



## رابطه کشت بافتی آدنوئید با درجه بیوفیلم و تعداد عفونت‌های تنفسی فوقانی در کودکان مبتلا به انسداد راه هوایی فوقانی

**شیرین سیاح فر:** استادیار و فوق تخصص عفونی اطفال، بخش بیماری‌های عفونی اطفال، مرکز توسعه تحقیقات بالینی، بیمارستان فوق تخصصی کودکان حضرت علی اصغر (ع)، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران  
**غلامرضا بیاضیان:** استادیار و متخصص گوش و حلق و بینی، مرکز تحقیقات گوش، گلو، بینی و سروگردن، پژوهشکده سلامت حواس پنجگانه، بیمارستان فوق تخصصی کودکان حضرت علی اصغر (ع)، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران (\* نویسنده مسئول) [gr\\_bayazian@yahoo.com](mailto:gr_bayazian@yahoo.com)  
**احسان طورچی:** پزشک عمومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

### چکیده

#### کلیدواژه‌ها

بیوفیلم،  
آدنوئید،  
انسداد راه هوایی فوقانی،  
عفونت مجاری تنفسی فوقانی  
کودکان

**زمینه و هدف:** بیوفیلم، اجتماع سازمان یافته‌ای از باکتری‌ها درون یک ماتریکس خارج سلولی غنی از پلی ساکارید، اسید نوکلئیک و پروتئین است. در این مطالعه قصد داریم تا ارتباط کشت بافتی آدنوئید و میکروارگانیسم‌های موجود در آن را در کنار درجه بیوفیلم در کودکان مبتلا به انسداد راه هوایی فوقانی، بررسی کنیم.

**روش کار:** این مطالعه مقطعی در فاصله زمانی پاییز ۹۳ تا پاییز ۹۴، روی کودکان کاندیدای عمل جراحی آدنوئیدکتومی با علایم انسداد مجاری هوایی فوقانی انجام شد. اطلاعات دموگرافیک هر بیمار در پرسشنامه وارد شد. پس از آدنوئیدکتومی، نمونه آدنوئیدکتومی شده جهت انجام کشت و بررسی میکروسکوپ الکترونی ارسال گردید. بررسی‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام گرفت.

**یافته‌ها:** ۵۱ کودک با متوسط سنی ۷/۳۱ سال در این مطالعه وارد شدند. متوسط تعداد عفونت راه هوایی فوقانی در طول یکسال گذشته، ۹/۵۸ بار بود. ساختار بیوفیلم، خرخر شبانه و تنفس با دهان باز در ۱۰۰٪ افراد دیده شد. سائیز آدنوئید برای ۳۰ بیمار Grade IV، گزارش شد. ۲۶ مورد از کشت بافتی نمونه آدنوئید بیماران، آلفا همولیتیک استرپتوکوکوس ویریدانس، و ۱ مورد با کشت منفی بوده است. بین گرید آدنوئید و گروه‌های مختلف کشت، اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد ( $P=0/003$ ).

**نتیجه گیری:** در این مطالعه افزایش گرید سطح پوشیده شده از بیوفیلم آدنوئید، بطور معناداری با تعداد دفعات عفونت راه هوایی فوقانی مرتبط بود. بنابراین، حضور بیوفیلم در آدنوئید به عنوان یک مخزن عفونت، موجب ازمان التهاب بوده و می‌تواند توجیه‌کننده اثر بخشی آدنوئیدکتومی به عنوان یک راهکار درمانی شناخته شده در کودکان مبتلا به عفونت‌های مکرر راه هوایی فوقانی باشد.

**تعارض منافع:** گزارش نشده است.  
**منبع حمایت کننده:** حامی مالی نداشته است.

#### شیوه استناد به این مقاله:

Sayahfar Sh, Bayazian Gh, Toorchi E. Evaluation of adenoid tissue culture according to biofilm grade and annual rate of upper respiratory tract infection in children with upper airway obstruction. Razi J Med Sci. 2020;27(4):25-36.

\*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با 3.0 CC BY-NC-SA صورت گرفته است.

## Evaluation of adenoid tissue culture according to biofilm grade and annual rate of upper respiratory tract infection in children with upper airway obstruction

**Shirin Sayahfar**, Assistant Professor of Pediatric Infectious Diseases, Ali Asghar Clinical Research Development Center (AACRDC), Ali Asghar Children Hospital, Iran University of Medical Science, Tehran, Iran

**Gholamreza Bayazian**, Assistant Professor of Otolaryngology, ENT and Head and Neck Research Center and Department, The Five Senses Institute, Ali Asghar Children Hospital, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (\* Corresponding author) [gr\\_bayazian@yahoo.com](mailto:gr_bayazian@yahoo.com)

**Ehsan Toorchi**, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

### Abstract

**Background:** Biofilm, is an organized complex of bacteria that aggregates in an extracellular matrix enriched of polysacchrids, acid nucleic and proteins. Due to this evolved structure, the bacteria in the biofilm becomes highly resistant to the host's defense system and can adhere to the mucosal surface, leading to defects in the host's immune response. At first, bacteria with or without movement, reversibly adhere to the surfaces and then with the multiplication of glycocalyx by bacteria, this connection becomes irreversible. Biofilm growth progresses with the proliferation of baseless bacteria and gradually increases with the addition of other bacteria in the environment. These accumulations act as a chronic bacterial reservoir resistant to common antibiotics, and its debridement appears to justify the patient's clinical symptoms.

Biofilm formations have been observed and reported on the surface of adenoids and tonsils, especially in children with recurrent infections. The adenoid contains a large number of pathogenic bacteria and is more commonly known as a source of bacteria in children with rhinosinusitis than as a cause of mechanical obstruction. Studies have shown that culture of the sample prepared with swab and adenoidectomy is closely related with aerobic and anaerobic flora have been observed in both samples. Most aerobic strains were *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, and most anaerobes were *Staphylococcus aureus*, *Peptostreptococcus*, *Prevotella* and *Fusobacterium*.

Our study aims to evaluate the association between adenoid tissue cultures and microorganisms with biofilms grades in children with upper airway obstruction.

**Methods:** This cross-sectional study was conducted among the children referred to the ENT clinics of Ali Asghar Children hospital. We included patients with symptoms of nasal obstruction who were candidates for adenoidectomy. Indication of adenoidectomy in this study (inclusion criteria) was existence of confirmed adenoid hypertrophy on examination and lateral neck X-ray (Adenoid view) with symptoms of chronic upper airway obstruction including obstruction sleep apnea, snoring, open mouth breathing, adenoid face, speech disorders and restlessness during sleep (if accompanied by night snoring). Exclusion criteria also included cystic fibrosis, immunodeficiency, respiratory disorders including asthma, and the use of antibiotics during the two weeks prior to surgery. Demographic data of patients were gathered on questionnaire. At this stage, according to the patient history accuracy based on the number of upper airway infections in the past year, patients were divided into five groups less than 5 infections, between 5-8, between 8-12, between 12-15 infections and more than 15 infections per year. After removing the adenoid tissue of the patients by the ENT surgeon in the operating room, a sample was sent to laboratory for culture in normal saline solution and the rest of the sample was cut from several places with a knife after washing with normal saline solution and placed in 2.5% glutaraldehyde solution for fixation. Samples

### Keywords

Adenoid,  
Biofilms,  
Pediatric Upper Airway  
Infection,  
Upper Airway  
Obstruction

Received: 18/04/2020

Published: 27/06/2020

were dried in vacuo, then, after coating the surface of the samples with a layer of gold with a thickness of 30-50 nm (voltage 800v, 100 mA), the samples were classified according to the presence and size of biofilm using Philips XL30 Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM). Based on the degree of bacterial biofilm in the electron microscope samples, the amount less than 20% was named as Grade I, 20-40% as Grade II, 40-60% as Grade III, 60-80% as Grade IV and we considered more than 80% as Grade V. Statistical analysis was done by SPSS.

**Results:** Fifty-one children with a mean age of 7.31 years were enrolled in the study. The average rate of upper airway infection during last year was 9.58. In terms of accompanying symptoms, nocturnal snoring and open mouth breathing were seen in all cases. The mean duration of symptoms from onset was 2.5 years (ranging from 2 months to 7.5 years). 30 patients had Grade IV adenoid size in their graphy and noone were graded as grade 1. Biofilm structures in 100% of samples were observed.

According to the achieved data, the highest frequency of the organisms was in the biofilm with the grade of 60-80%. Also, biofilm grade above 60% had the highest number of positive cultures. Alpha hemolytic Streptococcus viridans was resulted for 26 samples of adenoid tissue culture and just one sample did not show any bacterial growth. The mean number of infections in different culture groups did not differ significantly ( $p=0.985$ , Kruskal Wallis). The mean duration of symptoms did not differ significantly in different culture groups ( $p=0.159$ , Kruskal Wallis). There was no statistically significant difference between the gender and different culture groups ( $p=0.701$ , Chi2). There was a statistically significant difference between adenoid grade and various groups of bacterial culture ( $p=0.003$ , Chi2), the larger the size of the adenoids, the more likely the culture to be positive. As other studies have only examined the most common microorganisms, this study is in fact the first study to evaluate both types of organisms and its comparison with the degree of biofilm. Streptococcus alpha is a hemolytic microorganism that oxidizes RBC hemoglobin to cause a green color in the culture medium. Streptococcus alpha hemolytic viridans is the oral type of this organism, which is a type of normal flora. Studies have shown that the same microorganism can cause pathogenicity.

Disagreement for surgery by parents of some patients was one of the our study limitations. Another limitation of our current study was the difficulty of accurate history of the number of upper airway infections in the past year due to the lack of a recorded medical registry system.

**Conclusion:** In this study, as presented before, there was a significant relationship between the increase in the surface grade of adenoid biofilm and the number of upper airway infections. Also, the highest frequency of the organisms was observed in biofilms with higher grades, and biofilms above 60% had the highest amount of positive culture. Therefore, this study also confirms that the presence of biofilm in the adenoid as a reservoir of infection causes inflammation and can justify the effectiveness of adenoidectomy as an acceptable therapeutic approach for children with recurrent upper airway infections.

**Conflicts of interest:** None

**Funding:** None

#### Cite this article as:

Sayahfar Sh, Bayazian Gh, Toorchi E. Evaluation of adenoid tissue culture according to biofilm grade and annual rate of upper respiratory tract infection in children with upper airway obstruction. Razi J Med Sci. 2020;27(4):25-36.

**\*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.**

## مقدمه

بیوفیلیم تجمع هتروژن و سازمان یافته‌ای از باکتری هاست که در یک ماتریکس پلیمریک خارج سلولی (عمدتاً غنی از پلی ساکارید، اسید نوکلئیک و پروتئین) شکل گرفته و به یک سطح زنده یا بی جان اتصال می‌یابد (۱، ۲). به دلیل این ساختار تکامل یافته، باکتری‌های درون بیوفیلیم نسبت به سیستم دفاعی میزبان شدیداً مقاوم گردیده و می‌توانند به سطح مخاطی چسبیده و منجر به نقص در پاسخ‌های ایمنی میزبان گردند. در ابتدا باکتری‌های با و یا بدون حرکت، به صورت برگشت پذیر به سطوح چسبیده و سپس با تکثیر گلیکوکالیکس بوسیله باکتری‌ها، این اتصال برگشت ناپذیر می‌گردد. رشد بیوفیلیم با تکثیر باکتری‌های بدون پایه پیشرفت نموده و به تدریج با اضافه شدن سایر باکتری‌های موجود در محیط افزایش می‌یابد (۳ و ۴). کاهش فعالیت متابولیکی، کاهش میزان رشد، و انتقال ژن‌های مقاوم همگی با مقاومت آنتی‌بیوتیکی ساختار بیوفیلیم در ارتباط می‌باشند. این تجمعات به عنوان یک مخزن باکتریایی مزمن مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های رایج عمل نموده و به نظر می‌رسد که دبریدمان آن، توجیه کننده برطرف شدن علائم کلینیکی بیمار می‌باشد (۵). نقش بیوفیلیم در اتیولوژی و پاتوژنز سرماخوردگی‌های مکرر و رینوسینوزیت مزمن در مطالعات گوناگونی نشان داده شده است (۳-۵). تشکیلات بیوفیلیم در روی سطح آدنوئید و لوزه‌ها خصوصاً در کودکان با عفونت‌های مکرر مشاهده و گزارش شده‌اند (۶، ۷).

باکتری‌ها سابق بر این به عنوان ارگانسیم‌های منفردی شناخته می‌شدند، درحالی‌که اکنون دانسته شده است که اکثر باکتری‌ها می‌توانند در اجتماعات پیشرفته‌ای تحت عنوان بیوفیلیم به سطوح بچسبند. بنابر شواهد آناتومیک قوی، بیوفیلیم‌ها به طور فزاینده‌ای به عنوان عامل ایفا کننده نقش در بیماری‌های گوش و حلق و بینی علی‌الخصوص لوزه این بیماران شناخته می‌شوند (۱۰). از آنجا که باکتری‌های بدون پایه در بیوفیلیم، مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و دفاع میزبان (علی‌الخصوص استافیلوکوکوس‌های مقام به متی‌سیلین) هستند، بیوفیلیم باکتریایی درون لوزه‌ها ممکن است طبیعت مزمن و مکرر بودن برخی از انواع التهاب

لوزه را توضیح دهد (۸، ۹، ۱۱، ۱۲).

بافت آدنوئید به عنوان مخزنی برای باکتری‌ها شناخته شده و ارتباط آن با عفونت‌های مکرر گوش و حلق و بینی به اثبات رسیده است (۱۰). تشکیلات بیوفیلیم مکانیسمی برای باکتری‌ها ایجاد مینماید که با کاهش میزان متابولیسم، از خطرهای غیر بیولوژیکی مانند رادیاسیون، تغییرات درجه حرارت و پارگی مکانیکی در امان بمانند، بطوریکه باکتری‌های موجود در ساختار بیوفیلیم ۱۰ تا ۱۰۰۰ برابر نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومتر می‌باشند (۷). در این میان، ماتریکس خارج سلولی موجب بقای بیوفیلیم و حفاظت از باکتری‌ها در مقابل آنتی‌بادی‌ها، فاگوسیت‌های سیستم ایمنی، نفوذ آنتی‌بیوتیک و اتصال کمپلمان، و کاهش نیاز آنها به اکسیژن و مواد غذایی می‌گردد. علاوه بر آن بیوفیلیم‌ها، محیطی را برای باکتری‌ها فراهم می‌آورند تا DNA خود را با انتقال اطلاعات ژنتیک از طریق پلاسمیدها به اشتراک گذاشته و نوع خود و نیز جهش‌های سازشی مانند مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها را حفظ و ایجاد نمایند (۱۱).

مشخص شده است که بیوفیلیم‌های باکتریایی می‌توانند با تخریب اپی‌تلیوم تنفسی و رخ دادن عفونت‌های مکرر در افراد مبتلا به اوتیت مدیا حاد مکرر و حتی در افراد مبتلا به عفونت مزمن گوش میانی با و بدون کلساتوم، در ارتباط باشد. علاوه بر اینها ثابت شده است که بیوفیلیم‌های موجود در آدنوئید و نازوفارنکس کودکان مبتلا به رینوسینوزیت مزمن می‌توانند به عنوان یک مخزن عفونت باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک برای *Haemophilus influenzae* و همچنین *Haemophilus parainfluenzae* عمل نماید. همچنین در برخی از مطالعات نشان داده شده است که شناخت جمعیت باکتریایی موجود در ساختار بیوفیلیم و پروتئین‌های مترشحه از آنها، می‌تواند روزه ای برای درمان‌های تارگت تراپی و حتی طراحی واکسن جهت بهبود علائم عفونت حاد گوش میانی عودکننده بگشاید (۹، ۱۱-۱۹).

هایپرتروفی آدنوئید یک یافته شایع در دوران کودکی بوده که احتمالاً با عفونت حاد گوش میانی عودکننده، اوتیت سرو و آپنه انسدادی خواب در ارتباط می‌باشد. آدنوئیدکتومی انسداد فیزیکی لوله استاش را برطرف

شدیم تا کشت نمونه‌ی بافت آدنوئید و میکروارگانیزم‌های موجود در آن را در کنار بیوفیلیم در نمونه الکترون میکروسکوپی کودکان با علایم انسداد تنفسی، مطالعه و بررسی نماییم.

### روش کار

از میان کودکان مراجعه کننده به درمانگاه های فوق تخصصی گوش و حلق و بینی مرکز آموزشی-درمانی کودکان حضرت علی اصغر (ع)، بیماران با علایم انسداد مجاری هوایی فوقانی (Nasal obstruction) را که کاندید عمل جراحی آدنوئیدکتومی بودند، وارد طرح نمودیم. اندیکاسیون آدنوئیدکتومی در این مطالعه (معیارهای ورود) وجود هایپرتروفی آدنوئید تایید شده در معاینه و گرافی لترال گردن (Adenoid view) به همراه علایم انسداد راه هوایی فوقانی مزمن شامل وقفه تنفسی، خرخر شبانه، تنفس با دهان باز، چهره آدنوئید، اشکالات دندانی، اختلالات تکلم و بی قراری حین خواب (در صورت همراهی با خرخر شبانه) در نظر گرفته شد. معیارهای خروج از مطالعه نیز شامل ابتلا به بیماری های سیستمیک فیبروزیس، نقص ایمنی، و اختلالات تنفسی از جمله آسم و نیز استفاده از درمانهای آنتی بیوتیکی در طول دو هفته قبل از عمل جراحی بود.

اطلاعات دموگرافیک بیماران شامل سن و جنس به همراه سایر اطلاعات از جمله تعداد دفعات عفونت راه هوایی فوقانی (سرماخوردگی، فارنژیت، سینوزیت) در یکسال گذشته، سائز آدنوئید، و سایر معیارهای ورود، توسط متخصص گوش و حلق و بینی در درمانگاه جمع آوری و در پرسشنامه وارد شد. با توجه به احتمال دخالت عامل انسداد ناشی از هایپرتروفی آدنوئید در موارد اوتیت مدیا و تفاوت اتیولوژی، موارد اوتیت مدیا به عنوان عامل مداخله گر در تعداد دفعات عفونت های راه هوایی فوقانی شناخته شده و در مطالعه حاضر، لحاظ نشدند. در این مرحله با بازه ای کردن تعداد دفعات عفونت و نیز دقت در شرح حال گیری بیماران بر اساس تعداد دفعات عفونت راه هوایی فوقانی در یک سال گذشته، بیماران را به پنج گروه کمتر از ۵ بار عفونت، بین ۵-۸ عفونت، بین ۸-۱۲ عفونت، بین ۱۲-۱۵ عفونت و بیشتر از ۱۵ بار عفونت تقسیم بندی

نموده و در نتیجه درناژ موکوس و فشار نرمال در گوش میانی را برقرار می‌نماید و در کاهش عود اوتیت سرروز مؤثر می‌باشد (۲۰-۲۲). آدنوئیدهای کلونیزه شده به وسیله بیوفیلیم، می‌توانند به عنوان یک منبع بالقوه برای باکتری‌هایی که قابلیت مهاجرت داشته، عمل کنند. در نتیجه، بیوفیلیم های نازوفارنژیال می‌توانند با انتشار خود منجر به تشکیل بیوفیلیم های باکتریایی در گوش میانی و اوتیت سرروز گردند (۲۳). در این میان، عفونت‌های قارچی بدون علایم نیز مساله حایز اهمیتی به شمار می‌آیند که لازمه تشکیل بیوفیلیم، نقش مهمی در عفونت‌های تنفسی فوقانی ایفا می‌کند که نه تنها مقاومت این عفونت‌ها به درمان آنتی بیوتیکی را توجیه می‌کند، بلکه یک توجیه مهم در خصوص پایداری واکنش‌های التهابی مزمن را نیز ارائه می‌دهد (۵، ۶، ۲۰-۲۴).

آدنوئید حاوی تعداد زیادی باکتری پاتوژن است و در کودکان مبتلا به رینوسینوزیت بیشتر به عنوان یک منبع باکتری شناخته می‌شود تا یک علت انسداد مکانیکی (۲۱). مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که کشت نمونه ی تهیه شده با سوآب و نمونه ی آدنوئیدکتومی در ارتباط نزدیکی با هم هستند و فلور هوازی و بی هوازی در هر دو نمونه دیده شده است. بیشترین هوازی‌ها استرپتوکوک پنومونیه، استرپتوکوک پیوژن، هموفیلوس آنفولانزا، موراکسلا کاتارالیس بوده است و غالب بی هوازی‌ها شامل *Staphylococcus aureus*، *Prevotella* و *Fusobacterium* بوده است (۱۳، ۲۱). در مطالعات دیگری به بررسی باکتری های آتیپیک و ویروسها پرداخته شده است. به طوری که، علاوه بر *Influenza Hemolytic Streptococcus Group A* و *Haemophilus virus type A and B* و همچنین *Adenoviruses* و *influenza* به عنوان شایعترین ارگانیزم ها در عفونت راه هوایی فوقانی شناخته شده اند. همچنین *Chlamydia* و *Mycoplasma* هم در تونسیلوفارنژیت حاد کودکان و *Candida albicans* و *Aspergillus* نیز در CSOM، یافت شده‌اند (۲۸-۳۱). با در نظر گرفتن مطالعات مشابه صورت گرفته بر روی بیوفیلیم بیماران مبتلا به اوتیت سرروز و رینوسینوزیت و سایر عفونت‌های نازوفارنژیال، ما بر آن

نمودیم.

سایز آدنوئید بوسیله گرافی Adenoid view و براساس میزان درصد انسداد نازوفارنکس اندازه گیری شد. به گونه ای که انسداد زیر ۲۵٪ درجه یک، ۲۵-۵۰٪ درجه دو، ۵۰-۷۵٪ درجه سه و بیشتر از ۷۵٪ درجه انسدادی چهار در نظر گرفته شد (۸). پس از برداشت بافت آدنوئید بیماران توسط جراح متخصص گوش و حلق و بینی در اتاق عمل ابتدا یک نمونه در داخل محلول نرمال سالین جهت کشت به آزمایشگاه قلهک ارسال گردید و باقی نمونه پس از شستشو با محلول نرمال سالین، با چاقو از چند محل برش داده شده و در محلول گلو تار آلدیید ۲/۵٪ قرار داده و فیکس شد. سپس نمونه‌ها به صورت هفتگی و در دفعات متعدد، به واحد میکروسکوپ الکترونی ارسال گردید. در طول فاصله برداشت نمونه تا بررسی با میکروسکوپ الکترونی، نمونه‌ها در دمای محیط  $20^{\circ}\text{C}$  نگه داری شدند. در آن مرکز ابتدا نمونه‌ها در خلا  $10^{-3}$  Torr خشک شدند. سپس با کمک مسئول کار، پس از لایه پوشانی سطح نمونه‌ها با لایه طلا به ضخامت ۳۰-۵۰ nm (voltage 800v, 100 mA)، نمونه‌ها از نظر وجود و وسعت بیوفیلیم با استفاده از میکروسکوپ الکترونی اسکینینگ Environmental Philips XL30 Scanning Electron Microscope (ESEM) طبقه بندی شدند. به گونه ای که براساس میزان درگیری سطح نمونه الکترون میکروسکوپ با بیوفیلیم باکتری میزان کمتر از ۲۰٪ را Grade I، ۲۰-۴۰٪ را Grade II، ۴۰-۶۰٪ را Grade III، ۶۰-۸۰٪ را Grade IV و بیشتر از ۸۰٪ را Grade V در نظر گرفتیم (۱۰). این نتایج سپس به وسیله نرم افزارهای آنالیز سطح Clemex Vision software; version 3.5) Clemex Technologies inc., Quebec, Canada و image analysis software Version 2.0 مورد آنالیز جهت بازنگری و تایید مجدد قرار گرفت.

روش‌های تجزیه و تحلیل داده‌ها: پس از جمع آوری اطلاعات بیماران، بررسی‌های آماری با استفاده از نرم افزار آماری Statistical Package for the Social Sciences Version.22 (SPSS ver.22. Inc, Chicago, Illinois, USA) بدین صورت که برای مقایسه متغیرهای کیفی میان گروه‌ها از

طریق آنالیز Chi square و برای بررسی ارتباط میان متغیرهای کمی مانند سن و طول مدت علایم با متغیرهای کیفی چند حالتی مانند سایز آدنوئید و کشت بافتی و یا وسعت سطح پوشیده شده از بیوفیلیم از آزمون ANOVA استفاده می‌گردد. سطح معنی دار در تمام تست‌ها  $p < 0.05$  می‌باشد.

ملاحظات اخلاقی: این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی ایران مورد بررسی و تایید قرار گرفته است. (کد اخلاق IR.IUMS.REC 1396.8721215051). تمام مبانی طرح برای بیماران که پس از تشخیص قطعی انسداد راه هوایی فوقانی کاندید عمل جراحی شده بودند، توضیح داده شد و بیماران با رضایت آگاهانه و کتبی والدین وارد طرح شدند. در تمام مراحل طرح اطلاعات مربوط به بیماران محرمانه مانده و تنها برای اهداف پژوهشی مورد استفاده قرار گرفت.

### یافته‌ها

تعداد ۵۱ کودک (با رنج سنی ۲۸ ماه تا ۱۳ سال)، با متوسط سنی  $(2/65 \pm)$  ۷/۳۱ سال وارد این مطالعه شدند. از این میان تعداد ۳۸ نفر (۷۴/۵٪) پسر و ۱۳ نفر (۲۵/۵٪) دختر بودند. اطلاعات تعداد عفونت راه هوایی فوقانی و درصد فراوانی آنها، به تفکیک دفعات، در جدول یک آورده شده است.

از نظر علایم همراه، خرخر شبانه و تنفس با دهان باز در ۱۰۰٪ (۵۱ نفر)، افراد دیده شد. سایر علایم همراه که در معیارهای ورود نیز ذکر شده اند، به تفکیک در جدول شماره دو همراه با درصد فراوانی آورده شده است. همچنین طول مدت علایم از زمان شروع به طور متوسط ۲،۵ سال  $(21/4 \pm 30)$  (با رنج بین ۲ ماه تا ۷/۵ سال) بود (جدول ۲).

گرید آدنوئید بر اساس میزان درصد انسداد نازوفارنکس به تفکیک Grade I-IV در نمودار شماره دو آورده شده است. برای هیچ بیماری Grade I گزارش نشده است.

ساختار بیوفیلیم در تمامی نمونه‌های مورد مطالعه (۱۰۰٪) موارد مشاهده و گزارش گردید (تصاویر ۱ تا ۴). در جدول ۳، اطلاعات مرتبط با کشت بافتی نمونه آدنوئید بیماران بر اساس میکروارگانیزم‌ها، به همراه

**جدول ۱- تعداد و درصد فراوانی بیماران بر اساس تعداد دفعات عفونت راه هوایی فوقانی در یک سال گذشته**

تعداد دفعات عفونت راه هوایی فوقانی	تعداد بیماران	درصد فراوانی
کمتر از ۵ بار	۱۱	۲۱/۶
۵ - ۸	۱۳	۲۵/۵
۸ - ۱۲	۱۰	۱۹/۶
۱۲ - ۱۵	۵	۹/۸
بیشتر از ۱۵	۱۲	۲۳/۵
مجموع	۵۱	۱۰۰

**جدول ۲- تعداد و درصد فراوانی علائم همراه در بیماران**

علائم همراه	تعداد	درصد فراوانی
خرخر شبانه	۵۱	۱۰۰
تنفس با دهان باز	۵۱	۱۰۰
چهره آدنوئید	۳۹	۷۶/۴
مشکلات دندان	۳۳	۶۴/۷
آپنه حین خواب	۳۲	۶۲/۷
اختلالات تکلم	۲۷	۵۲/۹
بیقراری حین خواب	۲۳	۴۵/۱
شب ادراری	۱۲	۲۳/۵
راه رفتن حین خواب	۹	۱۷/۶



**نمودار ۱- طبقه بندی بیماران بر اساس گرید آدنوئید مشاهده شده در گرافی Adenoid view**

جهت آنالیز داده‌های کمی با توزیع نرمال از تست One way ANOVA استفاده شد و داده‌های با توزیع غیر نرمال با استفاده از تست آماری Kruskal Wallis استفاده شد. تست  $\chi^2$  نیز برای تحلیل داده‌های کیفی مورد استفاده قرار گرفت. میانگین سنی در گروه‌های مختلف کشت اختلاف معنی داری ندارد (One way ANOVA,  $P=0.827$ ). میانگین تعداد

درصد فراوانی گردآوری شده است. در جدول ۴ نیز اطلاعات مرتبط با تعداد عفونت در یک سال بر اساس کشت بافتی نمونه آدنوئید بیماران جمع شده است. بر اساس داده‌های این جدول، بیشترین فراوانی شایع‌ترین ارگانیزم بافتی در بیوفیلیم با گرید ۶۰-۸۰٪ است. همچنین، بیوفیلیم بالای ۶۰٪ بیشترین میزان کشت مثبت را به خود اختصاص داده است (جدول ۶).

جدول ۳- کشت بافتی و درصد فراوانی نمونه ی آدنوئید بیماران بر اساس میکروارگانیزم ها

گروه کشت	تعداد	درصد فراوانی
<i>viridans Alpha hemolytic Streptococcus</i>	۲۶	۴۵/۶
<i>Staphylococcus aureus</i>	۱۵	۲۶/۳
<i>Alpha hemolytic Streptococcus</i>	۴	۷/۰۰
<i>Staphylococcus aureus &amp; alpha hemolytic streptococi normal</i>	۲	۳/۵
<i>Streptococcus pyogene A</i>	۲	۳/۵
<i>Enterobacter</i>	۱	۱/۸
No growth	۱	۱/۸

جدول ۴- تعداد عفونت در یک سال بر اساس کشت بافتی نمونه آدنوئید بیماران

جمع کل	کشت منفی	استافیلوکوکوس اورئوس و آلفا همولیتیک استرپتوکوکوس	انتروباکتر	استرپتوکوکوس پیوژن گروه A	استافیلوکوک اورئوس	آلفا همولیتیک استرپتوکوکوس	آلفا همولیتیک استرپتوکوکوس و بریدانس	تعداد عفونت در یک سال
۱۱	۰	۱	۰	۱	۳	۰	۶	کمتر از ۵ بار
۱۲	۱	۰	۰	۰	۴	۱	۶	بین ۵ تا ۸ بار
۱۰	۰	۰	۱	۰	۳	۲	۴	بین ۸ تا ۱۲ بار
۶	۰	۱	۰	۰	۳	۰	۲	بین ۱۲ تا ۱۵ بار
۱۲	۰	۰	۰	۱	۲	۱	۸	بالای ۱۵ بار
۵۱	۱	۲	۱	۲	۱۵	۴	۲۶	جمع کل

خارج شده جهت کشت و تست PCR ارسال گردید و مشخص شد که *Hemolytic Streptococcus Group A* بیشترین فراوانی را دارا بود. آدنوویروس در ۱۸،۲ و آنفولانزا A و B هر کدام در یک بیمار دیده شد. *Hemolytic Streptococcus Group A* در ۳۷ بیمار (۶۷/۳٪)، هموفیلوس آنفولانزا در ۵/۴٪، میکوپلازما پنومونیه در ۱۰/۹٪ موارد و کلامیدیا پنومونیه در ۱۸/۲٪ یافت شد (۲۹). در مطالعه ی دیگری به بررسی ارگانیزم‌ها در دو گروه هوازی و بی هوازی پرداخته بودند که در آن مطالعه نیز، استرپتوکوک پنومونیه جز ارگانیزم‌های هوازی غالب بود (۱۳). این در حالی است که در مطالعه ما بیشترین میزان کشت مثبت در نمونه آدنوئید بیماران متعلق به *hemolytic Streptococcus viridans* با درصد فراوانی ۴۵/۶٪ بود. در مطالعه تحلیلی (Retrospective) دیگری با بررسی گرید سینوزیت و سائز آدنوئید در ۴۱۰ کودک زیر ۱۴ سال که تحت عمل جراحی آدنوئیدکتومی واقع شده بودند، مشخص شد که میزان مثبت شدن کشت با توجه به افزایش گرید سینوزیت به طور قابل توجهی

دفعات عفونت در گروه های مختلف کشت اختلاف معنی داری ندارد (Kruskal Wallis, P=0.985). میانگین طول مدت علائم در گروه های مختلف کشت اختلاف معنی داری ندارد (Kruskal Wallis, P=0.159). بین جنسیت و گروه های مختلف کشت اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد (Wallis, P=0.701). بین سائز آدنوئید و گروه های مختلف کشت اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد (Chi2, P=0.003). (Chi2)

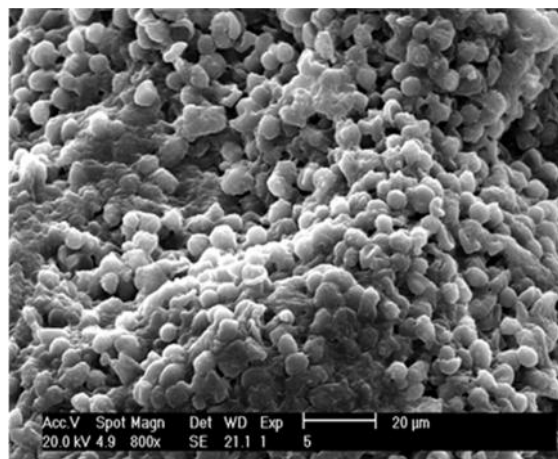
### بحث و نتیجه گیری

در مطالعه فعلی میان سائز آدنوئید و کشت بافتی ارتباط معناداری مشاهده شده به طوری که هر چه سائز آدنوئید بزرگتر باشد، میزان احتمال مثبت شدن کشت افزایش خواهد یافت. در مطالعه‌ای که *Giorgio* و همکارانش با هدف بررسی باکتری‌های آتیپیکال بر روی کودکانی که به علت عفونت راه تنفسی فوقانی راجعه یا مزمن، تحت عمل آدنوئیدکتومی یا تونسیلکتومی قرار گرفته بودند انجام شد، نمونه بافتی

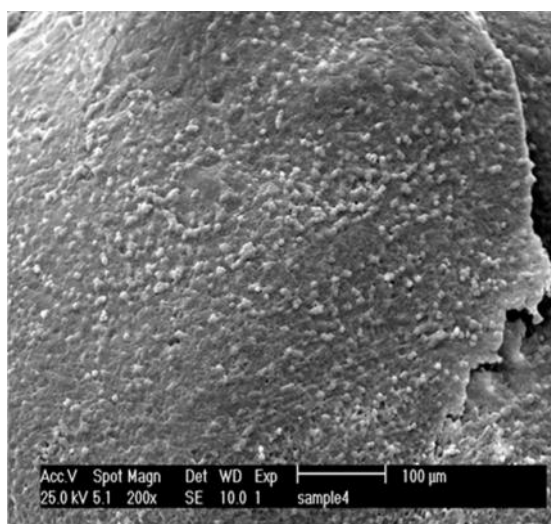




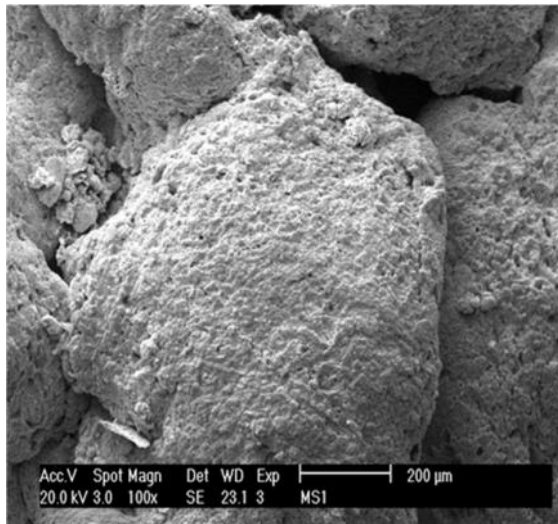
تصویر ۲- تشکیلات بیوفیلم در نمونه بافت آدنوئید (بزرگنمایی ۱۰۰×)



تصویر ۱- تشکیلات بیوفیلم در نمونه بافت آدنوئید (بزرگنمایی ۸۰۰×)



تصویر ۴- تشکیلات بیوفیلم Grade 3 (بین ۴۰-۶۰٪) در نمونه بافت آدنوئید (بزرگنمایی ۲۰۰×)



تصویر ۳- تشکیلات بیوفیلم Grade 5 (بین ۸۰-۱۰۰٪) در نمونه بافت آدنوئید (بزرگنمایی ۱۰۰×)

تشکیلات بیوفیلم مشاهده نشد؛ چنانکه در مطالعه ما نیز ارتباطی میان سائز آدنوئید با تعداد دفعات عفونت مشاهده نگردید، بلکه میان سائز آدنوئید و کشت بافتی ارتباط معناداری یافت شد. از طرفی در مطالعه حاضر ارتباطی میان سائز آدنوئید با سن، جنس، طول دوره علائم، وسعت ساختار بیوفیلم و کشت بافتی مشاهده نشد

در مطالعه فعلی تعداد افراد با انسداد نازوفارنکس زیر ۲۵٪ صفر و بین ۲۵ تا ۵۰٪ دو نفر بوده و بقیه ۴۹ نفر انسداد بالاتر از ۵۰ درصد داشتند که نشان می‌دهد تقریباً تمام بیماران با تشخیص انسداد راه هوایی کاندیدای آدنوئیدکتومی شده‌اند که این مطلب امری

افزایش یافت، ولی علی‌رغم یافته‌های ما میان سائز آدنوئید و مثبت شدن کشت و یا گرید سینوزیت ارتباط معناداری یافت نشد (۲۱).

در مطالعه Safaan و همکاران در سال ۲۰۱۳ که به بررسی تشکیلات بیوفیلم در بیماران مبتلا به هایپرتروفی آدنوئید در دو گروه با و بدون اوتیت سرور می‌پرداخت، این چنین عنوان شده است که بافت آدنوئید به عنوان یک مخزن برای عفونت مزمن عمل نموده و درجات بالاتری از تشکیلات بیوفیلم در بیماران با اوتیت سرور نسبت به گروهی که تنها هایپرتروفی آدنوئید داشتند مشاهده گردید (۳۲). در مطالعه مذکور، همچنین ارتباطی میان سائز آدنوئید و میزان

که بیشترین تعداد را هم در بیوفیلیم با درجه ی بیش از ۶۰٪ داشت. باتوجه به اینکه سایر مطالعات فقط از نظر بررسی شایع ترین میکروارگانیسم بوده است، این مطالعه در واقع اولین بررسی توامان انواع ارگانیسم ها و مقایسه ی آن با درجه ی بیوفیلیم است. استرپتوکوک آلفا همولیتیک میکروارگانیسمی است که با اکسید کردن آهن هموگلوبین RBC باعث رنگ سبز محیط کشت میشود. استرپتوکوک آلفا همولیتیک ویریدانس نوع دهانی این ارگانیسم هست که نوعی فلور نرمال محسوب می شود. باتوجه به مطالعات، دیده شده است که همین میکروارگانیسم می تواند باعث بیماریزایی شود (۳۳، ۳۴).

در مطالعه ی دیگری که به بررسی میزان نقش مهراری ارگانیسم های فلور نرمال دهانی پرداخته بود، نشان داده شد که آلفا همولیتیک استرپتوکوک ۹۲٪ اثر مهراری بر استرپتوکوک پنومونیه، ۷۴٪ بر هموفیلوس آنفولانزا و ۸۹٪ بر مورکسلا کاتارالیس دارد؛ ولی تحقیق آنها به این نتیجه رسید که فعالیت مهراری فلور نرمال ها در بیماران اوتیت سرروز مزمن و اوتیت میانی حاد مکرر کاهش چشم گیری داشته است (۳۵). در مطالعه دیگری که به بررسی واکنش میان باکتری ها در اوتیت، تانسلیت و سینوزیت پرداخته بود، شواهد نشان دهنده ی این بود که باکتریهای فلور نرمال که خاصیت بیماریزایی کمتری دارند، در حضور باکتریهای قوی تر از خود با اثر سینرژیسمی باعث بیماریزایی بیشتر می شود (۳۶).

عدم رضایت والدین برخی بیماران برای انجام عمل جراحی از جمله محدودیت های مطالعه ما بوده و نیز یکی دیگر از محدودیت های طرح فعلی ما، دشوار بودن شرح حال گیری دقیق در خصوص تعداد دفعات عفونت راه هوایی فوقانی در یکسال گذشته به دلیل عدم وجود سیستم ثبت سابقه پزشکی (Registry) بود که با تقسیم بندی بیماران بر اساس تعداد دفعات عفونت راه هوایی فوقانی به پنج گروه و نیز دقت در شرح حال گیری سعی بر رفع این نقیصه نمودیم.

در این مطالعه چنانچه آرایه شد ارتباط معناداری بین افزایش گرید سطح پوشیده شده از بیوفیلیم آدنوئید، با تعداد دفعات عفونت راه هوایی فوقانی وجود داشت. همچنین بیشترین فراوانی شایعترین ارگانیسم بافتی در

طبیعی و توجیه پذیر است چرا که اندیکاسیون آدنوئیدکتومی، انسداد راه هوایی فوقانی و مشکلات متعاقب آن مانند وقفه تنفسی، خرخرشبانه، تنفس با دهان باز و... می باشد؛ چنانچه تمامی افراد شرکت کننده در این طرح (۱۰۰٪) خرخرشبانه و تنفس با دهان باز را ذکر میکردند. همچنین در مطالعه *Saylam* و همکاران، بیماران را بر اساس انسداد راه هوایی ناشی از هایپرتروفی آدنوئید به سه گروه کمتر از ۵۰٪، ۵۰ تا ۷۵٪ و بالاتر از ۷۵٪ تقسیم بندی نموده اند که از میان ۳۴ بیمار شرکت کننده در طرح تنها دو بیمار به گروه اول (انسداد زیر ۵۰٪) تعلق داشتند (۲۳).

نکته حایز اهمیت آنست که برای بیماریهای گوش و حلق و بینی در مقالات مختلف تعاریف گوناگونی در نظر گرفته شده است. در این مطالعه نیز در ابتدا ما بر آن بودیم تا بیماران را به دو گروه عفونت مکرر راه هوایی فوقانی (با بیش از ۸ نوبت عفونت راه هوایی فوقانی در یک سال گذشته) و گروه انسداد راه هوایی فوقانی (با کمتر از ۸ نوبت عفونت راه هوایی فوقانی در یک سال گذشته) تقسیم کنیم و درجه وجود بیوفیلیم را در این دو گروه با یکدیگر مقایسه نماییم. اما از آنجاکه این تعاریف در رفرانس های مختلف و نیز برای سنین مختلف متفاوت بوده و هیچکدام از این تعاریف بطور کامل دقیق نمی باشد، تعیین cutoff برای تعداد عفونت راه هوایی فوقانی جهت تقسیم بندی بیماران به دو گروه منطقی به نظر نمی رسد. بنابراین، به جای آن در نظر گرفتیم تا ارتباط میزان و درجه بیوفیلیم را با تعداد دفعات عفونت راه هوایی در طول یکسال در گروه های مختلف بیماران بسنجیم و بر این اساس بیماران را بر اساس تعداد دفعات عفونت راه هوایی فوقانی در طول یکسال گذشته به پنج گروه، تعداد عفونت راه هوایی فوقانی کمتر از ۵ بار، ۵ تا ۸ بار، ۸ تا ۱۲ بار، ۱۲ تا ۱۵ بار و بیشتر از ۱۵ بار تقسیم کردیم. با این کار علاوه بر کاهش خطای احتمالی در تخمین تعداد دفعات عفونت راه هوایی فوقانی به دلیل بازه ای در نظر گرفتن تعداد دفعات عفونت، ارتباط میزان و درجه بیوفیلیم بر روی سطح نمونه بافت آدنوئید و کشت بافتی آدنوئید با تعداد دفعات عفونت سنجیده گردید. در مطالعه ما شایعترین ارگانیسم بافتی آلفا همولیتیک استرپتوکوک ویریدانس شناخته شد با فراوانی ۴۵/۶٪

obstructive sleep apnea. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2007;133(2):110-4.

12. Tsou YA, Lin CD, Hsu HY, Peng MT, Kuo YY, Tien N, et al. Association of  $\beta$ -Lactam-Sensitive *Haemophilus influenzae* Type B with Adenoid Biofilm Formation in Patients with Adenoidectomy Surgery. *Surg Infect.* 2015;16(6):709-15.

13. Zuliani G, Carlisle M, Duberstein A, Hauptert M, Syamal M, Berk R, et al. Biofilm density in the pediatric nasopharynx: recurrent acute otitis media versus obstructive sleep apnea. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2009;118(7):519-24.

14. Bakaletz LO. Bacterial biofilms in the upper airway-evidence for role in pathology and implications for treatment of otitis media. *Paediatr Respirat Rev.* 2012;13(3):154-9.

15. Chao Y, Marks LR, Pettigrew MM, Hakansson AP. *Streptococcus pneumoniae* biofilm formation and dispersion during colonization and disease. *Front Cell Infect Microbiol.* 2015;4:194.

16. Hunsaker DH, Leid JG. The relationship of biofilms to chronic rhinosinusitis. *Current Opinion Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008;16(3):237-41.

17. Kosikowska U, Korona-Główniak I, Niedzielski A, Malm A. Nasopharyngeal and adenoid colonization by *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* in children undergoing adenoidectomy and the ability of bacterial isolates to biofilm production. *Medicine.* 2015;94(18):.

18. Akyıldız , Take G, Uygur K, Kızıl Y, Aydil U. Bacterial biofilm formation in the middle-ear mucosa of chronic otitis media patients. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2013;65(3):557-61.

19. Saunders J, Murray M, Alleman A. Biofilms in chronic suppurative otitis media and cholesteatoma: scanning electron microscopy findings. *Am J Otolaryngol.* 2011;32(1):32-7.

20. Nistico L, Kreft R, Gieseke A, Coticchia J, Burrows A, Khampang P, et al. Adenoid reservoir for pathogenic biofilm bacteria. *J Clin Microbiol.* 2011;49(4):1411-20.

21. Hoa M, Syamal M, Schaeffer MA, Sachdeva L, Berk R, Coticchia J. Biofilms and chronic otitis media: an initial exploration into the role of biofilms in the pathogenesis of chronic otitis media. *Am J Otolaryngol.* 2010;31(4):241-5.

22. Kania R, Vironneau P, Dang H, Bercot B, Cambau E, Verillaud B, et al. Bacterial biofilm in adenoids of children with chronic otitis media. Part I: a case control study of prevalence of biofilms in adenoids, risk factors and middle ear biofilms. *Acta Oto-Laryngol.* 2019;1-6.

23. Saylam G, Tatar EÇ, Tatar I, Özdek A, Korkmaz H. Association of adenoid surface biofilm formation and chronic otitis media with effusion. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2010;136(6):550-5.

24. Hamilos DL. Biofilm Formations in Pediatric

بیوفیلم با گریدهای بالاتر مشاهده شد و بیوفیلم بالای ۶۰٪ بیشترین میزان کشت مثبت را به خود اختصاص داده است. بنابراین، این مطالعه نیز تایید می کند که حضور بیوفیلم در آدنوئید به عنوان یک مخزن عفونت، موجب ازمان التهاب می گردد و می تواند توجیه کننده اثر بخشی آدنوئیدکتومی به عنوان یک راهکار درمانی شناخته شده در کودکان مبتلا به عفونت‌های مکرر راه هوایی فوقانی باشد.

## References

1. Hoyle BD, Costerton JW. Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. *Progress in Drug Research/Fortschritte der Arzneimittelforschung/ Progrès des recherches pharmaceutiques*: Springer; 1991. p. 91-105.
2. Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;35(4):322-32.
3. Post JC, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Ehrlich GD. The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Current Opinion Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004;12(3):185-90.
4. Sanderson AR, Leid JG, Hunsaker D. Bacterial biofilms on the sinus mucosa of human subjects with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope.* 2006;116(7):1121-6.
5. Suh JD, Cohen NA, Palmer JN. Biofilms in chronic rhinosinusitis. *Current Opinion Otolaryngol Head And Neck Surg.* 2010;18(1):27-31.
6. 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.
7. Kania RE, Lamers GE, Vonk MJ, Dorpmans E, Struik J, Tran Huy P, et al. Characterization of mucosal biofilms on human adenoid tissues. *Laryngoscope.* 2008;118(1):128-34.
8. Ferguson BJ, Stolz DB. Demonstration of biofilm in human bacterial chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol.* 2005;19(5):452-7.
9. Szalmás A, Papp Z, Csomor P, Kónya J, Sziklai I, Szekanecz Z, et al. Microbiological profile of adenoid hypertrophy correlates to clinical diagnosis in children. *BioMed Res Int.* 2013;2013.
10. Lin CD, Tsai MH, Lin CW, Ho MW, Wang CY, Tsou YA, et al. Association of adenoid hyperplasia and bacterial biofilm formation in children with adenoiditis in Taiwan. *European Arch Oto-Rhino-Laryngol.* 2012;269(2):503-11.
11. Coticchia J, Zuliani G, Coleman C, Carron M, Gurrola J, Hauptert M, et al. Biofilm surface area in the pediatric nasopharynx: chronic rhinosinusitis vs

Respiratory Tract Infection. *Curr Infect Dis Rep*. 2019;21(6):6.

25. Cohen M, Kofonow J, Nayak JV, Palmer JN, Chiu AG, Leid JG, et al. Biofilms in chronic rhinosinusitis: a review. *Am J Rhinol Allergy*. 2009;23(3):255-60.

26. Al-Mutairi D, Kilty SJ. Bacterial biofilms and the pathophysiology of chronic rhinosinusitis. *Curr Opinion Allergy Ad Clin Immunol*. 2011;11(1):18-23.

27. Bakar MA, McKimm J, Haque SZ, Majumder MAA, Haque M. Chronic tonsillitis and biofilms: a brief overview of treatment modalities. *J Inflamm Res*. 2018;11:329.

28. Abdelshafy I, Haleem A, Khalil Y, Ghazal A, Gaballah A. Microbiology of chronic suppurative otitis media, study of the role of bacterial biofilm and fungal infection. *J Otolaryngol ENT Res*. 2015;3(1):00051.

29. Galli J, Ardito F, Calo L, Mancinelli L, Imperiali M, Parrilla C, et al. Recurrent upper airway infections and bacterial biofilms. *J Laryngol Otol*. 2007;121(4):341-4.

30. Galli J, Calo L, Ardito F, Imperiali M, Passali G, Carnevale N, et al. Bacterial biofilm identification in the rhinopharyngeal mucosa of children with recurrent infection of the upper respiratory tract and otitis media. *Med Surg Pediatr*. 2008;30(1):31-4.

31. Tikhomirova A, Kidd SP. *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*: living together in a biofilm. *Pathog Dis*. 2013;69(2):114-26.

32. Saafan ME, Ibrahim WS, Tomoum MO. Role of adenoid biofilm in chronic otitis media with effusion in children. *European Arch Oto-Rhino-Laryngol*. 2013;270(9):2417-25.

33. Schneeberger P, Janssen M, Voss A. Alpha-hemolytic streptococci: a major pathogen of iatrogenic meningitis following lumbar puncture. Case reports and a review of the literature. *Infection*. 1996;24:129-33.

34. Brook I, Shah K, Jackson W. Microbiology of healthy and diseased adenoids. *Laryngoscope*. 2000;110(6):994-9.

35. Tano K, Grahn-Håkansson E, Holm SE, Hellström S. Inhibition of OM pathogens by alpha-hemolytic streptococci from healthy children, children with SOM and children with rAOM. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2000;56(3):185-90.

36. Brook I. The role of bacterial interference in otitis, sinusitis and tonsillitis. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005;133(1):139-46.