. 2005;75A(2):408–413.
35. Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP, Ashton FE, Pollard DR, Rozee KR. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*.

- 1991;29(3):426–430.
36. Cunha MLRS, Calsolari RAO. Toxigenicity in *Staphylococcus* with emphasis on coagulase- negative staphylococci. *Appl Microbiol.* 2007;778–782.
 37. Hayes SM, Biggs TC, Goldie SP, Harries PG, Walls AF, Allan RN, et al. *Staphylococcus aureus* internalization in mast cells in nasal polyps: Characterization of interactions and potential mechanisms. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;1–13.
 38. Wagner Mackenzie B, Baker J, Douglas RG, Taylor MW, Biswas K. Detection and quantification of *Staphylococcus* in chronic rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2019;9:1462–1469.
 39. 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 – 561.
 40. Muenks CE, Hogan PG, Wang JW, Eisenstein KA, Burnham CAD, Fritz SA. Diversity of *staphylococcus aureus* strains colonizing various niches of the human body. *J Infect.* 2016; 72(6): 698-705.
 41. Mackenzie BW, Baker J, Douglas RG, Taylor MW, Biswas K. Detection and qualification of *staphylococcus* in chronic rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2019; 9(12):1462–1469.
 42. Mariante AR, Araújo E, Dalligna C, et al. Microbiology of Middle Meatus in Healthy Individuals. *Int. Arch. Otorhinolaryngol.* 2008; 12:506-512.
 43. Anselmo-Lima WT, Sakano E. Rinossinusites: evidências e experiências. *Braz. j. otorhinolaryngol* 2015; 81:1-49.
 44. Kobayashi CCBA, Sadoyama G, Vieira JDG. Determinação da resistência antimicrobiana associada em isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* em um hospital público de Goiânia, Estado de Goiás. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2009;42: 404-410.
 45. Kingdom TT, Swain RE. The microbiology and antimicrobial resistance patterns in chronic rhinosinusitis. *Am J Otolaryngol - Head Neck Med Surg.* 2004; 25: 323–328.
 46. Ramakrishnan VR, Mace JC, Soler ZM, Smith TL. Examination of high-antibiotic users in a multi-institutional cohort of CRS patients. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2017; 7(4): 343-351.
 47. Smith SS, Evans CT, Tan BK, Chandra RK, Smith SB, Kern RC. National burden

- of antibiotic use for adult rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2013; 132(5).
48. Wu X, Zhang Y, Chen X, Chen J, Jia M. Inflammatory immune response in rabbits with *Staphylococcus aureus* biofilm-associated sinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol* 2018; 8: 1226–1232.
49. Singh P, Mehta R, Agarwal S, Mishra P. Bacterial biofilm on the sinus mucosa of healthy subjects and patients with chronic rhinosinusitis (with or without nasal polyposis). *J Laryngol Otol* 2015; 129: 46–49.
50. 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: 2151–2156.
51. Biggs TC, Hayes SM, Harries PG, Allan RN, Walls AF, Pender SLF, Salib RJ. Immunological profiling of key inflammatory drivers of nasal polyp formation and growth in chronic rhinosinusitis. *Rhinology.* 2019; 57(5): 336–342.
52. Calus L, Derycke L, Dullaers M, Zele TV, De Ruyck N, Pérez-Novo C, Holtappels G, De Vos G, Lambrecht BN, Bachert C, Gevaert P. IL-21 is increased in nasal polyposis and after stimulation with staphylococcus aureus enterotoxin B. *Int Arch Allergy Immunol.* 2017; 174 (3-4):161-169.
53. Septimus EJ, Schweizer ML. Decolonization in prevention of health care-associated infections. *Clin Microbiol Rev.* 2016; 29(2): 201–222.

APÊNDICES

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: Avaliação de imunodeficiência e caracterização de *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* em pacientes com rinossinusite crônica

Nome da Pesquisadora: Andressa Côrtes Cavalleri

Nome da Orientadora: Profa. Dra. Valéria Cataneli Pereira

Nome da Co-Orientadora: Prof. Dr. Luiz Euribel Prestes Carneiro

1. **Natureza da pesquisa:** o Sra (Sr.) está sendo convidada (o) a participar desta pesquisa que tem como finalidade determinar a presença de uma bactéria que pode estar envolvida no desenvolvimento da Rinossinusite Crônica além de avaliar a sua imunidade através da coleta de sangue e da aplicação de uma vacina.
2. **Participantes da pesquisa:** Serão convidados 70 pacientes que passarem por atendimento no ambulatório de otorrinolaringologia de Presidente Prudente, sendo 20 pacientes saudáveis e 50 pacientes com o diagnóstico de Rinossinusite Crônica.
3. **Envolvimento na pesquisa:** ao participar deste estudo, a (o) sra (sr.) permitirá que o (a) pesquisador (a) realize a coleta de bactérias do seu nariz, realize a coleta de sangue e a vacina contra uma das possíveis bactérias que causa a rinossinusite. O Sr (a) permitirá ainda que o material coletado possa ser utilizado em projetos futuros. O Sr (a) tem liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo. Sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa através do telefone do (a) pesquisador (a) do projeto e, se necessário através do telefone do Comitê de Ética em Pesquisa, que é o órgão que avalia se não há problemas na realização de uma pesquisa com seres humanos.
4. **Sobre as entrevistas:** Será aplicado um questionário socioeconômico que inclui Dados demográficos (sexo, idade); doenças; Utilização de serviços de saúde (incluindo internações e outros procedimentos) nos últimos 12 meses; Ocorrência de infecções nos últimos 12 meses; Utilização de antimicrobianos nos últimos 12 meses; Frequência em instituição fechada (creche, casa de repouso, presídio). Uso de álcool e drogas ilegais.
5. **Riscos e desconforto:** a participação nesta pesquisa não infringe as normas legais e éticas. Serão coletadas amostras bacterianas presentes no seu nariz e na sua garganta utilizando um cotonete esterilizado, de forma que não cause qualquer risco e desconforto. Para avaliar a imunidade, será necessária a coleta de pequena quantidade de sangue da veia do braço, feita

com agulha fina, apropriada, e que causará uma sensação de picada, realizada por uma pessoa com prática em apenas um (1) dia, na sala de coleta do Laboratório São José em Presidente Prudente. Para a vacina, haverá um desconforto mínimo pela picada da agulha durante esse procedimento. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução no. 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. Nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade.

6. **Confidencialidade:** todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente o (a) pesquisador (a) e seu (sua) orientador (a) (e/ou equipe de pesquisa) terão conhecimento de sua identidade e nos comprometemos a mantê-la em sigilo ao publicar os resultados dessa pesquisa.

7. **Benefícios:** ao participar desta pesquisa você poderá ter aumentado sua imunidade contra a bactéria que pode ser uma das causadoras da rinossinusite e o estudo trará informações importantes sobre a caracterização das bactérias, da sua imunidade e possibilitará melhora no tratamento dos pacientes com Rinossinusite Crônica em pesquisas futuras.

8. **Pagamento:** O Sr (a) não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto preencha, por favor, os itens que se seguem: Confiro que recebi uma via deste termo de consentimento, e autorizo a execução do trabalho de pesquisa e a divulgação dos dados obtidos neste estudo.

Obs: Não assine esse termo se ainda tiver dúvida a respeito.

Tendo em vista os itens acima apresentados, eu, _____, de forma livre e esclarecida, manifesto meu consentimento em participar da pesquisa.

Assinatura do Participante da Pesquisa

Assinatura do Pesquisador

Assinatura do Orientador

Pesquisador: Andressa Côrtes Cavalleri

Orientador: Valéria Cataneli Pereira (14) 98111-----

Co-Orientadora: Prof. Dr. Luiz Euribel Prestes Carneiro

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP): Profa. Dra. Gisele Alborghetti Nai

Vice-Coordenadora do CEP: Profa. Dra. Rosa Maria Barilli Nogueira.

Telefone do Comitê: (18) 3229-2077 - **E-mail:** cep@unoeste.br

APÊNDICE B
QUESTIONÁRIO APLICADO AOS SUJEITOS DA PESQUISA NO MOMENTO DA
COLETA DOS SWABS.

Dados gerais:

Nome: _____

Data Nascimento: __/__/__

Idade: _____ Gênero: __ Profissão: _____ Escolaridade: _____

Se estudante (inclusive universitário):

Escola: _____ Turno: _____ Pública? () S () N

Tem alguma dessas doenças:

() Doença cardíaca. Qual? _____

() Doença pulmonar. Qual? _____

() Doença renal. Qual? _____

() Doença hepática. Qual? _____

() Doença neurológica. Qual? _____

() Diabetes mellitus. Usa insulina? () S () N. ()

() Neoplasia. Qual? _____

() Aids.

() Úlceras crônicas. Onde? _____

() Outra(s) doença(s) crônica(s): _____

No último ano, apresentou:

() Infecções de pele. Há quanto tempo? _____

() Pneumonia. Há quanto tempo? _____

() Outra infecção. Qual? _____. Há quanto tempo? _____

Uso de medicação no último ano:

() Antibiótico(s). Qual(is)? _____. Quando? _____

() Esteróide. Qual? _____. Quando? _____

() Outra(s) medicação(ões). Qual(is)?: _____

Quando? _____

Internação e outros procedimentos no último ano:

() Internação. () S () N. Quando? _____

() Cirurgia. Qual? _____. Quando? _____

() Hemodiálise. Desde Quando? _____

Outro procedimento. Qual? _____ . Quando? _____

Consulta ambulatorial. Quando? _____

Por que: _____

Álcool e outras substâncias:

Etilismo: atual; passado.

Desde Quando? _____ Bebida, doses/semana: _____

Tabagismo. atual; passado.

Desde Quando? _____ Cigarros-dia: _____

Droga(s) inalatória(s). Qual(is)?: _____

Droga(s) injetável(s). Qual(is)?: _____

Instituições fechadas que frequentou no último ano:

Creche. Qual? _____

Serviço militar

Cadeia ou Presídio. Onde? _____

Casa de repouso. Qual? _____

Outra. Qual? _____

Apresenta o diagnóstico de Rinossinusite Crônica?

Sim Não

Se sim, há quanto tempo foi realizado o diagnóstico?

menos de 1 ano

1 a 2 anos

2 a 3 anos

3 a 4 anos

mais de 4 anos

Já fez cirurgia para Rinossinusite?

Sim Não Se sim, quando? _____ Quantas vezes foi operado por isso? _____

Quais os últimos medicamentos que usou para a sua doença?

ANEXO

NORMAS DE SUBMISSÃO RHINOLOGY – OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN AND INTERNATIONAL SOCIETIES

Thank you for using this template to prepare your manuscript for submission to *Rhinology*. With increasing numbers of papers being submitted we need to request a degree of conformity in order to facilitate the review and publication process for the benefit of our readers. In particular, please ensure you use page and line numbers throughout your article, as this will help enormously with the review process.

Using This Template (Article – general)

The template consists of essential headings along with body text explaining what to include in each section. You should overwrite (or copy and paste (paste special – unformatted text)) the body text with the corresponding section text for your article. Obviously, you should add other headings as needed, and delete the examples and unnecessary text. Please adhere to the font size and type. Please use British English spelling, eg: tumour, colour, analyse

Running title:

Provide a short comprehensive title of no more than 50 characters, e.g.:

RCT Rapid Rhino versus Netcell

TYPE OF ARTICLE

Categorize your article as one of the following types:

REVIEW / MINI REVIEW / ORIGINAL CONTRIBUTION / SPECIAL REPORT / OTHER

Title

The title (font 14) should be specific to the study yet concise, and should allow sensitive and specific electronic retrieval of the article. It should be comprehensible to readers outside your field. Avoid specialist abbreviations if possible. Present this in Sentence case, capitalising only the first word or names, and abbreviations.,

E.g.: A randomised controlled trial comparing Rapid Rhino Mannheim and Netcell series 5000 packs following routine nasal surgery.

Authors (font 12)

Provide the first names or initials (if used), middle names or initials (if used), surnames, and affiliations (use numbers in superscript when more departments have been involved). Do not add any degrees, e.g.

MD, PhD. Separate author names with a comma.

E.g.: Valerie J. Lund¹, W.J. Fokkens²

Affiliation (font 10)

Department, university or organization, city, state/province (if applicable), and country - for all authors.

From here, the paper should be written in font size 12 with spacing of lines at 1.5.

SUMMARY

The abstract succinctly introduces the paper. We advise that it should not exceed 200 words. The abstract is conceptually divided into three or four sections.

Background: include here a statement of the main research question.
Methodology/Principal: include here the techniques used without going into methodological detail.

Results: give a summary of the most important findings with key numerical results given, with measures of error and not just *p* values.

Conclusions: concisely summarise the study's implications.

Please do not include any citations in the abstract. Avoid specialist abbreviations if possible

Key words: Provide up to 5 key words using Mesh terms for indexing purposes

INTRODUCTION

The introduction should put the focus of the manuscript into a broader context. As you compose the introduction, think of readers who are not experts in this field. Include a brief review of the key literature. If there are relevant controversies or disagreements in the field, they should be mentioned so that a non-expert reader can delve into these issues further⁽¹⁾. The introduction should conclude with a brief statement of the overall aim of the experiments and a comment about whether that aim was achieved.

⁽¹⁾ Citations should be included in order of appearance with numbers between (parenthesis) and in superscript.

MATERIALS AND METHODS

This section should provide enough detail to allow full replication of the study by suitably skilled investigators. Protocols for new methods should be included, but well-established protocols may simply be referenced. If applicable, info on ethics approval of either human or animal ethical committees should be stated here.

Various headings should be provided in italics: e.g. *Patients, Surgery, ELISA, Statistical analysis*

RESULTS

The results section should provide details of all the experiments that are required to support the conclusions of the paper. There should be a brief introduction to each section and the section should end with a sentence summarizing the main finding of the experiment without discussion. There is no specific word limit for this section. The section may be divided into subsections, each with a concise subheading (in *italics*).

Large datasets, including raw data, could be submitted as supporting information files; these are published online alongside the accepted article. We advise that the results section be written in past tense.

DISCUSSION

The discussion should spell out the major conclusions of the work along with some explanation or speculation on the significance of these conclusions. How do the conclusions affect the existing assumptions and models in the field? How can future research build on these observations? What are the key experiments that must be done? The discussion should be concise and tightly argued. Conclusions firmly established by the presented data, hypotheses supported by the presented data, and speculations suggested by the presented data should be clearly identified as such. No more new data should be presented in the discussion.

ACKNOWLEDGEMENTS

People who contributed to the work but do not fit criteria for authorship should be listed in the Acknowledgments, along with their contributions. Details of the funding sources that have supported the work should be mentioned here.

AUTHORSHIP CONTRIBUTION

Please describe the individual contributions of each author to the paper.

CONFLICT OF INTEREST

Please describe a possible conflict of interest for each author. If no conflict of interest exists, the authors should also state this.

FUNDING

Please describe whether there was any funding of this work.

REFERENCES

Only published or accepted manuscripts should be included in the reference list. Meeting abstracts, conference talks, or papers that have been submitted but not yet accepted should not be cited. Limited citation of unpublished work should be included in the body of the text only. All personal communications should be supported by a letter from the relevant authors. Rhinology uses the numbered citation (citation-sequence) / Vancouver style method. References are listed and numbered in the order that they appear in the text. In the text, citations should be indicated by the reference number in brackets and placed in superscript. Multiple citations within a single set of brackets should be separated by commas. Where there are more than three sequential citations, they should be given as a range. Example: "... has been shown previously^(1,4-8,22)." Make sure the sections of the manuscript are in the correct order before ordering the citations.

Please use the following style for the reference list., **Please pay attention to the punctuation!:**

JOURNAL ARTICLE:

(List all authors when six or less; when seven or more, list only the first three and add et al.).

1. You CH, Lee KY, Chey WY, Menguy R. Electrogastrographic study of patients with unexplained nausea, bloating and vomiting. *Gastroenterology* 1980; 79: 311-314.

Use the numbering function of your word processor and do not number by hand.

Corporate author:

2. The Royal Marsden Hospital Bone-Marrow Transplantation Team. Failure of syngeneic bone-marrow graft without preconditioning in post-hepatitis marrow aplasia. *Lancet* 1977; 2: 242-244.

No author given:

3. Anonymous. Coffee drinking and cancer of the pancreas (Editorial). *Br Med J* 1981; 283: 628.

BOOKS AND OTHER MONOGRAPHS

Personal author(s):

4. Eisen HN. *Immunology: an introduction to molecular and cellular principles of the immune response*. 5th ed. New York: Harper and Row, 1974.

Editor, compiler, chairman as author:

5. Dausset J, Colombani J, eds. Histocompatibility testing 1972. Copenhagen: Munksgaard, 1973: 12-18.

Chapter in a book:

6. Weinstein L, Swartz MN. Pathogenic properties of invading micro-organisms. In: Sodeman WA Jr, Sodeman WA, eds. Pathologic physiology: mechanisms of disease. Philadelphia: W B Saunders, 1974; 457-472.

When you use Endnote or Reference Manager, remove all embedded links in the final document to prevent incompatibilities with Editorial software.

CORRESPONDING AUTHOR

One of the authors should be designated as the corresponding author. Please add Department, University or Organisation, city, state/province (if applicable), country, Tel, Fax and E-mail.

FIGURES

Always submit high-resolution figures (300 dpi) that meet the following specifications.

File Sizes: Figure files should not exceed 10 MB (average size is about 2 MB).

Image Sizes: Figures should be submitted in final print publication size (printed 1:1). Figures may be published in print in one of two formats: single-column (8.5 cm) or double-column (18.0 cm). The single-column format is preferred. Unless the file size is too large, multi-panel figures should be submitted as a single file.

Text and Lines: Text in figures must be 6-8 points in size, except for single letter markers, which must be 12 points. **Myriad Pro** should be used for all figure text (except for the use of symbols). Line widths must be greater than one point thick or they will not appear on the PDF version of the article.

Numbering: Figures must be numbered as they appear in the text.

File Format: Original figures should be in TIFF (better for halftone art, e.g. blots, photographs), EPS or PPT (better for line art or monochrome art, i.e. anything that involves sharply delineated lines). Figures may be in PowerPoint. All figures should be made as single files to be uploaded on our website.

The editors will determine the degree of any reduction or enlargement required and, in general, line drawings will be reduced to one column width if possible.

Authors may, however, specifically request a larger reproduction. Particular requests should be typed on the relevant figure legend page. Photomicrographs will usually not be reduced unless the reduction involved is small or the height necessitates reduction.

Colour: Colour figures must be in the RGB colour space. Colour printing is available subject to authors meeting the costs involved. We charge € 250 per page with a maximum of € 500. When colour figures have been submitted, it is assumed by the editorial staff the figures will have to be printed in colour and an invoice will be sent.

TABLES

Tables should be typed using the table function in Word or Pages, the required number of cells should be chosen, double spaced, and should contain only horizontal lines. Each table should be on a separate page, numbered consecutively with Arabic numerals, "Table 1", etc.