

Analysis of Biofilms in Recurrent Tonsillitis Using Confocal Laser Scanning Microscope and Fluorescent In Situ Hybridization: A Case-Control Study

Dong Young Kim, Sun Tae Kim, Il Gyu Gang,
Ju Hyun Jung, Dong Wook Park and Joo Hyun Woo

Department of Otolaryngology-Head & Neck Surgery, Gachon University of Medicine & Science Graduate School of Medicine, Incheon, Korea

재발성 편도염 환자에서 레이저초점 주사현미경과 FISH를 이용한 편도 균막의 분석

김동영 · 김선태 · 강일규 · 정주현 · 박동욱 · 우주현

가천의과학대학교 의학전문대학원 이비인후-두경부외과학교실

Received September 13, 2011

Revised October 13, 2011

Accepted October 14, 2011

Address for correspondence

Joo Hyun Woo, MD

Department of Otolaryngology-

Head & Neck Surgery,

Gachon University of

Medicine & Science

Graduate School of Medicine,

1198 Guwol-dong, Namdong-gu,

Incheon 405-760, Korea

Tel +82-32-460-3324

Fax +82-32-467-9044

E-mail woojh@gilhospital.com

Background and Objectives Biofilm is an encased colony of bacteria and the bacteria within the biofilm have resistance to antibiotics and the humoral immune system. Biofilm is currently thought to play an important role and to be very refractory to conventional therapeutics. The aim of this study is to analyze the relationship between the biofilm of the tonsil and recurrent tonsillitis with a case-control study.

Subjects and Method This is a case-control study. The case group included 31 patients who had histories of tonsillitis and the control group included 29 volunteers who had no history of tonsillitis. Confocal laser scanning microscopy was performed to identify biofilms. We compared the prevalence rates of biofilm between the 2 groups. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) was performed to identify bacteria, using probes for *S. aureus*, *S. pyogenes*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, and *K. pneumonia*.

Results In case group, biofilms were found in 22 (71.0%) of 31 and in control group, biofilms were found in 12 (41.4%) of 29. The prevalence rates of biofilm were significantly higher in case group ($p=0.036$). Twenty nine cases were enrolled in FISH and 12 cases of them were positive for FISH. *S. aureus* was most commonly identified.

Conclusion This study suggests that the biofilms could play a causative role in recurrent tonsillitis, further studies are needed to confirm pathogenic relation between biofilm and recurrent tonsillitis.

Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 2011;54:778-83

Key Words Recurrent · Tonsillitis · Biofilm.

서 론

균막은 세균 스스로 만들어내 기질속에서 세균들이 군집을 이루고 있는 구조화된 조직체로 생체 표면에 부착되어 있다.¹⁾ 세균은 균막을 형성함으로써 여러 이점을 가진다. 온도, 습도, pH 등 주위 환경의 급격한 변화나 자외선 노출로부터 자신을 방어할 수 있으며 영양분의 축적이나 폐기물의 배출을 촉진시

킨다.²⁾ 균막내의 세균은 부유성 세균에 비해 인체의 면역반응에 저항성을 가지며 또한 항생제에도 강한 내성을 가진다.^{3,4)}

균막은 그것 자체로는 고병원성이 아니지만 다른 형태로 숙주에 위험을 줄 수 있다. 특히 균막에서 부유성 세균이 떨어져 나가 순환계로 들어갈 경우 전신 질환(systemic disease)을 유발 할 수 있다.⁵⁾ 항생제는 균막에서 떨어져 나온 세균들에 의해 발생하는 증상을 호전시킬 수 있다. 그러나 항생제가 균막 자체

를 완전히 제거할 수 없기 때문에 수술을 통해 균막을 제거하지 않는 한 항생제 치료가 끝난 후 다시 감염이 재발할 수 있다.⁶⁾ 이러한 형태로 균막은 만성 감염에서 중요한 역할을 하는 것으로 인식된다. 치석은 인체에서 발견되는 균막의 가장 흔한 형태이다.⁷⁾ 이외에도 균막과 관련성이 증명된 다른 만성 감염 질환에는 낭성섬유성폐렴, 심내막염, 만성 전립선염, 만성 방광염, 신결석, 골수염, 만성 부비동염, 중이염 등이 있다.^{8,9)} 만성 재발성 편도염은 성인에서 나타나는 흔한 상기도 감염의 하나이다. 인후통, 연하곤란 등의 국소증상과 함께 발열, 근육통과 같은 전신증상도 동반되어 정상적인 일상생활을 어렵게 만든다. 항생제 등의 치료로 증상이 호전되지만 치료 후 다시 증상이 재발할 수 있다. 이런 만성 재발성 편도염과 균막의 관계를 밝히려는 연구가 여러 연구자들에 의해 시도되었다.¹⁰⁻¹²⁾ 이들의 연구에 의해 편도염 또는 편도-아데노이드 질환 환자에서 균막의 존재가 확인되었지만 대조군과 비교한 연구가 없어 균막의 존재 여부와 반복적인 편도감염과의 상관관계가 확실하게 입증된 바가 없었다. 이에 저자들은 빈번한 인후통으로 편도절제술을 받은 환자와 정상 편도의 균막을 비교하여 편도내 균막의 존재와 편도 감염의 상관관계를 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

조직채취

실험군은 최근 2년 동안 1년에 4회 이상 반복적으로 편도염을 앓은 환자 중 편도절제술을 시행한 환자에서 편도절제 후 편도움을 포함한 편도점막 조직을 채취하였다. 수술 당시 편도염을 앓고 있는 환자는 없었다. 대조군은 후두미세수술을 받을 예정인 환자 중에서 최근 2년간 편도염의 병력이 없는 사람 중 자원을 한 환자를 대상으로 수술 도중 우측 편도에서 점막을 채취하였다. 병원의 임상윤리심의를 통과하였으며(GIR-BA2186) 실험에 참여하는 모든 환자에게 실험에 대한 동의를 얻었다. 2009년 10월부터 2011년 3월까지 각각 실험군 31예, 대조군 29예에서 편도점막을 채취하였다.

레이저초점 주사현미경(Confocal laser scanning microscopy) 검사

채취된 조직은 생리식염수에 세척 후 4% 포름알데하이드에서 24시간 동안 고정한다. 고정 후 12시간 이상 흐르는 생리식염수에서 세척하고 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 알코올로 탈수한다. 탈수가 완료되면 자일렌을 이용한 탈알콜 작업을 통하여 알코올을 제거한다. 파라핀 블록을 만들고 5 mm 두께로 박절한다. 박절된 시료를 얹은 슬라이드를 55°C에서 1시간

동안 파라핀 제거 후 알코올 농도를 낮춰가면서 함수 과정을 거친다. 이후 과산화수소에 10분 동안 처리하여 peroxidase의 활성을 저지시킨 후 세척한다. 이후 균막에 표지될 수 있는 형광 지표 live dead kit를 붙여서 암처리 후 실온에서 10분간 배양한다. 이후 다시 물로 씻어 형광물질을 제거하고 다시 탈수 과정을 거친 뒤 건조 후 상피 DNA를 염색하는 DAPI(4', 6-diamidino-2-phenylindole, hydrochloride)로 대조 염색을 시행한다. 준비된 시료에서 레이저초점 주사 현미경(FV500, Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 조직의 균막을 관찰한다. 200배 배율에서 붉은 형광이 나타나면 균막이 존재하는 것으로 판정하였다. 대조군과 실험군의 균막 발현율을 비교하였고 χ^2 -test를 이용하여 검정하였다.

Fluorescent *in situ* hybridization(FISH)

FISH를 이용하여 편도점막에 존재하는 균을 분석하였다. 이를 위해 5' terminal with Cy3에 표시된 Oligonucleotide DNA probe(Bioneer, Deajeon, Korea)를 사용하였다. 편도점막 시료를 유리슬라이드 위에서 열고정시키고 시료를 부합화(hybridization) 버퍼로 세척한다. 특정 FISH 세균 표지자를 부착시키고 37°C에서 한 시간 동안 배양한다. 배양 후 Saline sodium citrate(SSS) 버퍼로 두 차례 세척 후 공기건조를 시행한다. 건조 후 10분 동안 70°C로 가열 후 얼음 위에서 냉각시킨다. 각각의 슬라이드에 부합화 용액 30 μL를 추가 후 plastic cover slip(CoverWell, Perfusion chambers PC1R, Grace Bio-Labs, Oregon, PH, USA)을 덮고 5분 동안 65~70°C에서 슬라이드를 가열한다. 온도를 37°C까지 내린 후 습윤 챔버에서 하룻밤 동안 부합화 과정을 시행한다. 이후 45°C에서 10분 동안 SSS 버퍼로 세척한다. 상온에서 슬라이드를 식히고 DAPI(4', 6-diamidino-2-phenylindole, hydrochloride)로 대조염색을 시행한다. 형광현미경을 이용하여 세균 DNA 부분에 결합된 표지자의 형광을 관찰하여 각각의 세균을 확인한다.

결과

실험군은 남자 13명 여자 18명, 대조군은 남자 13명 여자 16명이었다. 평균 연령은 실험군 30.8세, 대조군은 34.6세였다(Table 1).

이미지 분석

대조군 15번 증례는 레이저초점 주사현미경에서 상피를 나타내는 푸른색의 염색만이 관찰되어 균막 음성으로 판정하였으며 FISH에서도 균주가 나타나지 않았다(Fig. 1). 실험군 17

번 증례는 레이저초점 주사현미경 검사에서 푸른색으로 염색된 상피와 함께 세균을 나타내는 붉은색의 형광염색이 나타나고 있으며 균막 양성으로 판정하였다(Fig. 2A). 또한 FISH에서 *H. influenzae*(Fig. 2B), *S. aureus*에 양성으로 나타났다.

균막 발현의 비교

레이저초점 주사현미경을 이용하여 대조군과 실험군의 균막 발현을 비교했을 때 실험군은 전체 31예 중 22예(71.0%), 실험군은 29예 중 12예(41.4%)에서 균막이 발현되었으며 두 군의 차이는 통계적으로 유의하였다(Fig. 3).

Fluorescent *in situ* hybridization(FISH)

총 27예에서 FISH가 시행되었으며 그 중 실험군은 13예, 대조군은 14예였다.

실험군, 대조군에서 각각 6예씩 총 12예에서 균이 확인되었다. 실험군 6예 중 2예에서 중복감염으로 나타나 실험군 6예에

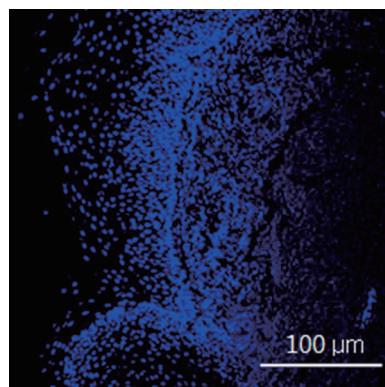


Fig. 1. Confocal laser scanning micrograph of control No. 15 shows only blue fluorescent color which represents epithelium.

Table 1. Demographics of the study subjects

Case	Gender	Age	CLSM	FISH	Control	Gender	Age	CLSM	FISH
1	M	26	P		1	M	43	N	
2	M	37	P		2	M	31	N	
3	F	48	P		3	F	22	N	
4	F	25	P		4	F	42	N	
5	M	45	P		5	M	36	N	
6	M	30	P		6	F	38	P	
7	F	21	N		7	F	25	N	
8	F	55	N		8	M	39	N	
9	F	27	P		9	F	50	P	
10	M	28	P		10	F	36	P	
11	M	36	P		11	F	27	P	
12	M	37	P		12	M	31	N	Sp
13	M	27	P	N	13	F	44	N	Sp
14	M	38	P	N	14	F	35	P	Sn
15	F	28	P	Kn	15	F	46	N	N
16	F	24	N	N	16	F	45	P	N
17	M	39	P	Hi, Sa	17	M	24	P	Sa
18	F	24	P	Sa	18	F	31	P	Sa
19	F	27	P	Sn, Sp	19	M	23	P	Sn
20	M	28	P	Sa	20	M	43	N	N
21	F	42	N	N	21	M	54	N	N
22	F	47	N	N	22	M	31	N	
23	M	18	P	Kn	23	M	27	P	
24	F	23	N	N	24	F	39	N	
25	F	18	P	N	15	M	18	N	
26	F	25	P		26	F	25	N	N
27	F	36	P		27	M	28	P	N
28	F	24	P		28	F	48	P	N
29	M	29	N		29	F	23	N	N
30	F	25	N						
31	F	18	N						

CLSM: confocal laser scanning microscopy, FISH: fluorescent *in situ* hybridization, P: positive, N: negative, Kn: *Klebsiella pneumoniae*, Hi: *Haemophilus influenzae*, Sa: *Staphylococcus aureus*, Sn: *Streptococcus pneumoniae*, Sp: Group A β -hemolytic streptococcus (*S. pyogenes*)

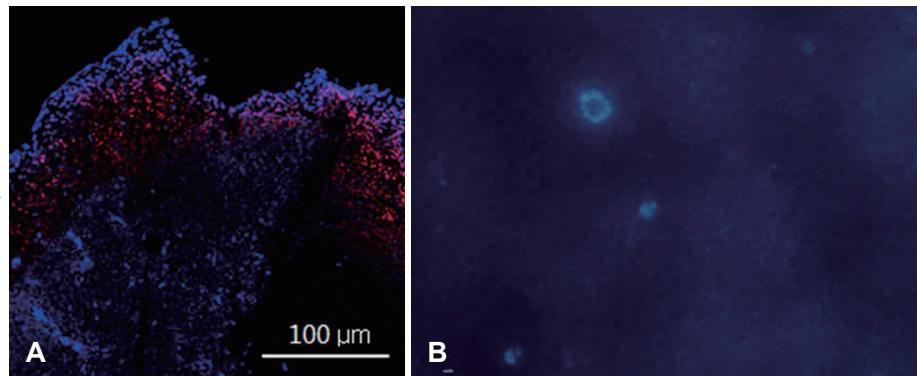


Fig. 2. Case No. 17 shows both positive findings both on confocal laser scanning micrograph (CLSM) and fluorescent *in situ* hybridization (FISH). CLSM shows red and blue color which represents bacterial colony and epithelium, respectively (A). FISH shows bacteria labeled to the probe of *H. influenzae* (B).

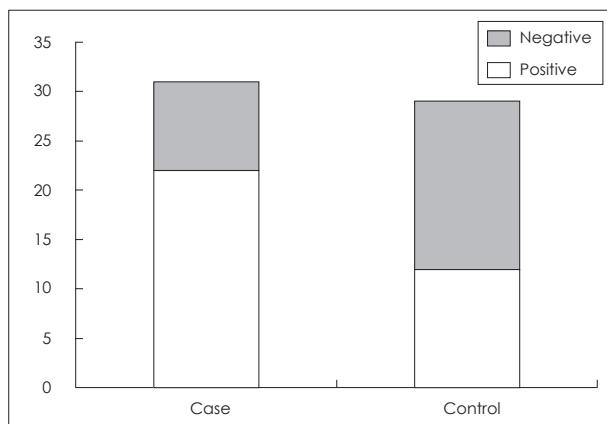


Fig. 3. The prevalence rates of biofilm. The case group shows higher prevalence rates of biofilms than control group in confocal laser scanning microscopy ($p=0.032$, χ^2 -test).

서 8회의 감염이 확인되었다. FISH에서 균이 확인된 6예 모두 CLSM 양성이었다. 대조군 6예 중 4예는 CLSM 양성이었지만 *S. pyogenes*가 나타났던 2예는 CLSM에서 균막이 확인되지 않았다. 균주 중에는 *S. aureus*가 5예에서 확인되어 가장 빈도가 높았으며, *S. pyogenes*와 *S. pneumoniae*가 각각 3예에서 발견되었고, *K. pneumoniae*가 2예, *H. influenzae*가 1예에서 확인되었다.

고 찰

여러 연구를 통해 만성 재발성 편도염 환자에서 균막의 존재가 밝혀졌다. Chole 등¹⁰⁾은 투과전자현미경을 이용하여 재발성 편도염 환자 15예 중 11예(73.3%)에서 균막을 확인하였다. Kania 등¹¹⁾은 레이저초점 주사현미경 및 주사전자현미경을 이용하여 재발성 편도염 24예를 조사하였으며 그 중 17예(70.8%)의 편도에서 균막을 확인하였다. Al-Marzrou와 Al-Khattaf¹²⁾는 감염 또는 폐쇄 증상으로 아데노이드-편도 절제술을 시행한 소아환자들에서 균막을 조사하였다. 이들 중 편도염의 병력이 있었던 환아들에서는 26명 중 22명(85%)에서 편도와 아데노이드 조직에서 균막이 확인되었으며, 감염 증상 없이 폐쇄증

으로 수술을 받은 환아들에서는 44명 중 18(41%)에서 균막이 확인되어 만성 감염 증상을 보이는 편도-아데노이드에서 유의하게 균막이 높게 발견된다고 보고하였다. 그러나 이런 연구들은 대조군과의 비교 연구가 아니기 때문에 균막이 재발성 편도염의 병인으로 작용하는지에 대해서 결론을 내리는 데 한계가 있었다. 저자들은 비교-대조군 연구를 통해 균막과 재발성 편도염의 병인적 관계를 규명하고자 하였다. 균막의 평가에는 투과전자현미경, 주사전자현미경, 레이저초점 주사현미경 등 여러 진보된 진단기법이 사용된다. 투과전자현미경이나 주사전자현미경은 검체의 고정과 탈수 과정에서 균막의 구조가 왜곡되므로 균막의 평가에 어느 정도 한계가 있을 수 밖에 없다.¹³⁾ 특히 주사전자현미경은 점막표면의 형태학적 분석만을 통해 균막을 확인해야 하는데 아직 균막의 특징적인 형태에 대한 특별한 합의가 이루어져 있는 것이 아니다.¹⁴⁾ 이들에 비해 레이저초점 주사현미경은 비침습적이고 균막 구조의 변형이 덜 하며 균막의 존재를 규명하는 데 좀 더 정확할 수 있다.¹⁵⁾ 저자들은 레이저초점 주사현미경을 이용하여 균막을 분석하였으며 연구결과 재발성 편도염 환자군에서 대조군에 비해 유의하게 높은 균막 발현율을 나타냈다. 이는 균막이 재발성 편도염의 중요한 병인적 요인이 될 수 있음을 나타낸다. 그러나 대조군의 41.4%(12/29)에서 균막이 발견되었으며 이들은 감염 증상을 일으키지 않았다. 이는 편도선염의 재발에 균막의 존재 이외의 다른 원인도 있다는 증거가 된다. 균막은 한 곳 또는 이상의 부분에서 천천히 성장하며 서서히 증상을 일으킨다.¹⁶⁾ 균막 형성에는 “quorum sensing”이라는 세포 간의 화학적 신호전달이 필요하며 적합한 수의 이웃세포가 존재하지 않는다면 개개의 균들은 균막 형성에 의한 잇점들을 얻을 수 없다.^{17,18)} 그러나 현재까지 감염 병소에서의 균막과 감염증을 일으키지 않은 균막의 차이를 밝히기 위한 연구는 없었다. 또한 어느 정도의 균막이 형성되어야 감염 병소로 작용할 수 있는가에 대해 밝혀진 바도 없다. 이러한 균막간의 차이를 분석하기 위해 추후 실험군과 대조군의 균막에 대한 추가적인 연구가 필요할 것이다.

균막은 운동성이 없는 표면에서 잘 발생한다.¹⁹⁾ 그러나 편도가 존재하는 구인두는 연하작용에 의해 활발한 운동이 일어나는 부분이다. 그러므로 편도의 구인두 내강 점막에서 균막이 형성되기는 어렵다. 그러나 편도움은 점막표면에서 힘몰된 부분으로 구인두의 연하운동에도 불구하고 세균이 안정적으로 부착되기 쉬운 부분이므로 균막이 형성되기에 용이하다.²⁰⁾ 편도는 점막연관림프조직(mucosa-associated lymphoid tissue)으로서 위장관계의 일차적인 면역체계를 담당한다. 편도움 주위의 고유층은 많은 수의 림프결절을 가지고 있으며 림프결절의 배중심(germinal center)에는 활발히 증식된 B-세포와 대식세포가 존재한다.²¹⁾ 편도움의 균막은 림프결절의 면역기능을 자극하여 항체 생성을 촉진시킨다. 그러나 균막 내 세균의 표현형 변화로 인해 항체는 세균을 죽이지 못하며 오히려 주위 조직을 손상시킬 수 있다.²²⁾ 또한 대식세포가 활성화되더라도 균막의 크기가 너무 커 대식작용이 불가능하며 오히려 유출된 대식 효소들에 의해 주위 조직이 손상된다.¹⁾ 이로 인해 지속적인 염증 반응과 손상된 조직들의 치유과정으로 편도실질의 과형성, 조직의 섬유화가 발생하고 결과적으로 편도비대가 발생할 수 있을 것으로 유추할 수 있다. 편도 비대는 육안으로 확인될 정도로 편도움을 더욱 깊게 만들며, 깊어진 편도움은 균막의 발달에 더욱 좋은 환경을 제공할 수 있을 것으로 생각된다.

저자들은 균막과 관련된 균을 확인하기 위해 FISH를 시행하였다. 한 연구에서 재발성 편도염의 편도 중심부 균을 확인한 결과 *S. aureus*, *S. pyogenes*, *H. influenza*, *S. pneumoniae*, *K. pneumoniae*의 순서로 균이 검출되었다.²³⁾ 저자들도 동일한 균주의 표지자를 사용하였으며 *S. aureus*가 가장 흔하게 확인되었다. FISH는 특정 세균의 DNA 표지자를 사용함으로써 세균의 균주를 확인할 수 있다. 또한 세균 스스로에 의해 형성된 균막 기질은 세균의 DNA를 포함하고 있기 때문에 FISH만으로 특정세균 뿐만 아니라 균막의 존재도 확인할 수 있다.²⁴⁾ 그러나 시행된 검사수가 작아 실험군과 대조군에서 의미 있는 차이를 발견할 수는 없었다.

지금까지 여러 연구에서 재발성 편도염 환자의 균막의 존재를 확인하였지만 대조군과의 비교 연구는 없었다. 본 실험은 편도에서의 균막이 재발성 감염의 원인으로 작용하는지를 알아보기 위한 비교-대조군 연구이다. 연구결과, 실험군에서 균막이 관찰되지 않은 경우가 있으며, 반대로 대조군에서 균막이 존재하는 경우도 있었다. 또한 대조군의 FISH 검사에서 감염의 원인이 되는 균주들이 검출되었으므로 균막의 발생률만으로 균막이 재발성 편도염의 원인임을 단정지울 수는 없다. 하지만 이번 연구결과로 실험군에서 대조군에 비해 높은 균막 발생률을 보였으므로 균막의 존재가 재발성 편도염의 한

원인으로 추정할 수 있다. 이러한 결과는 추후 균막의 치료를 위한 임상연구에서 기초자료로 쓰일 수 있을 것으로 기대되며 균막과 재발성 편도염의 병인적 관계를 확립하기 위해서는 추후 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Acknowledgments

This work was supported by BumSuk Academic Research Fund of 2009.

REFERENCES

- 1) Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;284(5418):1318-22.
- 2) Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2004;2(2):95-108.
- 3) Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995;49:711-45.
- 4) Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol* 2005;13(1):34-40.
- 5) Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 1998; 339(8):520-32.
- 6) Marrie TJ, Nelligan J, Costerton JW. A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead. *Circulation* 1982;66(6):1339-41.
- 7) Marsh PD. Plaque as a biofilm: pharmacological principles of drug delivery and action in the sub-and supragingival environment. *Oral Dis* 2003;9 Suppl 1:16-22.
- 8) Park YH, Kim EH, Seo ST, Lee SH, Kim JM, Koo BS, et al. Formation of biofilm in patients with chronic otitis media and cholesteatoma. *Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg* 2009;52(2):124-8.
- 9) Choi JW, Seo ST, Kim SG, Kim YM, Rha KS. The demonstration of bacterial biofilm and its impact on postoperative course in patients with chronic rhinosinusitis. *Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg* 2010;53(6):349-53.
- 10) Chole RA, Faddis BT. Anatomical evidence of microbial biofilms in tonsillar tissues: a possible mechanism to explain chronicity. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;129(6):634-6.
- 11) Kania RE, Lamers GE, Vonk MJ, Huy PT, Hiemstra PS, Bloemberg GV, et al. Demonstration of bacterial cells and glycocalyx in biofilms on human tonsils. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2007;133(2): 115-21.
- 12) Al-Marzrou KA, Al-Khattaf AS. Adherent biofilms in adenotonsillar diseases in children. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2008;134 (1):20-23.
- 13) Post JC, Hiller NL, Nistico L, Stoodley P, Ehrlich GD. The role of biofilms in otolaryngologic infections: update 2007. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2007;15(5):347-51.
- 14) Sanclement JA, Webster P, Thomas J, Ramadan HH. Bacterial biofilms in surgical specimens of patients with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* 2005;115(4):578-82.
- 15) 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.
- 16) Ward KH, Olson ME, Lam K, Costerton JW. Mechanism of persistent infection associated with peritoneal implants. *J Med Microbiol* 1992;36(6):406-13.
- 17) Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglesias BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 1998;280(5361):295-8.
- 18) Singh PK, Schaefer AL, Parsek MR, Moninger TO, Welsh MJ, Greenberg EP. Quorum sensing signals indicate that cystic fibrosis

- lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* 2000;407(6805):762-4.
- 19) Lambe DW Jr, Ferguson KP, Mayberry-Carson KJ, Tober-Meyer B, Costerton JW. Foreign-body-associated experimental osteomyelitis induced with *Bacteroides fragilis* and *Staphylococcus epidermidis* in rabbits. *Clin Orthop Relat Res* 1991;(266):285-94.
- 20) Balogh K, Pantanowitz L. Mouth, nose, and paranasal sinuses. In: Mills SE, editor. *Histology for pathologists*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins;2007, p.403-30.
- 21) Ovalle WK, Nahirney PC. *Netter's essential histology*. 1st ed. Philadelphia, USA: Saunders Elsevier;2008, p.195-212.
- 22) Cochrane DM, Brown MR, Anwar H, Weller PH, Lam K, Costerton JW. Antibody response to *Pseudomonas aeruginosa* surface protein antigens in a rat model of chronic lung infection. *J Med Microbiol* 1988;27(4):255-61.
- 23) Jeong JH, Lee DW, Rhy RA, Lee YS, Lee SH, Kang JO, et al. Bacteriologic comparison of tonsil core in recurrent tonsillitis and tonsillar hypertrophy. *Laryngoscope* 2007;117(12):2146-51.
- 24) Sanderson AR, Leid JG, Hunsaker D. Bacterial biofilms on the sinus mucosa of human subjects with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* 2006;116(6):1121-6.