

Dorota Górecka¹, Adam Nowiński¹, Ewa Augustynowicz-Kopec²

¹II Klinika Chorób Płuc, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie

²Zakład Mikrobiologii, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie

Mikrobiom układu oddechowego

Microbiome of the lung

Praca nie była finansowana

Pneumonol. Alergol. Pol. 2014; 82: 481–485

W ostatnim dziesięcioleciu dużym zainteresowaniem zaczęła się cieszyć teoria wskazująca na znaczący wpływ na zdrowie człowieka różnych mikroorganizmów – bakterii, wirusów i grzybów zasiedlających jego organizm. Zainteresowanie to wzięło się z prac nad genomem ludzkim, podczas których stwierdzono, że w organizmie człowieka znajdują się genomy licznych mikroorganizmów, dotychczas nieznanymi lub takimi, których nie można wyhodować przy zastosowaniu klasycznych metod identyfikacji bakterii sformułowanych jeszcze w XIX wieku przez Kocha [1].

Co ciekawsze, okazało się, że supergenom człowieka składa się nie tylko z genów ludzkich, które stanowią zaledwie 1% całości, ale też z genów mikroorganizmów zasiedlających nasz organizm (zwanych mikrobiomem), stanowiących 99% całości. Szacuje się, że liczba genów bakteryjnych w organizmie człowieka jest 50–100 razy większa niż liczba genów jego własnego genomu [2].

Od tej pory zaczęto organizm człowieka i zasiedlające go mikroorganizmy postrzegać jako złożony ekosystem, będący w chwiejnej równowadze. Może on bowiem odpowiadać zarówno za zdrowie, jak i – przy występowaniu dysbiozy – za liczne patologie i przewlekłe choroby zapalne.

W celu zbadania mikrobiomu człowieka powstały potężne programy badawcze w Sta-

nach Zjednoczonych i w Europie. Amerykański program *Human Microbiome Project* został zapoczątkowany w 2007 roku przez National Institutes of Health (Narodowe Instytuty Zdrowia) i zakłada scharakteryzowanie ludzkiego mikrobiomu na poziomie sekwencji nukleotydowej całego genomowego DNA populacji hodowlanych i niehodowlanych mikroorganizmów człowieka (metagenom), sekwencji nukleotydowej całkowitego mitochondrialnego RNA (mRNA) (metatranskryptomu), syntetyzowanych białek bakteryjnych (metaproteomu) oraz produktów metabolizmu (metabolomu) [3]. Projekt zakłada pobranie próbek z 5 lokalizacji: przewodu pokarmowego (badanie kału), skóry, nosa i jamy ustnej (wymazy), układu moczowo-płciowego (wymazy z pochwy) u 250 ochotników [2]. W ramach europejskiego programu *European Metagenomics of the human gastrointestinal tract* (Meta-Hit) bada się mikrobiom układu pokarmowego [4].

Dopiero od niedawna rozszerzono badania o układ oddechowy. Nowy projekt Narodowego Instytutu Serca, Płuc i Krwi (NHLBI) z 2011 roku zakłada zbadanie mikrobiomu układu oddechowego u osób zdrowych i zakażonych wirusem HIV (*Lung HIV Microbiome Project*) [5].

Dotychczas uważano, że u zdrowych osób układ oddechowy znajdujący się poniżej krtani

Adres do korespondencji: prof. dr hab. n. med. Dorota Górecka, II Klinika Chorób Płuc, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, ul. Płocka 26, 01–138 Warszawa,

e-mail: d.gorecka@igichp.edu.pl

DOI: 10.5603/PIAP.2014.0063

Praca wpłynęła do Redakcji: 9.08.2014 r.

Copyright © 2014 PTChP

ISSN 0867–7077

Tabela 1. Najczęściej stosowane metody genetyczne w badaniach mikrobiomu układu oddechowego**Table 1. Most frequent genetical methods used in respiratory microbiome research**

Skrót nazwy	Metoda
DGGE lub TGGE	Elektroforeza w żelu w gradiencie czynnika denaturującego lub temperatury
T-RFLP	Polimorfizm długości terminalnych fragmentów restrykcyjnych
Clone libraries	Biblioteki klonów (genomowe)
454-Pyrosequencing	Pirosekwencjonowanie metodą 454
MiSeq	Sekwencjonowanie następnej generacji na platformie MiSeq

jest jałowy. Wynikało to z braku możliwości wyhodowania bakterii z tego obszaru. Obecnie, w dobie molekularnej identyfikacji bakterii na podstawie unikalnej sekwencji 16S rRNA okazuje się, że w dolnych drogach oddechowych można wykryć różnorodne bakterie, a gatunki je zasiedlające różnią się od flory górnych dróg oddechowych. Mikrobiom zdrowego człowieka różni się zaś od mikrobiomu chorego na różne choroby układu oddechowego.

W opublikowanych w ostatnich latach pracach poglądowych opisano liczne metody molekularnej identyfikacji mikroorganizmów w płucach (tab. 1). Nie ustalono dotychczas „złotego standardu” wykonywanych badań.

Pierwsze prace badające mikrobiom układu oddechowego pojawiły się w 2010 roku. Początkowo badania koncentrowały się na chorych na mukowiscydozę, astmę oraz na zdrowych ochotnikach palących i niepalących tytoń. W kolejnych latach badano chorych na POChP, chorych po przeszczepieniu płuc, chorych na rozstrzenia oskrzeli oraz ostatnio – na choroby śródmiąższowe.

Badane grupy były zazwyczaj nieliczne. Najczęściej badano pojedynczych chorych z danym rozpoznaniem, a wyniki porównywano z osobami zdrowymi, stanowiącymi grupę kontrolną.

Od samego początku istniały trudności w technice pobrania materiału do badań z dolnego odcinka układu oddechowego. Wymagają one bardziej inwazyjnej techniki (związanej z wykonaniem badania bronchofiberoskopowego i ew. płukania oskrzelowo-płucnego [BAL, bronchoalveolar lavage]) niż wymazy pobierane z górnych dróg oddechowych czy innych okolic ciała badanych w projekcie *Human Microbiome Project*. Ponadto, istnieją trudności w zabezpie-

czeniu materiału z dolnych dróg oddechowych przed kontaminacją florą bakteryjną z jamy ustnej.

Z tego powodu autorzy badający mikrobiom płuc wykorzystywali technikę pobierania materiału z kolejnych odcinków układu oddechowego za pomocą dwóch bronchofiberoskopów: jednym pobierano próbki z jamy ustnej oraz nosowo-gardłowej. Drugi służył do pobrania materiału z dróg oddechowych poniżej krtani za pomocą chronionej szczoteczki oraz wykonania BAL. Każde pobranie materiału było poprzedzone badaniem popłuczyn uzyskiwanych z czyszczenia bronchoskopu, a dodatkowo badano materiał genetyczny bakterii znajdujących się w płynie do płukania bronchoskopu [7].

Ta skomplikowana technika miała na celu zapobieżenie kontaminacji próbek pobieranych z różnych odcinków układu oddechowego. Na podstawie pierwszych badań okazało się, że w dolnych drogach oddechowych można wykryć materiał genetyczny wielu bakterii, oraz że tylko część z tych szczepów występuje zarówno w dolnych, jak i górnych drogach oddechowych [7].

W przełomowych badaniach nad mikrobiomem dolnego odcinka układu oddechowego, opublikowanych w 2011 roku [8] wykonano BAL u zdrowych osób palących ($n = 7$) i niepalących ($n = 3$), u chorych na POChP ($n = 4$) oraz badano mikrobiom w usuniętych podczas transplantacji płucach (u 6 osób), pobierając wycinki z każdego wyciętego płata. Okazało się, na podstawie badania 16S qPCR, że w każdym BAL wykryto materiał genetyczny bakterii, a każda osoba miała inny, właściwy sobie mikrobiom. Najczęściej bakterie należały do rodzajów: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* i *Fusobacteria* i gatunków: *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Fusobacterium* — u ponad 75% badanych, a *Veilonella*, *Haemophilus* i *Porphyromonas* — u ponad 50% badanych. Bakterie te występowały u zdrowych osób palących, niepalących oraz dwóch chorych na umiarkowaną POChP. W materiale pobranym od chorych na ciężką POChP poddanych transplantacji stwierdzono podobne gatunki bakterii jak w BAL, co pozwoliło na wykluczenie kontaminacji związanej z wprowadzeniem bronchoskopu. Wyjątkowym znaleziskiem było stwierdzenie istnienia odrębnego mikrobiomu w wycinkach z poszczególnych płatów płuca u tego samego chorego. W każdej z badanych grup znalazły się osoby ze zmniejszoną różnorodnością występujących bakterii. W kilku przypadkach znaleziono bakterie należące wyłącznie do rodzaju *Proteobacteria* oraz gatunku *Pseudomonas*, które jako pojedyncze występowały u badanych osób [8].

Również Cabrera-Rubio i wsp. [9] w badaniu sześciu chorych na umiarkowaną POChP w stabilnym okresie choroby, bez cech zakażenia, wykazali, że mikrobiom górnych dróg oddechowych badany w płwocinie i aspiracie oskrzelowym różni się od mikrobiomu dolnego drzewa oskrzelowego badanego za pomocą BAL oraz biopsji śluzówki oskrzeli. Mikrobiom w próbkach z dolnych partii drzewa oskrzelowego wykazywał większą różnorodność w porównaniu z próbkami z górnych dróg oddechowych, a bakterie najczęściej należały do rodzajów *Proteobacteria*, *Bacteroidia*, *Actinobacteria* i *Firmicutes*, opisywanych u osób zdrowych. W badanych próbkach najczęściej występowały bakterie z rodziny *Streptococcus*, *Prevotella*, *Fusobacterium* i *Neisseria*, również opisywane u osób zdrowych, natomiast nadmiernie reprezentowane były *Moraxella*, *Haemophilus* (należące do rodzaju *Proteobacteria*) oraz *Acinetobacter* charakterystyczne dla chorych na POChP.

Kolejne istotne wielośrodkowe badania wykonano w ramach projektu NHLBI w dużej grupie 64 zdrowych osób palących i niepalących [10]. Porównywano mikrobiom jamy ustnej z mikrobiomem płuc. Sekwencjonowanie DNA wykonywano na podstawie primerów dla 2 czułych regionów V1-3 oraz V3-5. Starano się uzyskać próbki z dolnych dróg oddechowych z uniknięciem kontaminacji z jamy ustnej. Wykazano, że poza wspólną dla górnego i dolnego odcinka dróg oddechowych florą bakteryjną, istnieją bakterie zasiedlające wyłącznie dolne drogi oddechowe, których obecności nie wykazano w górnych drogach oddechowych. Na florę bakteryjną w jamie ustnej, w odróżnieniu od płuc, wpływ wywierał nałóg palenia. Mikrobiom jamy ustnej był różny u osób palących i niepalących [10].

Badania Hilty i wsp. [11] przeprowadzone u 43 osób wykazały obecność ponad 5 tysięcy sekwencji bakteryjnego 16S rRNA. Drzewo oskrzelowe nie było sterylne i zawierało przeciętnie ponad 2 tysiące genomów bakterii na centymetr kwadratowy badanej powierzchni. Chorzy na astmę i POChP mieli znacznie więcej materiału genetycznego bakterii z rodzaju *Proteobacteria* (a zwłaszcza *Haemophilus spp*) w porównaniu ze zdrowymi osobami. Z kolei badania Huang i wsp. [12] wyodrębniły gatunki bakterii związane z nadreaktywnością oskrzeli w astmie.

Bardzo ciekawa praca dotycząca 8 chorych na POChP badanych w trakcie ciężkiego zaostrzenia choroby wymagającego mechanicznej wentylacji i antybiotykoterapii wykazała różne ilości materiału genetycznego bakterii u poszczególnych chorych [13]. Znalezione bakterie będące

znanymi patogenami, chociaż poprzednio nie były wiązane z POChP. U wszystkich chorych wykazano 75 szczepów bakterii stanowiących wspólny „rdzeń”, a należących do 27 rodzin bakterii. Do rdzennych bakterii należały między innymi *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Campylobacteraceae* i *Helicobacteraceae*. Ponadto, u wszystkich wykryto bakterie o potencjale patogennym: *Arcobacter cryaerophilus*, *Brevundimonas diminuta*, *Leptospira interrogans* oraz *P. aeruginosa*. Wydaje się, że u takich chorych zakażenie ma charakter wieloszczepowy, a mimo stosowania antybiotyków, w dolnych drogach oddechowych nadal można wykryć wiele gatunków bakterii za pomocą badań molekularnych.

W innej pracy badającej ilościowe występowanie bakterii oraz różnorodność mikrobiomu na podstawie badań molekularnych wycinków płuc pobranych operacyjnie od osób palących, niepalących, chorych na ciężką postać POChP oraz chorych na mukowiscydozę (w każdej grupie było 8 osób) stwierdzono, że liczebność bakterii była największa w mukowiscydozie, przy jednoczesnej najmniejszej różnorodności flory bakteryjnej w tej grupie chorych [14].

Liczne rodziny bakterii zostały wykryte w płwocinie chorych na mukowiscydozę w okresie zaostrzenia choroby za pomocą badań molekularnych całkowitego DNA. Co ciekawe, dotyczyło to zwłaszcza bakterii beztlenowych [15].

Pojawiło się kilka prac nad mikrobiomem występującym w płucach usuniętych podczas przeszczepiania. Okazało się, że w różnych lokalizacjach jednego płuca może występować odmienna flora bakteryjna [8]. Inne badania dotyczyły mikrobiomu przeszczepów [16]. Okazało się, że w BAL wykonywanym w przeszczepionych płucach znajdowano więcej kopii bakteryjnego 16S rRNA w porównaniu z BAL u osób zdrowych, oraz że te zwiększone ilości bakterii występowały niezależnie od pierwotnego rozpoznania kwalifikującego do przeszczepienia. Stałym zjawiskiem było jednak zmniejszenie różnorodności flory bakteryjnej występującej w przeszczepieniach [16].

Kolejne badania rozszerzono o inne choroby układu oddechowego. Badano mikrobiom chorych na gruźlicę, rozstrzenie oskrzeli, choroby śródmiąższowe.

W badaniu 22 chorych na gruźlicę wykryto metodą sekwencjonowania 16S rRNA materiał genetyczny prątków ale również licznych bakterii z rodziny *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria* i innych, podobnie jak u 14 zdrowych osób. Te 5 rodzajów bakterii stanowiły ponad 98% mikrobiomu.

U chorych przeważały *Proteobacteria* i *Bacteroidetes*, a u zdrowych *Firmicutes*. Względna różnorodność flory bakteryjnej chorych i zdrowych była podobna. We wnioskach autorzy zwracają uwagę na możliwy wpływ mikroflory na patogenезę i rozwój gruźlicy oraz na potencjalną ich rolę w leczeniu [17].

Badanie mikrobiomu chorych na rozstrzenie oskrzeli wykazało brak różnic w różnorodności szczepów zasiedlających płuca w okresie stabilnym i podczas zaostrzenia. W pracy tej zbadano 40 chorych w stanie stabilnym i 14 w okresie zaostrzenia, wykonując jednocześnie hodowlę plwociny w kierunku bakterii tlenowych i beztlenowych oraz badanie genetyczne. Najczęstszymi wyhodowanymi bakteriami były: *Pseudomonas aeruginosa* (n = 10 chorych), *Haemophilus influenzae* (n = 12), *Prevotella* (n = 18) i *Veillonella* (n = 13). Za pomocą pirosekwencjonowania wykryto ponad 150 000 sekwencji, reprezentujących 113 określonych mikroorganizmów. Dużą zgodność między wynikami obu metod stwierdzono dla wyhodowanych bakterii tlenowych (np. *P. aeruginosa*), a gorsze dla bakterii beztlenowych, które wykrywano przede wszystkim za pomocą sekwencjonowania. Leczenie zaostrzenia choroby antybiotykami nie wpłynęło na liczbę mikroorganizmów, zaobserwowano niewielkie zmiany w dystrybucji mikroorganizmów. Autorzy sugerują, że zmiany w składzie mikrobiomu nie wpływają na zaostrzenie procesu zapalnego u chorych na rozstrzenie oskrzeli [18].

Dotychczas ukazała się jedna publikacja opisująca mikrobiom w chorobach śródmiąższowych [19]. Zbadano wymazy z nosogardła oraz BAL u 18 chorych (5 na samoistne włóknienie płuc, 5 na inne choroby śródmiąższowe [choroby tkanki łącznej, choroby zawodowe, kwasochłonne zapalenie płuc] i 6 na sarkoidozę) oraz u dwóch grup kontrolnych: 6 chorych z zaburzeniami immunologicznymi i pneumocystozowym zapaleniem płuc oraz 9 zdrowych osób. Wykluczono osoby z niedawnym zakażeniem układu oddechowego, HIV-pozytywne oraz leczone antybiotykami. Badanie molekularne polegało na ultra-głębokim sekwencjonowaniu genu *16S rRNA*. U większości (90%) badanych stwierdzono *Prevotellaceae*, *Streptococcaceae* i *Acidaminococcaceae*, bez istotnych różnic w pięciu badanych grupach. U 7 osób stwierdzono istotne zróżnicowanie flory bakteryjnej w górnych i dolnych drogach oddechowych, co według autorów może pomóc w leczeniu indywidualnych pacjentów [19].

Ostatnio przeprowadzone badania u osób starszych, rezydentów domów opieki zdrowotnej,

wykazały wyraźny zanik różnic między składem flory bakteryjnej znajdującą się w przedniej części nosa oraz w nosogardle, w odróżnieniu do istotnych różnic występujących u zdrowych osób dorosłych [20]. Taka dysbioza może usposabiać w opinii autorów do częstszych zakażeń układu oddechowego obserwowanych u osób starszych.

W badaniach 9 chorych na POChP i 9 osób zdrowych, Zakharkina i wsp. [21] wykazali dużą liczebność i indywidualną różnorodność szczepów bakteryjnych zasiedlających układ oddechow. Wynik badania drzewa filogenetycznego wskazywał jednak na istnienie podstawowego mikrobiomu u wszystkich badanych oraz szczepów bakterii występujących wyłącznie u zdrowych lub wyłącznie u chorych.

Molyneaux i wsp. [22] badali skład mikrobiomu u zdrowych i chorych na POChP po laboratoryjnym zakażeniu wirusem RSV. Okazało się, że skład mikrobiomu nie zmienił się u zdrowych podczas 42 dni obserwacji, natomiast u chorych po 15 dniach od zakażenia doszło do wzrostu rodziny *Proteobacteria*, co może tłumaczyć skłonność do zakażenia bakteryjnego po infekcji wirusowej w POChP.

Ciekawą obserwację przedstawili Biesbroek i wsp. [23] obserwujący zmiany w składzie mikrobiomu niemowląt zaszczepionych skonjungowaną siedmiowalentną szczepionką przeciwko pneumokokom. Okazało się, że po 12 miesiącach od szczepienia, w mikrobiomie dzieci zaszczepionych (n = 97) zmniejszył się udział szczepów pneumokoków o te zawarte w szczepionce, natomiast zwiększył się udział szczepu *Haemophilus*, w porównaniu z nieszczepionymi (n = 101). Zmiany te utrzymywały się do 24 miesięcy po szczepieniu, nie były już jednak tak silnie wyrażone. Badania te zwracają uwagę na fakt, że wszelkie interwencje medyczne mogą zaburzyć chwiejną równowagę mikrobiomu człowieka.

W miarę postępu wiedzy na temat znaczenia metagenomu człowieka i jego wzajemnych interakcji zaczęły powstawać hipotezy wiążące choroby, zarówno infekcyjne, jak i nieinfekcyjne oraz przewlekłe, z równowagą istniejącą między organizmem ludzkim i zasiedlającymi je drobnoustrojami. Nieznane jest dotychczas pochodzenie mikrobiomu układu oddechowego. Źródłami kolonizacji płuc może być otaczające środowisko, bakterie przewodu pokarmowego oraz nosogardła. W stanie zdrowia istnieje duża różnorodność flory bakteryjnej zapewniająca homeostazę. W chorobie dochodzi natomiast do zmniejszenia tej różnorodności i zaburzeń proporcji między poszczególnymi gatunkami bakterii. Zazwyczaj

wzrasta ilość bakterii rodzaju *Proteobacteriaceae*. W astmie i POChP obserwuje się również zwiększenie proporcji gatunku *Streptococcus* z rodzaju *Firmicutes* [24].

Podsumowanie

Do niedawna sądzono, że dolne drogi oddechowe człowieka są jałowe. Badania ostatnich lat niewątpliwie podważają takie stanowisko. Za pomocą badań molekularnych znaleziono w dolnych płucach zdrowych ludzi geny wielu różnorodnych rodzin bakterii. Większość z nich była dotychczas niedostępna dla hodowli, a niektóre z nich były nieznanne. Badania wskazują również, że mikrobiom chorych różni się istotnie od osób zdrowych, oraz że odgrywa on istotną rolę w wielu chorobach przewlekłych o etiologii, jak dotychczas sądzono, niezapalnej. Prowadzenie dalszych badań nie tylko nad składem mikrobiomu, ale również badań eksperymentalnych może istotnie wpłynąć na inne spojrzenie na etiologię i patogenezę wielu chorób. Ta nowa dziedzina nauki może mieć przełomowe znaczenie dla leczenia wielu chorób cywilizacyjnych.

Konflikt interesów

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów.

Piśmiennictwo

1. Salyers A.A., Whitt D.D. Wprowadzenie do chorób zakaźnych. W: Markiewicz Z. (red.). Mikrobiologia. Różnorodność, chorobotwórczość i środowisko.
2. Turnbaugh P.J., Ley R.E., Hamady M. i wsp. The human microbiome project. *Nature* 2007; 449: 804–810.
3. NIH „Human Microbiome Project” The NIH Common Fund. Division of Program Coordination, Planning and Strategic Initiatives, <http://commonfund.nih.gov/hmp/overview>; 16.09.2014.
4. Qin J., Li R., Raes J. i wsp. MetaHIT Consortium. A human gut microbial catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010; 464: 59–65 (4 March 2010) doi: 10.1038/nature08821.
5. Lung HIV Microbiome Website. George Washington University Biostatistic Center, <https://lhmp.bsc.gwu.edu/>; 16.09.2014.
6. Martinez F.J., Erb-Downward J.R., Huffnagle G.B. Significance of the microbiome in chronic obstructive pulmonary disease. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 2013; 10 (supl): S170-179.
7. Charlson E.S., Bittinger K., Haas A.R. i wsp. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2011; 184: 957–963.
8. Erb-Downward J.R., Thompson D.L., Han M.K. i wsp. Analysis of the lung microbiome in the “healthy” smoker and in COPD. *PLoS One.* 2011; 6: e16384.
9. Cabrera-Rubio R., Garcia-Núñez M., Setó L. i wsp. Microbiome diversity in the bronchial tracts of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50: 3562–3568.
10. Morris A., Beck J.M., Schloss P.D. i wsp. Lung HIV Microbiome Project. Comparison of the respiratory microbiome in healthy nonsmokers and smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2013; 187: 1067–1075.
11. Hilty M., Burke C., Pedro H. i wsp. Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS ONE* 5: e8578.
12. Huang Y.J., Nelson C.E., Brodie E.L. i wsp. Airway microbiota and bronchial hyperresponsiveness in patients with sub-optimally controlled asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011; 127: 372–381.
13. Huang Y.J., Kim E., Cox M.J. i wsp. A persistent and diverse airway microbiota present during chronic obstructive pulmonary disease exacerbations. *OMICS* 2010; 14: 9–59.
14. Sze M.A., Dimitriu P., Hayashi S. i wsp. The lung tissue microbiome in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2012; 185: 1073–1080.
15. Twomey K.B., Alston M., An S.Q. i wsp. Microbiota and metabolite profiling reveal specific alterations in bacterial community structure and environment in the cystic fibrosis airway during exacerbation. *PLoS One.* 2013;8:e82432.
16. Charlson E.S., Diamond J.M., Bittinger K. i wsp. Lung-enriched organisms and aberrant bacterial and fungal respiratory microbiota after lung transplant. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012; 186: 536-545.
17. Cheung M.K., Lam W.Y., Fung W.Y. i wsp. Sputum microbiota in tuberculosis as revealed by 16S rRNA pyrosequencing. *PLoS One.* 2013; 8: e54574.
18. Tunney M.M., Einarsson G.G., Wei L. i wsp. Lung microbiota and bacterial abundance in patients with bronchiectasis when clinically stable and during exacerbation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2013; 187: 1118–1126.
19. Garzoni C., Brugger S.D., Qi W. i wsp. Microbial communities in the respiratory tract of patients with interstitial lung disease. *Thorax* 2013; 68: 1150–1156.
20. Whelan F.J., Verschoor C.P., Stearns J.C. The loss of topography in the microbial communities of the upper respiratory tract in the elderly. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 2014; 11: 513–521.
21. Zakharkina T., Heinzel E., Koczulla R.A. i wsp. Analysis of the airway microbiota of healthy individuals and patients with chronic obstructive pulmonary disease by T-RFLP and clone sequencing. *PLoS One.* 2013 Jul 9; 8: e68302.
22. Molyneaux P.L., Mallia P., Cox M.J. i wsp. Outgrowth of the bacterial airway microbiome after rhinovirus exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2013; 188: 1224–1231.
23. Biesbroek G., Wang X., Keijsers B.J. i wsp. Seven-valent pneumococcal conjugate vaccine and nasopharyngeal microbiota in healthy children. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20: 201–210.
24. Marsland B.J., Yadava K., Nicod L.P. The airway microbiome and disease. *Chest* 2013; 144: 632–637.