

# RELAȚIA DINTRE BIOFILMELE BACTERIENE ȘI MODIFICĂRILE INFLAMATORII TISULARE LA PACIENȚII CU RINOSINUZITĂ CRONICĂ

*The relationship between bacterial biofilms and inflammatory tissue changes in patients with chronic rhinosinusitis*

Asist. Univ. Dr. Alina Gabriela Duțu<sup>1</sup>, Prof. Dr. Cristina Drugan<sup>1</sup>, Prof. Dr. Tudor C. Drugan<sup>3</sup>,  
Prof. Dr. Silviu Albu<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Disciplina Biochimie Medicală, Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu“, Cluj-Napoca, România

<sup>2</sup> Disciplina Chirurgie Cervico-Facială și ORL, Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu“, Cluj-Napoca, România

<sup>3</sup> Disciplina Informatică Medicală și Biostatistică, Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu“, Cluj-Napoca, România

## REZUMAT

**Obiective.** În fiziopatologia rinosinuzitei cronice (RSC), rolul biofilmelor microbiene este intens dezbătut, acestea reprezentând un potențial factor de prognostic defavorabil în evoluția postoperatorie a RSC. În acest studiu, ne-am propus să analizăm relația dintre prezența biofilmelor și infiltratul inflamator al mucoasei rinosinusale, precum și impactul comorbidităților asupra dezvoltării biofilmelor la pacienții cu RSC.

**Material și metode.** Studiul a inclus un total de 50 de pacienți cu RSC, tratați chirurgical prin intervenție endoscopică. Probele de mucoasă sinusală prelevate în timpul operației au fost studiate prin colorație cu hematoxilină-eozină și albastru de toluidină pentru identificarea biofilmelor și evaluarea infiltratului inflamator.

**Rezultate.** Biofilmele au fost prezente la 34 dintre cei 50 de pacienți (68%). Analiza inflamației tisulare a arătat că 22 de pacienți dintre cei 34 cu biofilme bacteriene au prezentat un infiltrat inflamator abundent la nivelul mucoasei sinusale, această asocieră fiind semnificativă din punct de vedere statistic ( $p < 0,001$ ). Prezența biofilmelor a fost, de asemenea, semnificativ asociată cu următoarele comorbidități: astmul bronșic ( $p = 0,006$ ) și terenul alergic ( $p < 0,001$ ).

**Concluzii.** Prezența biofilmelor s-a corelat semnificativ cu un infiltrat inflamator abundent, demonstrând amplificarea răspunsului inflamator local. Dintre comorbiditățile asociate frecvent cu RSC, astmul bronșic și terenul alergic au arătat o creștere semnificativă a șanselor de apariție a biofilmelor.

**Cuvinte cheie:** rinosinuzită cronică, biofilm bacterian, infiltrat inflamator, astm bronșic, teren alergic

## ABSTRACT

**Objectives.** The involvement of bacterial biofilms in the pathophysiology of chronic rhinosinusitis (CRS) is intensively debated, despite the acknowledgement of their negative impact on postoperative evolution of the disease. This study aimed to evaluate the relationship between bacterial biofilms and inflammatory infiltrate of sinus mucosa, and the influence of comorbidities on biofilm development.

**Materials and methods.** The study comprised 50 CRS patients, treated by endoscopic surgery. For biofilm identification and inflammatory infiltrate evaluation, sinus mucosa samples were taken during surgical intervention and studied by haematoxylin-eosin and toluidine blue staining.

**Results.** Biofilms were present in 34 patients (68%). Among them, 22 patients displayed an abundant inflammatory infiltrate of the sinus mucosa, this association being statistically significant ( $p < 0.001$ ). Biofilm development was also significantly associated with the following comorbidities: bronchial asthma ( $p = 0.006$ ) and atopic background ( $p < 0.001$ ).

**Conclusions.** Bacterial biofilms were significantly associated with an abundant inflammatory infiltrate of the sinus mucosa, demonstrating an intensive local inflammatory response. Among the comorbidities frequently associated with CRS, bronchial asthma and atopic background proved a significant increase in the odds of biofilm development.

**Keywords:** chronic rhinosinusitis, bacterial biofilms, inflammatory infiltrate, bronchial asthma, atopic background

Autor de corespondență:

Asist. Univ. Dr. Alina Gabriela Duțu

E-mail: alinagabriela.dutu@yahoo.com

## INTRODUCERE

Rinosinuzita cronică (RSC) este o afecțiune complexă, definită ca un proces inflamator al mucoasei rinosinusale cu o durată mai mare de 12 săptămâni, asociat cu cel puțin două dintre simptomele următoare: congestie nazală, rinoree, senzație de presiune la nivelul sinusurilor, durere și hipoosmie. Această patologie afectează un procent cuprins între 5 și 15% din populația generală, atât în Europa, cât și în SUA (1)

Pacienții cu RSC resimt o diminuare semnificativă a calității vieții, comparabilă cu cea asociată cu insuficiența cardiacă, angina pectorală, bronhopneumopatia cronică obstructivă sau durerea dorso-lombară cronică (2). Primul studiu epidemiologic referitor la calitatea somnului în RSC, GA2LEN, a constatat că majoritatea pacienților cu RSC dezvoltă cu timpul probleme de somn, care se accentuează odată cu severitatea bolii, având drept consecință instalarea oboselii cronice și a somnolenței diurne (3). Astfel, pentru acești pacienți, la costurile îngrijirilor medicale se adaugă și reducerea randamentului în muncă.

În fiziopatologia bolii, inflamația mucoasei rinosinusale reprezintă elementul principal, la care se adaugă factorii de patogenitate bacterieni (cum ar fi superantigenele și biofilmele) sau infecțiile fungice, care accentuează răspunsul inflamator (4,5). În RSC, mucoasa nazală este infiltrată în grade variabile cu diferite tipuri de celule inflamatorii. Datele din literatură arată că un infiltrat inflamator abundent reprezintă un factor predictiv negativ pentru evoluția bolii (6).

Biofilmul bacterian este o structură tridimensională care aderă atât la suprafețele vii, cât și la cele inerte, fiind alcătuită din agregate de celule bacteriene încorporate într-o matrice exopolizaharidică autosecretată (7). Bacteriile din biofilme au o rată metabolică mult diminuată, iar matricea exopolizaharidică le protejează față de acțiunea fagocitară a macrofagelor și le conferă o rezistență sporită la antibiotice (8,9). Cele mai frecvente specii bacteriene întâlnite în biofilme sunt *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* și *Haemophilus influenzae*.

O serie de cercetări au arătat că biofilmele bacteriene sunt implicate în patogeniza și evoluția RSC, cu precădere în formele refractare la tratament (1,7). Astfel, prezența biofilmelor poate reprezenta un element de prognostic defavorabil în evoluția postoperatorie a RSC. Într-o evaluare a diferitelor ipoteze etiopatogenetice pentru RSC, Lam și colab.

concluzionează că prezența biofilmelor are consecințe similare cu cele ale superantigenelor, exotoxinele de tip superantigen amplificând răspunsul local eozinofilic (4). Cu toate acestea, relația causală dintre biofilmele bacteriene și inflamația mucoasei rinosinusale este incomplet elucidată, nefiind stabilit cu certitudine dacă biofilmele amplifică inflamația locală sau, dimpotrivă, inflamația mucoasei favorizează dezvoltarea biofilmelor, prin amplificarea aderenței microorganismelor la suprafața acestora.

RSC a fost împărțită în două mari subtipuri, în funcție de prezența polipilor nazali: forma cu polipi nazali (CRSwNP) și cea fără polipi nazali (CRSsNP), cele două subtipuri fiind diferențiate prin tipul de inflamație și de remodelare tisulară. Forma CRSsNP este caracterizată printr-un infiltrat inflamator predominant neutrofilic și un profil inflamator asociat cu limfocitele Th1. Pentru forma CRSwNP e specific infiltratul eozinofilic, remodelarea tisulară cu proliferare fibroblastică și un profil inflamator mixt Th1/Th2, cu predominanța celulelor Th2 (10,11).

Acest studiu și-a propus evaluarea relației dintre prezența biofilmelor și infiltratul inflamator la pacienții cu RSC, precum și analiza impactului comorbidităților asupra prezenței eventuale a biofilmelor, ambele elemente reprezentând factori de prognostic nefavorabil.

## MATERIAL ȘI METODE

Acest studiu a fost aprobat de către Comisia de etică a UMF „Iuliu Hațieganu” din Cluj-Napoca (273/16.06.2016). Studiul a inclus 50 de pacienți cu RSC și rezultate nesatisfăcătoare la tratamentele anterioare, investigați în Spitalul Clinic CFR, diagnosticați conform criteriilor EPOS 2012 (European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps) (1), care și-au exprimat consimțământul informat privind participarea la acest studiu. Criteriile de includere au fost următoarele: diagnosticul pozitiv de RSC pe baza istoricului bolii, a evaluării imagistice prin tomografie computerizată craniană și/sau endoscopie nazală, absența altor boli inflamatorii cunoscute, ineficiența terapiei medicamentoase administrate optimal. Au fost excluși pacienții cu vârsta sub 18 ani, cei imunocompromiși sau tratați cu antibiotice și/sau corticosteroizi până cu cel puțin 3 săptămâni înainte de intervenția chirurgicală.

Sub control endoscopic, de la fiecare pacient s-au recoltat fragmente de mucoasă sinusală, afec-

tată inflamator, de la nivelul meatului mijlociu și sinusului etmoidal. Pentru evidențierea colonizării bacteriene au fost utilizate colorațiile Gram și hematoxilină-eozină (HE). Biofilmele au fost confirmate prin identificarea stratului polizaharidic bacterian, caracteristic coloniilor Gram pozitive sau negative, pe baza colorației cu albastru de toluidină. Prezența celulelor inflamatorii (limfocite, neutrofile, eozinofile) a fost evidențiată prin colorație cu HE.

Infiltratul inflamator a fost considerat abundent dacă numărul celulelor inflamatorii a depășit 10 celule/câmp HPF (high power field) 40x, moderat la un număr mai mic de 10 celule/câmp sau redus pentru un număr mai mic de 5 celule/câmp microscopic.

Prezența polipilor a fost confirmată prin endoscopie nazală, iar informațiile despre tratamentele anterioare, inclusiv alte intervenții chirurgicale, și despre comorbiditățile eventual prezente (alergii, astm bronșic) au fost obținute din fișele medicale ale pacienților.

Analiza statistică a fost realizată cu ajutorul programului IBM SPSS 25.0 (IBM, SUA).

## REZULTATE

Dintre cei 50 de pacienți cu RSC, având vârsta cuprinsă între 18 și 80 de ani, 32 au provenit din mediul urban și 18 din mediul rural.

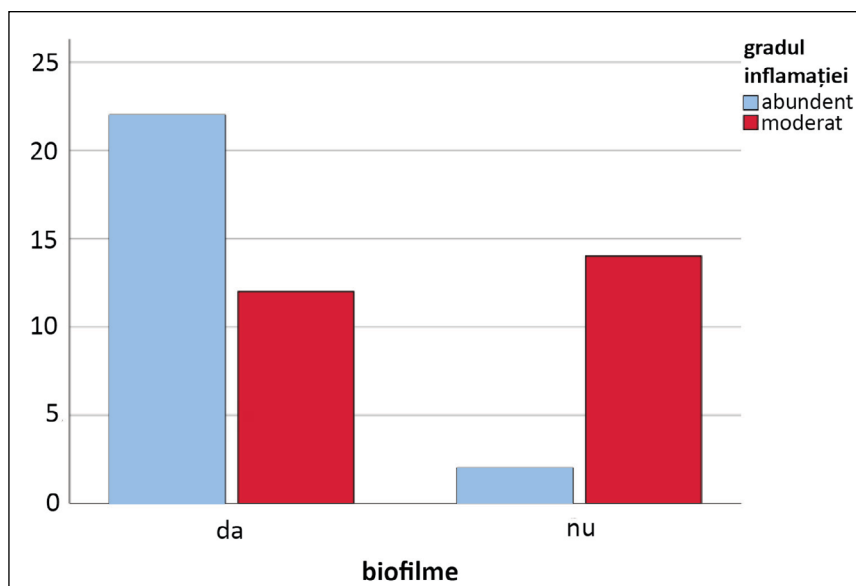
În urma evaluării histopatologice, biofilmele bacteriene au fost identificate prin colorație cu HE și albastru de toluidină la un număr de 34 de pacienți (68%). Infiltratul inflamator a fost considerat abundent la 24 de pacienți, iar moderat și redus la 26 de pacienți.

Dintre cei 34 de pacienți cu biofilme, 22 au prezentat un infiltrat inflamator abundent, iar dintre cei 16 pacienți la care nu s-a observat prezența biofilmelor, doar 2 au prezentat un infiltrat abundent, ceilalți având o infiltrație inflamatorie moderată sau redusă. Aceste rezultate au permis evidențierea unei șanse crescute de dezvoltare a inflamației abundente la pacienții cu biofilme (raportul șanselor = 12,833 [2,489-66,163], statistic semnificativ, testul Chi pătrat a avut  $p = 0,001$ ). Aceste rezultate sunt prezentate în figura 1.

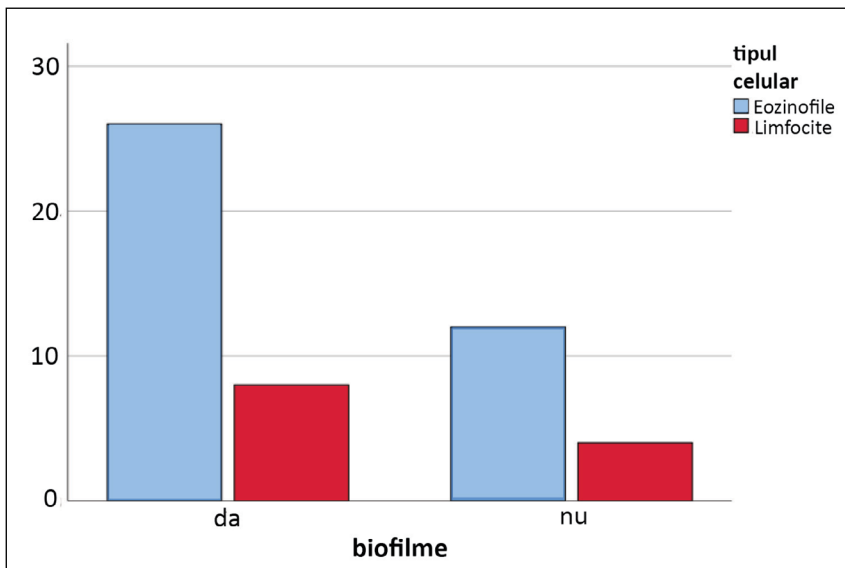
În ceea ce privește tipul celular al infiltratului, eozinofilic sau limfocitar/neutrofilic, nu s-a constatat o corelație statistic semnificativă între prezența biofilmelor și un anumit tip celular preponderent. Raportul șanselor a fost de 1,083 [0,272-4,312], iar testul exact al lui Fischer a avut  $p = 0,586$  (figura 2).

Polipii nazali au fost identificați la 40 de pacienți, reprezentând 80% din totalul celor investigați. Dintre cei 40 de pacienți cu polipi nazali, 30 (75%) au prezentat biofilme, în timp ce prezența biofilmelor a fost confirmată la doar 4 pacienți dintre cei 10 fără polipi nazali (40%). La subgrupul de pacienți cu polipi nazali, s-a constatat o șansă crescută de apariție a biofilmelor (raportul șanselor = 4,500 [1,052-19,252]), testul exact al lui Fischer fiind semnificativ din punct de vedere statistic ( $p = 0,044$ ). Aceste rezultate sunt prezentate în figura 3.

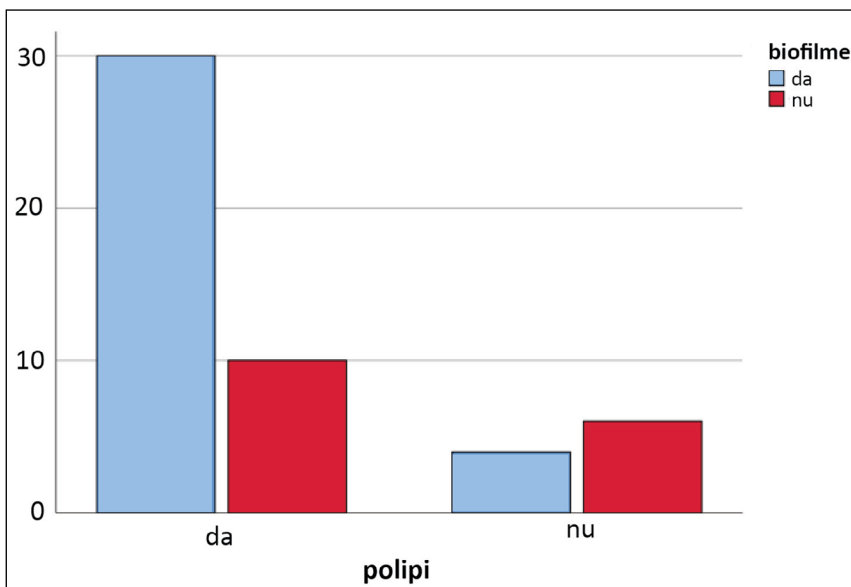
Dintre comorbiditățile asociate RSC, astmul bronșic a fost prezent la 20 de pacienți (dintre care 18 cu biofilme), iar alergiile la polen, praf sau medicamente antiinflamatoare au fost menționate de 18 pacienți. Toți acești 18 pacienți cu teren alergic au prezentat biofilme bacteriene, dar numai 16 din-



**FIGURA 1.** Repartiția pacienților în funcție de prezența biofilmelor bacteriene și de asocierea acestora cu intensitatea inflamației tisulare



**FIGURA 2.** Repartiția pacienților în funcție de tipul celular al infiltratului inflamator și de asocierea acestuia cu biofilmele bacteriene



**FIGURA 3.** Repartiția pacienților în funcție de prezența polipilor nazali și de asocierea acestora cu biofilmele bacteriene

tre cei 32 de pacienți fără alergii au fost identificați cu biofilme.

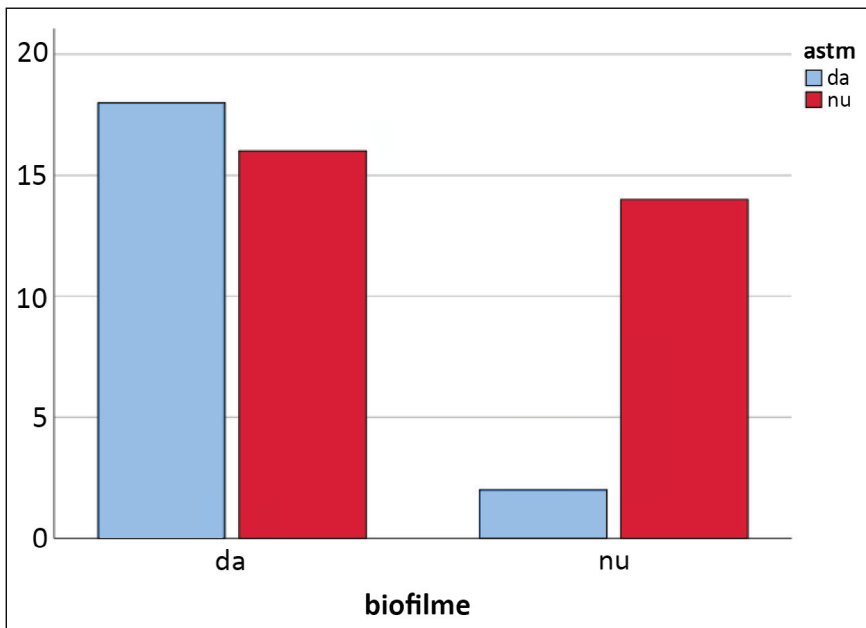
Asocierea dintre prezența biofilmelor și următoarele comorbidități a fost semnificativă din punct de vedere statistic: astmul bronșic (raportul șanselor = 7,875 [1,547-40,091], testul Chi pătrat a avut  $p = 0,006$ , figura 4) și terenul alergic (riscul relativ = 2,000 [1,361-2,000], testul Chi pătrat a avut  $p < 0,001$ , figura 5). Prin urmare, pacienții cu astm bronșic sau alergii asociate au o șansă semnificativ mai mare de a prezenta biofilme, comparativ cu pacienții fără aceste comorbidități.

Referitor la mediul de proveniență al pacienților, am constatat că cei proveniți din mediul rural au prezentat o șansă semnificativ mai mare de a dezvolta biofilme, în comparație cu pacienții din mediul urban (raportul șanselor = 6,222 [1,222-31,677], testul Chi pătrat a avut  $p=0,018$ , figura 6).

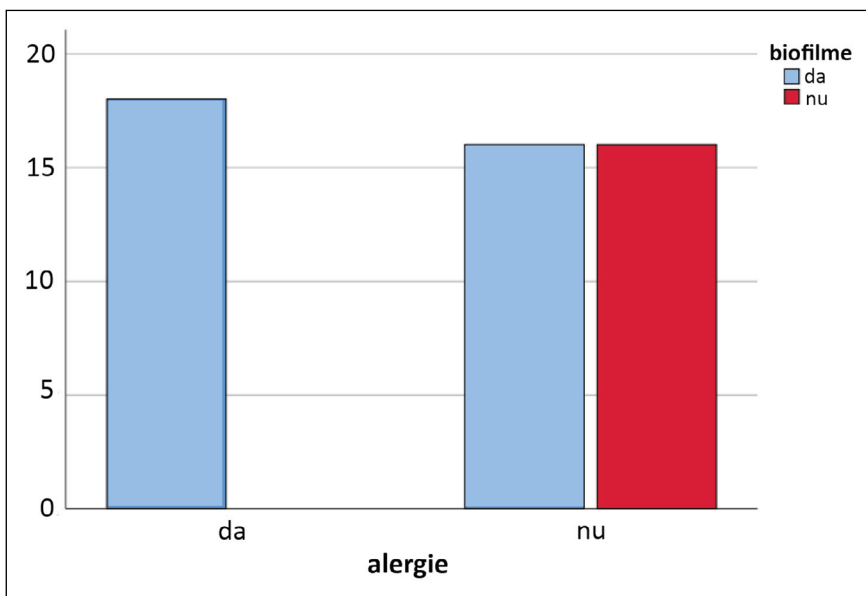
## DISCUȚII

RSC are o patogeneză multifactorială, în care intervin atât factori de mediu (alergeni, poluanți, agenți microbieni), cât și factori individuali, diferiți de la un pacient la altul (modificări anatomice, factori medicamentoși sau anumite comorbidități, cum ar fi imunodeficiențele sau fibroza chistică).

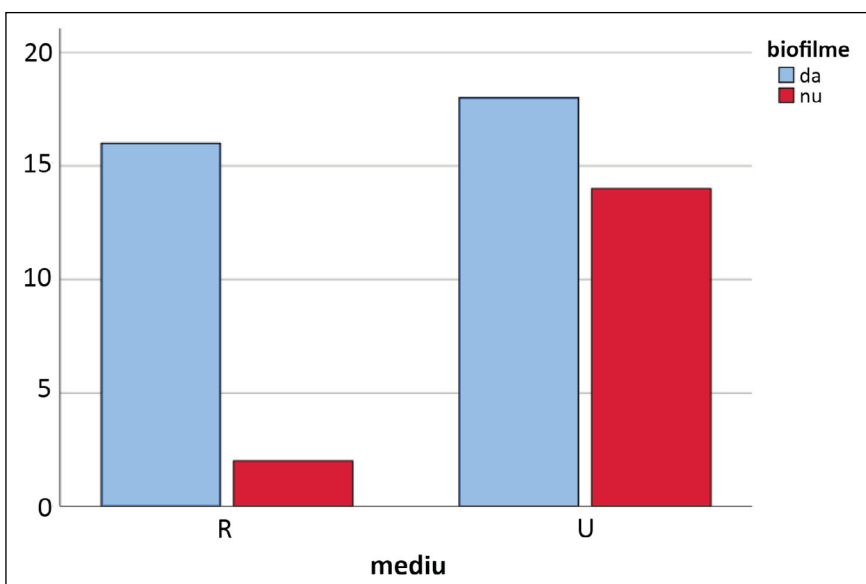
Din punct de vedere fiziopatologic, RSC se produce prin obstrucția complexului ostiomeatal, staza mucusului și diminuarea activității sistemului ciliar, urmate de proliferarea bacteriilor colonizatoare. Astfel, în urma unor proliferații bacteriene recurente, se poate produce o hiperplazie epitelială cu proliferarea țesutului conjunctiv subepitelial, formarea unor polipi și acumularea de celule inflamatorii, îndeosebi eozinofile, neutrofile, limfocite și plasmocite. În consecință, una dintre cele mai impor-



**FIGURA 4.** Repartiția pacienților în funcție de prezența astmului bronșic și de asocierea acestuia cu biofilmele bacteriene



**FIGURA 5.** Repartiția pacienților în funcție de prezența terenului alergic și de asocierea acestuia cu biofilmele bacteriene



**FIGURA 6.** Repartiția pacienților în funcție de mediul de proveniență și de asocierea acestuia cu biofilmele bacteriene

tante caracteristici ale RSC este prezența unei reacții inflamatorii exagerate și persistente la nivelul mucoasei sinonazale (12).

În urma acestor modificări, se accentuează și mai mult obstrucția ostiomeatală, cu reducerea drenajului și a ventilației sinusale, creându-se astfel un cerc vicios, care favorizează staza mucoasă cronică, propice proliferării bacteriene și dezvoltării biofilmelor.

Deși diagnosticul de RSC se bazează pe elemente clinice, confirmarea se face prin endoscopie nazală și/sau tomografie computerizată. Piese prelevate în timpul intervenției chirurgicale sunt supuse examenului histopatologic pentru a exclude alte patologii cu simptomatologie asemănătoare (13).

Prezența biofilmelor bacteriene la nivelul mucoasei rinosinusale a pacienților cu RSC a fost demonstrată prin multiple studii, Lam și colaboratorii considerând biofilmele un posibil factor etiologic în dezvoltarea RSC (4), strâns legat de ipoteza superantigenelor, potrivit căreia exotoxinele de tip superantigen, produse de unele bacterii cum ar fi *S. aureus*, prezent adeseori în biofilme, ar amplifica răspunsul local eozinofilic.

Chiar dacă multă vreme s-a considerat că RSC este o boală dominată preponderent de eozinofilie, numeroase dovezi indică existența mai multor fenotipuri inflamatorii. Pacienții caucazieni cu RSC și polipi nazali au ca trăsătură specifică inflamația cu eozinofile, demonstrată prin existența unui infiltrat abundent cu eozinofile EG2-pozitive, secretoare de ECP (proteina cationică a eozinofilelor) și concentrații serice crescute de citokine reglatoare ale eozinofilelor, cum ar fi IL-5, RANTES sau eotaxina (14). Pe de altă parte, s-a constatat că pacienții asiatici cu RSC și polipi nazali prezintă un alt model inflamator la nivelul polipilor, descris prin infiltrat neutrofilic, fără creșteri de IL-5, ECP sau eotaxina (14). Biofilmele bacteriene au fost detectate atât în formele cu polipi nazali, cât și în cele fără polipi, cu o plajă de identificare de 40-75% (4).

Rezultatele noastre sunt în concordanță cu datele din literatură, indicând prezența biofilmelor la majoritatea pacienților evaluați: 68% din totalul pacienților incluși în acest studiu și 75% dintre cei cu RSC și polipi nazali. Mai mult, pacienții cu biofilme au prezentat un infiltrat inflamator abundent, această asociere fiind semnificativă din punct de vedere statistic (la 64,7% dintre pacienții cu biofilme s-a evidențiat un infiltrat inflamator abundent). Acest rezultat susține ideea implicării biofilmelor în evoluția RSC, deoarece accentuarea inflamației locale conduce la amplificarea obstrucției ostiomeatale și a stazei mucoase.

Referitor la tipul celular al infiltratului, nu am constatat diferențe semnificative între subgrupurile de pacienți cu infiltrat eozinofilic sau limfocitar / neutrofilic, în ceea ce privește asocierea acestora cu prezența biofilmelor. Acest rezultat este concordant cu datele din literatură, care corelează prezența biofilmelor atât cu infiltratul eozinofilic (8,15), cât și cu răspunsul inflamator de tip Th-1 care implică prezența neutrofilelor (16). Cercetările anterioare au arătat că prezența unui infiltrat inflamator eozinofilic la nivelul mucoasei sinusale este un factor de prognostic negativ în evoluția bolii, pacienții având o slabă îmbunătățire a calității vieții și o frecvență ridicată a acutizărilor recurente (6,17).

Hochstim și colab. au observat că biofilmele bacteriene sunt asociate semnificativ cu o inflamație locală persistentă pentru o lungă perioadă de timp. Acest studiu a constatat că prezența biofilmelor este un factor predictiv pentru inflamația persistentă a mucoasei rinosinusale, pacienții cu biofilme identificate pe piesele obținute în timpul intervenției endoscopice manifestând o inflamație persistentă într-un procent semnificativ mai mare decât cei fără biofilme și necesitând uneori o monitorizare postoperatorie de până la 30 de luni (18). Psaltis și colab. au arătat că, la evaluarea preoperatorie, pacienții cu biofilme au avut un scor radiologic mai slab, iar postoperator acești pacienți au avut rezultate mai puțin satisfăcătoare comparativ cu cei fără biofilme, cu simptome prezente după 8 luni de la intervenție și inflamație locală persistentă (19). Într-un studiu publicat de Jung și colab., s-a demonstrat că pacienții cu biofilme identificate intraoperator au necesitat un timp mai îndelungat până la vindecarea completă postoperatorie, comparativ cu pacienții fără biofilme (20).

Asocierea RSC cu alte comorbidități, precum astmul bronșic sau diversele alergii, a fost pusă în evidență în numeroase studii (21,22), considerându-se că, la pacienții cu astm bronșic, RSC este un factor de prognostic negativ în ceea ce privește calitatea vieții (23). În studiul nostru, dintre cei 20 de pacienți cu astm bronșic asociat RSC, 18 au prezentat biofilme bacteriene. Mai mult, am constatat că prezența biofilmelor se corelează semnificativ cu terenul alergic la pacienții evaluați în acest studiu ( $p < 0,001$ ). De asemenea, potrivit rezultatelor noastre, pacienții cu astm bronșic asociat RSC au o șansă semnificativ mai mare de a dezvolta biofilme, în comparație cu pacienții fără comorbidități ( $p = 0,006$ ). Această corelație semnificativă între prezența biofilmelor și astmul bronșic la pacienții luați în studiu poate atrage atenția asupra necesității identificării precoce a biofilmelor, mai ales la pacienții cu comorbidități.

## CONCLUZII

La pacienții cu biofilme s-a demonstrat o corelație semnificativă cu prezența unui infiltrat inflamator abundent, ceea ce ar putea agrava evoluția bolii prin amplificarea modificărilor fiziopatologice asociate RSC. Această concluzie ar putea veni în sprijinul clinicienilor, semnalând necesitatea unui examen complementar pentru identificarea biofil-

melor la toți pacienții cu infiltrat inflamator abundent, în vederea administrării unui tratament individualizat, care să vizeze îndepărtarea biofilmelor, și a supravegherii mai aprofundate a pacienților cu risc de recidivă. În plus, la pacienții cu comorbidități asociate, de tipul alergiilor sau al astmului bronșic, identificarea biofilmelor ar putea avea un rol important în terapia personalizată, cu scopul reducerii riscului de recurență.

## BIBLIOGRAFIE

- 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;23:1-298.
- Gliklich RE, Metson R. The impact of chronic sinusitis in patients seeking otolaryngologic care. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;113:104-109.
- Bengtsson C, Lindberg E, Jonsson L et al. Chronic Rhinosinusitis impairs sleep quality – results of the GA2LEN study. *Sleep*. 2017 January; 40(1).
- Lam K, Schleimer R, Kern RC. The Etiology and Pathogenesis of Chronic Rhinosinusitis: A Review of Current Hypotheses. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2015 July; 15(7):41.
- Bachert et al. ICON: chronic rhinosinusitis. *World Allergy Organization Journal*. 2014;7:25.
- Soler ZM, Sauer D, Maca J, Smith TL. Impact of mucosal eosinophilia and nasal polyposis on quality-of-life outcomes after sinus surgery. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2010;142:64-71.
- Harvey RJ, Lund VJ. Biofilms and chronic rhinosinusitis: systematic review of evidence, current concepts and directions for research. *Rhinology*. 2007; 45: 3-13.
- 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.
- Długaszczyńska J, Leszczyńska M, Lenkowski M, Tatarska A, Pastusiak T, Szyfter W. The pathophysiological role of bacterial biofilms in chronic sinusitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2016 Aug; 273(8):1989-94.
- 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 Nov; 61(11):1280-9.
- Van Crombruggen K, Zhang N, Gevaert P, Tomassen P, Bachert C. Pathogenesis of chronic rhinosinusitis: Inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2011. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Oct;128(4):728-32.
- Albu S. Rinosinuzitele. 2001 Ed. Național. București. ISBN 973-8194-73-3.
- Jiang N, Kern RC, Altman KW. Histopathological evaluation of chronic rhinosinusitis: A critical review. *Am J Rhinol Allergy*. 2013; 27:396-402.
- Tomassen P, Van Zele T, Zhang N, Perez-Novo C, Van Bruaene N, Gevaert P, Bachert C. Pathophysiology of chronic Rhinosinusitis. *Proc Am Thorac Soc*. 2011.8:115-120.
- Arjomandi H, Gilde J, Zhu S, Delaney S, Hochstim C, Mazhar K et al. Relationship of eosinophils and plasma cells to biofilm in chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol Allergy*. 2013.27:85-90.
- Hekiart AM, Kofonow JM, Doghramji L, Kennedy DW, Chiu AG, Cohen NA et al. Biofilms correlate with Th-1 inflammation in the sinonasal tissue of patients with chronic rhinosinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2009; 141(4):448-453.
- Duda R, Pătrașcu E, Beldiman M, Halanay AD. Predictive significance of histopathologic parameters in the outcome of chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *Therapeutics, Pharmacology and Clinical Toxicology*. 2016; 20 (2) :5-11.
- Hochstim CJ, Masood R, Rice DH. Biofilm and persistent inflammation in endoscopic sinus surgery. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2010; 143:697-698.
- Psaltis AJ, Weitzel EK, Ha KR, Wormald PJ. The effect of bacterial biofilms on post-sinus surgical outcomes. *Am J Rhinol*. 2008;22:1-6.
- Jung JH, Cha HE, Chang IG. Clinical characteristics of biofilms in patients with chronic rhinosinusitis. A prospective case-control study. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg* (Jan-Mar 2015) 67(1):1-6.
- Pearlman AN, Chandra RK, Chang D et al. Relationship between severity of chronic rhinosinusitis and nasal polyposis, asthma and atopy. *Am J Rhinol Allergy*. 2009; 23: 145-148.
- Jarvis D, Newson R, Lotvall J et al. Asthma in adults and its association with chronic rhinosinusitis: The GA2LEN survey in Europe. *Allergy*. 2012; 67:91-98.
- Ek A, Middelveel RJ, Bertilsson H et al. Chronic rhinosinusitis in asthma is a negative predictor of quality of life: Results from the Swedish GA2LEN survey. *Allergy*. 2013 ;68:1314-1321.