臨床耳鼻：第 28 卷　第 2 號　2017
J Clinical Otolaryngol 2017;28:145-150
□특　집□

만성 비부비동염에서 마이크로바이옴

한양대학교 의과대학 이비인후과학교실
조석현 · 윤희수

Microbiome in Chronic Rhinosinusitis

Seok Hyun Cho, MD and Hee Soo Yoon, MD
Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Hanyang University, College of Medicine, Seoul, Korea

서　론

급성 중이염과 급성 부비동염 등 이비인후과의 감염성 질환은 *Streptococcus pneumonia, Hemophilus influenza* 및 *Moraxella catarrhalis* 등의 특정 원인균에 의해 발생한다는 것이 정설이었으나, 최근 마이크로바이옴(microbiome)의 개념이 정립되면서 그 병인가설의 효력이 점차적으로 약해지고 있다.[1,2] 또한 대표적인 염증성 기도질환인 천식과 만성 비부비동염에서 이루어진 많은 선행연구를 통해 그 동안 잘 알지 못하였던 마이크로바이옴의 역할과 개념이 차츰 밝혀지면서 특정 원인균에 의한 특정 질병의 발생이라는 전통적인 미생물 병인가설은 더욱 설 자리를 잃고 있다.[3]

인체에 살고 있는 세균의 수는 연구에 따라 다르지만 최소 인체의 세포수와 동수이거나 많게는 10배에 달하는 것으로 알려져 있다.[4] 이와 같이 엄청난 양의 미생물은 대사기능, 면역계의 발달, 점막보호 등 인체에 매우 유익한 기능을 담당하는 것으로 이해된다.[5] 최근 *Clostridium difficile*에 의한 불응성 장염에서 장내미생물치환술의 효과가 입증되어 새로운 마이크로바이옴 가설의 전망을 밝게 하고 있으며, 또한 직간접적으로 항생제의 유용성에 대한 재고압력으로 작용하고 있는 현실이다.[6]

천식과 만성 비부비동염에서 미생물에 의한 감염은 병인가설의 하나로 계속 제시되어 왔으나, 최근 도입된 마이크로바이옴의 지식으로 인해 특정 미생물이 병원균(pathogen)으로 작용하여 질병을 유발한다는 관점에서 탈피하여 숙주 내 마이크로바이옴이 균형(symbiosis) 혹은 불균형(dysbiosis)을 이루느냐의 패러다임으로 변화하고 있다. 기도는 다량의 균총에 노출되어 있으며, 상기도에서 하기도로 갈수록 균부담(microbial burden)과 다양성이 점차 감소함을 볼 때, 상기도는 생물학적 환경인자와 밀접하게 대면하는 장소라 하겠다. 본 고찰에서는 만성 비부비동염에서 연구된 바 있는 메타게놈 연구결과를 정리하여 그 병태생리학적 의미를 정리해 보고자 한다.

교신저자 : 조석현, 04763 서울 성동구 왕십리로 222
한양대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화 : (02) 2290-8583 · 전송 : (02) 2293-3335
E-mail : shcho@hanyang.ac.kr

본　론

16S ribosomal RNA 발견과 마이크로바이옴 연구 동향

1985년 Norman Pace는 자연계 시료에서 ribosomal RNA를 시퀀싱해 본 결과 수 많은 bulk DNA가 존재함을 처음으로 발견했다. 처음에는 노이즈(false-positive)로 생각했으나 후에 이것이 미생물의 존재를 대변한다는 사실을 발견하였다.[7,8]

2001년 Lederberg와 McCray는 "마이크로바이옴은

인체에 존재하며 우리 몸을 함께 공유하며 살고 있지만 그 동안 건강이나 질병의 원인으로 무시되어 왔던 상재균(commensal), 공생균(symbiotic), 병원균(pathogenic) 등 모든 미생물의 총합"이라 정의하였다.[9]

2007년 미국 NIH에서 "Human Microbiome Project, HMP"를 시작하여 현재 약 3,000개의 microbial genome sequence를 레퍼런스(reference)로 개발하였다.[10] 2008년 "International Human Microbiome Consortium, IHMC"가 발족되어 국가별로 자국민에게 질병을 일으키는 특이 미생물의 유전정보를 분석하여 이를 공유하였고, 한국은 2011년에 가입하였다. 2016년 미국 버락 오바마 행정부는 "National Microbiome Initiative, NMI"를 지원하여 인체뿐만 아니라 가축에 영향을 미치는 토양 미생물과 우주인에게 미생물이 미치는 영향에 대한 연구를 진행하고 있다.

일본은 2005년 "Human MetaGenome Consotrium Japan(HMGJ)을 구성하였고, 중국은 2009년부터 "10,000 Microbial Genome Project"를 수행하여 현재까지 활발한 연구를 하고 있다. 한국은 이러한 전 세계적인 추세에 부응하여 2000년 초부터 여러 정부 부처에서 미생물 분야의 유전체 연구 활성화를 위해 중대형 프로젝트를 수행하여 왔고, 2002~2012년 "미생물유전체활용기술개발사업"과 2014-2021년 "미생물유전체전략연구사업" 등의 지원을 통해 미생물 유전체 정보를 체계적으로 자원화하고 산업화로 연계하려는 노력을 경주하고 있다.

배양의 한계와 마이크로바이옴 분석방법의 개발

배양은 시간이 많이 소요되고, 약 99%의 세균은 배양이 불가능한 난배양성이 있으며, 또한 결과는 매우 좁은 스펙트럼을 보여 준다.[11] 따라서 배양이 되지 않는다고 하여 무균상태임을 보장할 수 없다. 대개 1~2개의 세균이 자라는데 그 동안 이것을 병원균(pathogen)으로 규정하여 왔으나, 이와 같은 방법은 더 이상 정밀한 세균과학에서 받아들여지지 않는다.[12,13] 만성 비부비동염에서 배양에 대한 연구에서 균동정률은 60~70% 정도 이었고, 주로 *Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp*, *H. influenza*, *P. aeruginosa*와 혐기균으로 *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Bacteroides*, *Peptostreptococcus* 등이 보고되었다.[14] 그러나 이러한 결과는 연주자에 따라 결과의 많은 차이를 보였고, 한 연구에서 보고된 균주가 다른 연구에서는 언급이 안 되는 경우가 매우 많았으며, 따라서 현재 임상에서 사용하고 있는 배양은 균정보의 신뢰성이 매우 떨어지는 방법이다.

이러한 한계를 극복하기 위하여 유전자 수준에서 미생물 정보를 해독하기 위한 여러 가지 방법들이 개발되었다. 초기에 유전자 지문 분석법과 마이크로어레이칩 등이 사용되었고, 최근에는 16S rRNA 기반 메타지노믹스(metagenomics) 방법이 많이 사용된다.[15] 샘플에 섞여 있는 미생물 종의 효과적으로 탐색하기 위해 16Sr RNA의 일부를 프라이머(primer)로 이용하여 PCR 방법으로 증폭한 후 그 결과값을 이미 알려져 있는 레퍼런스와 비교하는 분자생물학적 미생물 동정 방법이다. 메타지노믹스에는 시료 내에 어떤 미생물이 존재하는가를 알기 위한 앰플리콘(amplicon) 방법과 기능 유전자를 알 수 있는 샷건(whole-genome shotgut) 방법이 있다.[16] 메타지노믹스를 위한 다양한 생물정보 분석 프로그램으로 QIME, MOTHUR, RPD, PlutoF 등이 개발되어 사용되고 있다.[17-20]

마이크로바이옴과 면역

태아는 자궁에서 초기에 Th2로 치우친 면역반응을 가진다. 산모의 산도를 통해 출생 후 주위 환경에서 다양한 미생물에 자연적으로 노출되는데, 이러한 환경적 자극의 결과로서 점차적으로 Th1/Treg의 면역을 획득하게 되며, 이것을 면역의 성숙(maturation)이라는 개념으로 이해하고 있다.[21]

따라서 너무 깨끗한 생환환경에 노출되는 경우 필요한 미생물 자극이 부족하여 Th2 관련 알레르기 질환이 증가하게 된다. Ege 등은 농장에서 자란 소아에서 환경의 마이크로바이옴과 천식의 발생에 대한 연구를 진행한 결과, 노출된 세균과 진균의 다양성은 천식 발생과 역상관성을 보임을 증명하였다.[22] 특히 *Listeria monocytogenes*, *Bacillus species*, *Corynebacterium species*에 노출이 적을수록 천식의 발생이 증가한다고 하였고, 이러한 위생가설(hygiene hypothesis)은 마이크로바이옴의 발견으로 더욱 힘을 얻고 있다.

만성 비부비동염에서 배양과 마이크로바이옴 비교연구

Hauser 등은 54명의 만성 비부비동염 환자에서 배양과 16S pyrosequencing을 동시에 시행한 결과, 배양에서는 평균 3 균체가 동정되었고, 마이크로바이옴은 평균 21.5개가 검출되었다.[23] 마이크로바이옴에서 10% 이상을 차지하는 주 종(dominant taxa)의 47.7%만 배양에서 동정되었다. 배양균의 29.5%는 16S pyrosequencing에서 주 종에 해당하였지만, 40%는 마이크로바이옴 composition의 1~10%에 해당하여 두 검사간의 불일치가 있음을 확인하였고, 결론적으로 마이크로바이옴의 결과를 세균 배양으로 예측하기 어려움을 알 수 있다.

마이크로바이옴 분석에서 샘플링 방법에 따른 차이

Yan 등은 12명의 건강한 성인을 대상으로 전비강(anterior naris), 중비도(middle meatus)와 접형사골와(sphenoethmoidal recess)의 3군데에서 swab한 샘플을 이용하여 16S pyrosequencing을 한 결과를 보고하였다.[24] 전비강에서는 *Actinobacteria*와 *Firmicutes*가 주를 이루었고, *Proteobacteria*가 상대적으로 적었다. 중비도와 접형사골와에서는 전비강에 비해 균 다양성이 증가하였다. 따라서 샘플링 위치와 상피세포의 유형에 따라서 상재하는 균주가 다름을 알 수 있고, 이에 관한 표준화가 필요하다.

Kim 등은 9명의 만성 비부비동염 환자에서 swab 샘플과 점막 샘플에서 동시에 16S pyrosequencing을 시행하였고, 두 방법간에 세균 다양성은 차이가 없었으나 composition에는 차이가 있었다고 보고하였다.[25] 그러나 Bassiouni 등은 6명의 만성 비부비동염 환자에서 위와 같은 방법으로 비교한 결과, 두 방법간에 차이가 없다고 보고하였고, 따라서 샘플링 방법에 따라서 마이크로바이옴의 결과가 달라지는지는 아직 논란의 여지가 남아 있다.[26,32]

마이크로마이옴의 심한 개체간 변이

Biswas 등은 9명의 만성 비부비동염 환자와 6명의 대조군을 대상으로 부비동 마이크로바이옴을 분석한 결과, bacterial load는 양 군간에 차이가 없었고, 다양성은 환자군에서 감소하였다.[27] Bacterial composition의 원인을 분석한 결과, 질병상태(disease status)에 의한 차이(3.8%)보다는 개체간 차이(36.9%)가 가장 심하였다. 이러한 개체간의 차이는 대조군보다 환자군에서 더욱 심하였고, 따라서 부비동염 치료에 있어서 보다 개별적인 치료(personalized treatment)의 필요성이 있음을 시사하였다.

Table 1. Sinonasal microbiome in patients with chronic rhinosinusitis compared to controls

Year	2013	2014	2015
Sampling	Nasal lavage	Nasal lavage	Swab
Total reads	2,333 (control) → 3,780 (CRS)	6,000 (control) → 60,000 (CRS)	1,779 (control) → 1,662 (CRS)
Diversity	Increased in CRS	Decreased in CRS	↔
Phylum	↔	Proteobacteria ↑ Bacteroidetes ↓	↔
Genus	N/A	Staphylococcus spp. ↑ Pseudomonas spp. ↑ Prevotella spp. ↓	Propionibacterium ↓ Peptoniphilus ↓ Prevotella ↓ (asthma)
Species	Curtobacterium ↑ Corynebacterium ↑ S. Aureus ↑ P. Aeruginosa ↑	S. epidermidis ↑ S. aureus ↑ (NP) P. monteilii ↑ Corynebacterium ↑ Propionibacterium ↑	N/A
Comments	Peripheral blood leukocytes from CRS responded to control lavage samples to produce IL-5	There was significant correlation between bacteria and extracellular vesicles	Asthma and purulence were characterized by distinct compositions of bacteria

CRS: chronic rhinosinusitis

만성 비부비동염에서 마이크로바이옴– 대조군 비교 연구

만성 비부비동염 환자와 대조군에서 마이크로바이옴의 차이에 대한 3가지 연구를 비교해 보고자 한다(Table 1). 중비도에서 샘플링을 함에 있어 Aurora와 Choi 연구에서는 비강세척(nasal lavage)를 이용했고, Ramakrinshnan 연구에서는 swab을 이용했다.[28-30] 세균의 총량(richness)을 대변하는 샘플 당 gene sequence의 수는 swab을 이용한 연구에서는 양 군간에 차이가 없었고, 비강세척액을 이용한 연구에서는 대조군에 비하여 실험군에서 최대 10배까지 증가하였으며, 따라서 샘플방법에 따른 차이가 있음을 알 수 있다. 만성 비부비동염에서와 같이 폐쇄된 공간은 세균이 번식하기 좋은 환경으로 세균의 총량이 늘어나는 방향이 옳을 것으로 생각되나, 이에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

세균의 다양성(diversity)은 세 연구에서 모두 다른 결과(증가함/비슷함/감소함)를 보였다. 만성 비부비동염에서 건강한 대조군과 유사한 정도의 생물학적 다양성을 유지한다는 것은 이론적으로 이해하기 힘든 현상이고, Choi 연구에서 보듯 다양성이 감소하는 방향이 만성 비부비동염의 병인에 옳은 설명을 하는 것으로 생각되지만, 이에 대한 보다 많은 연구가 필요하다.

세균의 조성(composition)에서 문(phylum) 분석에서 두 연구에서는 양 군간에 차이가 없었고, Choi 연구에서는 실험군에서 *Proteobacteria*의 증가와 *Bacterioides*의 감소를 보고하였다. 속(genus) 분석에서 Choi 연구는 *Staphylococcus*와 *Pseudomonas*의 증가 및 *Prevotella*의 감소를 보고하였고, Ramakrinshnan 연구는 *Propionibacterium*, *Peptoniphilus* 및 Prevotella의 감소를 보고하여 차이를 보였다. 종(species) 분석에서 두 연구는 실험군에서 *Corynebacterium*과 *S. aureus*의 증가된다고 하였으나, 다른 종에서는 결과가 일치하지 않았다. 이와 같이 대조군과 비부비동염에서 계의 생물학적 조성에서도 연구간에 불일치를 보이고 있다.

세 연구에서 특징적인 발견으로 Aurora 등은 만성 비부비동염의 혈액에서 채취한 PBMC를 정상인의 비강세척액으로 자극했을 때 과도한 IL-5의 분비가 있음을 보였고, 이것은 만성 비부비동염에서 commensal organisms에 대한 면역 과민반응이 있을 것으로 해석하였다. Choi 등은 비강세척액에서 균주(bacteria) 외에 균주에서 분비하는 소포체(extracellular vesicles)를 같이 분석하여 서로 높은 상관성이 있음을 밝혔고, 이것은 세균 자체뿐만 아니라 세균에서 분비하는 소포체에 의한 병인 가능성을 보인 것으로 해석하였다. Ramakrinshnan 등은 마이크로바이옴은 비용(nasal polyp)의 동반에 따른 차이가 없었고, 다만 천식과 화농성이 균총 변화에 영향을 미친다고 하였으며, 세균의 다양성과 조성이 수술적 치료의 예후에 영향을 미친다고 하였다.

세 연구는 샘플링 방법에서부터 다른 출발을 보여 마이크로바이옴 분석에서 중요한 분석 틀인 richness와 diversity에서 서로 상이한 결과를 보였으며, composition에서도 이러한 차이가 유지되었다. 따라서 향후 보다 체계화된 분석방법이 요구된다.

만성 비부비동염에서 마이크로바이옴– 메타분석

최근 마이크로바이옴의 만성 비부비동염과 대조군 비교연구에 대한 메타분석이 보고되어 다음과 같이 정리해 본다.[31] 비강의 마이크로바이옴은 *Firmicutes*, *Actinobacteria*와 *Proteobacteria* 문(phylum)이 주 종을 이루었다. 만성 비부비동염에서는 생물학적 다양성이 의미있게 감소하였고, *Corynebacterium* 속(genus)의 특이적인 증가를 보여 결론적으로 만성 비부비동염에서 균총의 심각한 불균형(dysbiosis)이 중요한 역할을 한다. Network modeling 방법을 이용한 분석에서 건강인에서 *Burkholderia*와 *Propionibacterium*을 제거했을 때, 균총의 fragmentation이 커짐을 발견하여 위 두 세균은 건강한 부비동 생리의 유지에 매우 중요한 보호기능이 있을 가능성이 있음을 시사하였다. 향후 건강한 부비동에서 중요한 두 가지 균주와 만성 비부비동염에서 특이성이 있다고 알려진위에서 발견한 균주들의 기능에 대한 연구를 통해 이 가설이 맞는지 증명할 필요가 있다. 또한 만성 비부비동염에서 *Corynebacterium*의 역할에 대한 규명이 필요하다.

현재까지 마이크로바이옴 연구의 한계

아직까지 만성 비부비동염에서 메타게놈 연구방법의 표준화가 부재하고, 전반적으로 샘플 수가 부족한 연구가 많았다. 또한 나이, 성별, 흡연, 화농성, 항생제 사용,

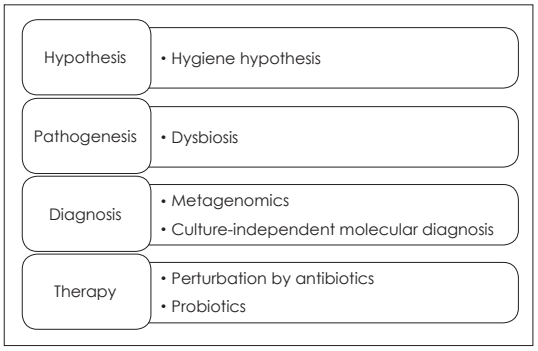

Fig. 1. Microbial hypothesis, pathogenesis, diagnosis, and treatment of chronic rhinosinusitis.

전신질환 등 다양한 혼란변수를 통제하지 못했고, 심한 개체간 차이로 인해 대조군과의 비교연구에서 일치된 연구결과를 보여주지 못했다.

만성 비부비동염에서 많은 subgroup과 phenotype에 대한 연구가 부족하였고, 단일기도질환(one airway disease) 차원에서 접근한 연구가 아직 없었다. 균총변화 자체에 대한 연구가 주를 이루어 host inflammation과 연계가 부족했고, 연구결과와 치료간 연결고리를 찾기 어렵다.

기존 배양연구에서 언급되지 않았던 새로운 균과 메타게놈에서 low abundance를 보이는 수 많은 균의 역할에 대한 규명이 필요하다. 메타게놈에서 발견한 균총의 변화는 만성 비부비동염과 상관성을 보여 주었으나 인과성을 의미하지는 않는다는 한계가 있다. 또한 whole-genome shotgun sequencing 결과가 없어 대사, 항생제 저항성, 침습성과 같이 균의 기능을 아직 알 수 없다.

결 론

만성 비부비동염에서 마이크로바이옴은 위생가설과 맥을 같이 한다(Fig. 1). 비강생리와 면역에서 생물학적 다양성이 매우 중요함을 알 수 있고, 과거의 단일 병원균에 의한 병인론은 점차 무너지고 대신 dysbiosis의 개념으로 대체되고 있다. 배양은 실제 부비동의 균주상태를 잘 대변하지 못하고, 분자생물학적 진단법인 메타지노믹스는 실제 균주에 대한 정확한 정보를 제공한다. 대부분의 균은 배양이 되지 않고, 반대로 우점균(dominant species)의 약 50%는 배양에서 동정이 안 된다는 사실은 만성 비부비동염에서 항생제의 미약한 효과를 일부 설명한다. 항생제의 사용으로 부비동의 균총은 교란될 수 있으므로 그 효능과 해악을 잘 고려해야 한다. 아직까지 난치성 만성 비부비동염에서 probiotics에 대한 보고가 많지 않지만 향후 이에 대한 많은 연구가 필요하고, 또한 더욱 체계화된 연구를 통해 만성 비부비동염의 병인을 더 잘 설명할 수 있는 기전이 나오기를 기대한다.

중심 단어 : 만성 · 비부비동염 · 균 · 마이크로바이옴.

REFERENCES

1) Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J, Bachert C, Alobid I, Baroody F, *et al. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2012. Rhinol Suppl 2012;23(3):1-298.*
2) Vickery TW, Ramakrishnan VR. *Bacterial Pathogens and the Microbiome. Otolaryngol Clin North Am 2017;50(1):29-47.*
3) Land M, Hauser L, Jun SR, Nookaew I, Leuze MR, Ahn TH, *et al. Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. Funct Integr Genomics 2015;15(2):141-61.*
4) Savage DC. *Microbial ecology of the gastrointestinal tract. Annu Rev Microbiol 1977;31:107-33.*
5) Althani AA, Marei HE, Hamdi WS, Nasrallah GK, El Zowalaty ME, Al Khodor S, *et al. Human Microbiome and its Association With Health and Diseases. J Cell Physiol 2016;231(8):1688-94.*
6) Brandt LJ. *Fecal Microbiota Therapy With a Focus on Clostridium difficile Infection. Psychosom Med 2017;79(8):868-73.*
7) Pace NR. *A molecular view of microbial diversity and the biosphere. Science 1997;276(5313):734-40.*
8) Morgan XC, Huttenhower C. *Chapter 12: Human microbiome analysis. PLoS Comput Biol 2012;8(12):e1002808.*
9) Lederberg J, McCray AT. *'Ome sweet' omics: a genealogical treasury of words. Scientist 2001;15(7):8-10.*
10) Choi S, Cho SH, Yi H. *Human microbiome studies in Korea. Allergy Asthma Respir 2016;4:311-20.*
11) Mulcahy-O'Grady H, Workentine ML. *The Challenge and Potential of Metagenomics in the Clinic. Front Immunol 2016, 3;7:29.*
12) Staley JT, Konopka A. *Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. Annu Rev Microbiol 1985;39:321-46.*
13) Ward DM, Weller R, Bateson MM. *16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. Nature 1990;345(6270):63-5.*
14) Brook I. *Microbiology of sinusitis. Proc Am Thorac Soc 2011;8(1):90-100.*
15) Claesson MJ, Clooney AG, O'Toole PW. *A clinician's guide to microbiome analysis. Nat Rev Gastroenterol Hepatol*

2017;14(10):585-95.
16) Quince C, Walker AW, Simpson JT, Loman NJ, Segata N. *Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. Nat Biotechnol 2017;35(9):833-44.*
17) Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, *et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Appl Environ Microbiol 2009;75(2):7537-41.*
18) Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, *et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nat Methods 2010;7(5):335-6.*
19) Abarenkov K, Tedersoo L, Nilsson RH, Vellak K, Saar I, Veldre V, *et al. PlutoF: a web based workbench for ecological and taxonomic research, with an online implementation for fungal ITS sequences. Evol Bioinform 2010;6:189-96.*
20) Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, *et al. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. Nucleic Acids Res 2014;42 (Database issue):D633-42.*
21) Campbell DE, Boyle RJ, Thornton CA, Prescott SL. *Mechanisms of allergic disease - environmental and genetic determinants for the development of allergy. Clin Exp Allergy 2015;45(5):844-58.*
22) Ege MJ, Mayer M, Normand AC, Genuneit J, Cookson WO, Braun-Fahrländer C, *et al. Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. N Engl J Med 2011; 364(8):701-9.*
23) Hauser LJ, Feazel LM, Ir D, Fang R, Wagner BD, Robertson CE, *et al. Sinus culture poorly predicts resident microbiota. Int Forum Allergy Rhinol 2015;5(1):3-9.*
24) Yan M, Pamp SJ, Fukuyama J, Hwang PH, Cho DY, Holmes S, *et al. Nasal microenvironments and interspecific interactions influence nasal microbiota complexity and S. aureus carriage. Cell Host Microbe 2013;14(6): 631-40.*
25) Kim RJ, Biswas K, Hoggard M, Taylor MW, Douglas RG. *Paired analysis of the microbiota of surface mucus and whole-tissue specimens in patients with chronic rhinosinusitis. Int Forum Allergy Rhinol 2015;5(10):877-83.*
26) Bassiouni A, Cleland EJ, Psaltis AJ, Vreugde S, Wormald PJ. *Sinonasal microbiome sampling: a comparison of techniques. PLoS One 2015;10(4):e0123216.*
27) Biswas K, Hoggard M, Jain R, Taylor MW, Douglas RG. *The nasal microbiota in health and disease: variation within and between subjects. Front Microbiol 2015;9:134.*
28) Aurora R, Chatterjee D, Hentzleman J, Prasad G, Sindwani R, *et al. Contrasting the microbiomes from healthy volunteers and patients with chronic rhinosinusitis. JAMA Otolaryngol Head Neck Surg 2013;139(12):1328-38.*
29) Choi EB, Hong SW, Kim DK, Jeon SG, Kim KR, Cho SH, *et al. Decreased diversity of nasal microbiota and their secreted extracellular vesicles in patients with chronic rhinosinusitis based on a metagenomic analysis. Allergy 2014;69(4):517-26.*
30) Ramakrishnan VR, Hauser LJ, Feazel LM, Ir D3, Robertson CE, Frank DN. *Sinus microbiota varies among chronic rhinosinusitis phenotypes and predicts surgical outcome. J Allergy Clin Immunol 2015;136(2):334-42.*
31) Wagner Mackenzie B, Waite DW, Hoggard M, Douglas RG, Taylor MW, Biswas K. *Bacterial community collapse: a meta-analysis of the sinonasal microbiota in chronic rhinosinusitis. Environ Microbiol 2017;19(1):381-92.*
32) Kim JY, Jeon SY, Cho SJ, Kim DW. *Bacterial recovery rate of CRS in ESS candidates. J Clinical Otolaryngol 2010; 21(2):221-5.*