

La microbiota de la vía aérea inferior

EDUARDO GARCÍA-PACHÓN

Servicio de Neumología, Hospital General Universitario de Elche.
Departamento de Medicina Clínica, Universidad Miguel Hernández de Elche.

eduardo.garciap@umh.es

RESUMEN

La microbiota (o microbioma) es el conjunto de todos los microorganismos que ocupan un hábitat determinado. La identificación de estos microorganismos es posible por los métodos de secuenciación masiva del ADN microbiano de las muestras. Aunque se consideraba que la vía aérea inferior era un territorio estéril, se ha demostrado la presencia de bacterias incluso en los individuos sanos. La llegada de microorganismos a la vía aérea se produce ya intraútero a través de la placenta, y se modifica después con las distintas exposiciones (como alimentos o el uso de antibióticos). Se han realizado múltiples estudios de la microbiota en distintas enfermedades respiratorias, sobre todo en la EPOC, el asma o la fibrosis quística, con descripciones de sus características en función de la gravedad, de la situación clínica o de los cambios con los tratamientos. El análisis de la microbiota ha constituido una nueva aproximación conceptual a la complejidad de las poblaciones microbianas y sus relaciones, con importantes datos sobre su papel en la inmunidad y en la susceptibilidad a enfermedades en el huésped. El conocimiento de la microbiota y la posibilidad de intervenir en ella abren nuevas expectativas en la prevención y el tratamiento de las enfermedades respiratorias.

Palabras clave: Microbioma, microbiota, secuenciación masiva, vía aérea.

Microbiota: concepto e identificación

La microbiota es el conjunto de todos los microorganismos que ocupan un hábitat determinado. Puede hablarse, por ejemplo, de la microbiota orofaríngea o de la microbiota de esputo. También se utiliza el término microbioma como sinónimo de microbiota, aunque etimológicamente el microbioma se refiere al conjunto de genes de estos mi-

croorganismos. Estos términos incluyen a todos los microorganismos de una localización (hongos, virus, bacterias y arqueas) pero por cuestiones de desarrollo tecnológico y probablemente por interés clínico, la mayoría de los estudios se han centrado en el análisis de bacterias, aunque en los últimos años está empezando a investigarse al resto de la microbiota.

La microbiota humana es, por tanto, el conjunto de microorganismos que se encuentran de manera normal en el

cuerpo humano y la microbiota de la vía aérea inferior la constituyen los microorganismos en este territorio. Nuestro cuerpo contiene diez veces más células bacterianas que células humanas, y esta proporción es mayor cuando hablamos de material genético; hay cien veces más genes microbianos que humanos¹. Sólo nuestro intestino contiene unas 1.000 especies bacterianas diferentes^{1,2}.

La gran mayoría de los gérmenes no pueden identificarse con las técnicas convencionales del laboratorio de microbiología, por lo que no ha podido determinarse la verdadera población bacteriana en las distintas localizaciones hasta disponer de las técnicas de secuenciación masiva y su análisis bioinformático. Aunque los métodos para el estudio de la microbiota evolucionan con gran rapidez, la base de su funcionamiento se mantiene: consiste primero en definir las muestras adecuadas que se quieren estudiar, después generar las secuencias que deben estudiarse tras extraer el ADN bacteriano y finalmente comparar las secuencias obtenidas con las existentes en las bases de datos lo que permite la identificación taxonómica³.

En la práctica clínica a partir de los métodos microbiológicos clásicos se suele clasificar a los microbios en términos de género y especie. En el estudio de secuenciación genética la diferencia de taxones se basa en características filogenéticas del ADN. Aunque suele permitir la identificación con las clasificaciones clínicas aceptadas, puede tener excepciones. Así, por ejemplo, *Haemophilus influenzae* (patógeno) no es distinguible de *H. heamolyticus* (comensal) por el análisis de su secuencia genética del 16S rRNA que es la que suele utilizarse para identificar a las bacterias.

La vía aérea no es estéril

En el año 2007 se puso en marcha el proyecto de estudio del microbioma humano por los Institutos Nacionales de la Salud de Estados Unidos. El proyecto pretendía identificar el microbioma de las distintas localizaciones del cuerpo y no incluyó la vía aérea. Sin embargo, el estudio de la microbiota respiratoria ha recibido posteriormente un creciente interés.

Se había afirmado durante décadas en los textos clásicos que la vía aérea inferior era un espacio sin gérmenes⁴; a pesar de que desde hace años se ha descrito el crecimiento en

cultivo de microorganismos aislados en los bronquios y la existencia de microaspiraciones en pacientes respiratorios e incluso en individuos sanos^{2,5}. Ahora, con el uso de técnicas de identificación bacteriana independientes de los métodos de cultivo se ha demostrado la existencia de gérmenes incluso cuando los cultivos son negativos⁶.

El estudio de la microbiota puede aportar información muy compleja que a veces es difícil presentar como respuesta a preguntas clínicas concretas. Va más allá de identificar gérmenes potencialmente patógenos. Las interacción de comunidades complejas de bacterias tiene efectos en la virulencia de determinados gérmenes que requieren una nueva interpretación de las estructuras microbiológicas.

Algunos conceptos relacionados con la información que se desprende de la investigación en microbiota deben incluirse en la aproximación a estos temas. Además de la identificación taxonómica de los microorganismos, los estudios de microbiota proporcionan datos de la abundancia relativa de los gérmenes, e incluyen términos como riqueza, uniformidad o dominio (en la tabla I se describen términos usados en el estudio de la microbiota útiles para los médicos clínicos).

La composición de la microbiota de la vía aérea inferior viene definida por tres factores⁷: (1) la migración bacteriana al interior de la vía aérea, (2) la eliminación de las bacterias y (3) la reproducción de los distintos componentes bacterianos en el territorio en función de las características favorecedoras locales. Estas condiciones cambian significativamente en las situaciones de enfermedad, tanto agudas como crónicas. Como consecuencia, variará la composición de los componentes de la microbiota en la región.

La microbiota pulmonar se parece a la microbiota orofaríngea, lo que permite afirmar que ésta es la principal fuente de los gérmenes de la vía aérea inferior por las frecuentes microaspiraciones documentadas en individuos sanos y que son más frecuentes en diversas enfermedades respiratorias^{8,9}. Es difícil definir la microbiota bronquial de individuos sanos por el posible efecto de la contaminación de la vía superior. No obstante, parece que la microbiota de la vía aérea inferior depende fundamentalmente de la microbiota de la orofaringe¹⁰. La vía aérea de los individuos sanos tiene poca carga bacteriana, pero se detectan gérmenes que habitualmente asociamos al concepto de patógenos, como

Disbiosis. Alteración del equilibrio de los microbios presentes en un determinado hábitat por un cambio de las condiciones.

Dominio o dominancia. Grado en que una o más especies es numéricamente dominante dentro de una microbiota.

Uniformidad. Grado en que las especies presentes están en igual abundancia.

Resiliencia. Capacidad de una comunidad bacteriana de volver a su situación previa tras haber sido alterada (por enfermedad, fármacos, etc).

Riqueza. Número de taxones presentes en una muestra para un determinado nivel filogenético.

OTU (*Operational taxonomic unit*). Unidad taxonómica operativa: unidad de clasificación seleccionada para realizar la evaluación de la microbiota. Por ejemplo, pueden agruparse en la misma OTU las muestras que tengan un nivel de igualdad de secuencias del 97%.

Taxón. Categoría de agrupación de organismos emparentados, como géneros o especies.

Tabla I: Significado de los términos asociados a los estudios de microbiota.

Pseudomonas, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Haemophilus*, *Veillonella* y *Porphyromonas*^{11,12}. En condiciones de enfermedad respiratoria, la mayoría de los estudios han mostrado que se produce un aumento del número de especies (mayor riqueza), con frecuencia con un cambio de dominio desde el phylum Bacteroidetes (que predomina en el pulmón sano) al phylum Proteobacteria⁴.

Biogeografía de la vía aérea inferior

La vía aérea inferior no es un territorio homogéneo en las condiciones ambientales que influyen en el desarrollo de las comunidades microbianas. El pH, la temperatura, la tensión de oxígeno, las características físico-químicas de la secreción intraluminal o la disponibilidad de nutrientes es diferente en las zonas superiores e inferiores de los pulmo-

nes^{4,13}. Otros factores, como la facilidad de acceso de los microbios de la vía aérea superior en las microaspiraciones o la mayor o menor facilidad para su expulsión con la tos son también importante en las diferencias topográficas de los gérmenes en el sistema bronquial^{12,13}. Por tanto es de esperar que las diferentes poblaciones microbianas sean reflejo de distintas características físico-químicas locales que dan lugar a microhábitats. Para investigar esta posibilidad, Dickson et al.¹⁰ compararon la microbiota en diversas zonas pulmonares (superiores comparadas con inferiores y unos lóbulos con los contralaterales) y concluyeron que la variación intraindividual de la microbiota es inferior a la variación interindividual, que la microbiota de los lóbulos superiores es más parecida a la que se encuentra en la vía aérea superior que la situada en los lóbulos inferiores y la riqueza disminuye con la distancia desde la vía alta. Todo lo cual les hace concluir que los mecanismos de migración y eliminación predominan sobre los efectos locales físico-químicos de crecimiento.

Factores que favorecen la migración microbiana

- Microaspiración
- Posición supino
- Fármacos (inhibidores de la bomba de protones)
- Inhalación de bacterias
- Dispersión directa en las mucosas

Factores que favorecen la eliminación microbiana

- Tos
- Aclaramiento mucociliar
- Defensa celular e inmunitaria

Condiciones de crecimiento local

- Presión de oxígeno
- Temperatura
- pH
- Nutrientes disponibles
- Competencia local con otros microorganismos
- Interacciones con las células epiteliales

Tabla II
Determinantes de la microbiota en la vía aérea.

Microbiota respiratoria en el nacimiento y la infancia

El ambiente intrauterino que rodea al feto estaba considerado un espacio estéril. Sin embargo, se ha descrito la presencia de bacterias en la placenta, las membranas fetales y el líquido amniótico en nacimientos de niños sanos¹⁴. Existen datos para suponer que ya intraútero el feto tiene una cierta carga bacteriana en su vía aérea. La microbiota respiratoria es similar en los recién nacidos con independencia de la vía del parto (vaginal o cesárea) y de la edad gestacional, lo que sugiere que esta microbiota se adquiere intraútero, a diferencia de la intestinal que sí se afecta por estos factores. Sí que muestra diferencia la microbiota de la vía aérea de los recién nacidos con muy bajo peso que desarrollan displasia broncopulmonar comparados con los de peso similar que no la desarrollan¹⁵. También los recién nacidos que desarrollan displasia broncopulmonar al igual que los que tienen infección del líquido amniótico tienen menores poblaciones de *Lactobacillus*, lo que hace suponer que este microorganismo tiene un papel protector o de reflejo de buen estado de salud en los recién nacidos¹⁵.

Los microbios tienen una importante función en la respuesta inmune de la mucosa de la vía aérea y existe una comunicación bidireccional entre la microbiota y los tejidos subyacentes que interviene en la inmunidad¹⁶. En modelos animales, la exposición en la vía aérea de cepas no patógenas de *Escherichia coli* resultaba en protección frente a la respuesta alérgica¹⁷. También en humanos, la presencia de determinados microorganismos en la vía aérea en las primeras semanas de vida se asocia a hiperreactividad bronquial, mientras que no ocurre si su presencia tiene lugar pocos meses después¹⁸. Sin embargo, la asociación de alteraciones respiratorias y microbiota no se limita a la población bacteriana en la vía aérea. Existe un eje intestino-pulmonar por el que cambios en la microbiota intestinal dan origen a respuesta inmunológica diferente que se distribuye por todo el organismo con las poblaciones linfocitarias y que a nivel pulmonar se ha asociado con el riesgo de desarrollo de características atópicas¹⁴. Un ejemplo es que la presencia de *Helicobacter pylori* en el estómago en niños se asocia con menor diversidad del microbioma intestinal y a un mayor riesgo de asma, rinitis alérgica y eosinofilia periférica¹⁹. Es conocido el papel de exposiciones en la infancia y riesgo de asma en estudios epidemiológicos; los estudios del micro-

bioma intestinal han aportado datos que indican que una exposición precoz a determinadas bacterias contribuye a la maduración del sistema inmune.

Asma y atopia

Diversos estudios han mostrado que la microbiota puede jugar un papel tanto en la promoción como en la protección para el desarrollo de asma. En los adultos con asma la microbiota de la vía aérea tiene una elevada carga bacteriana²⁰. Sin embargo, todavía hay que dilucidar si la disbiosis en estos pacientes es debida a una susceptibilidad de los asmáticos a colonizarse por determinadas bacterias o si esa determinada microbiota influye directamente en el desarrollo de la respuesta inflamatoria¹². Sí hay evidencia de que la exposición a antibióticos en la primera infancia se asocia al mayor riesgo de desarrollo de asma²¹ y la exposición a ambientes con riqueza microbiana disminuye este riesgo²², lo que podría implicar que una disbiosis precoz puede alterar el equilibrio microbiano y favorecer el crecimiento de gérmenes implicados en este proceso.

La microbiota de esputo de los pacientes con asma es claramente diferente a la de los individuos sin asma. Los pacientes con asma, en general, tenían reducidas las poblaciones de Bacteroidetes y Fusobacteria. Proteobacteria era más frecuente en pacientes con asma no grave comparados con los controles, y Firmicutes (en especial *Streptococcus*) estaba incrementado en los pacientes con asma grave al compararlos con los controles²³. En los pacientes corticoides parece existir una microbiota diferente con aumento de determinados bacilos gram-negativos²⁴.

EPOC

En pacientes con EPOC se han realizado diversos estudios para intentar evaluar la relación de los patrones microbiológicos y las características inflamatorias, clínicas y funcionales. Los estudios de secuenciación masiva han permitido identificar una gran diversidad de géneros que no pueden detectarse en los cultivos convencionales²⁵. La microbiota en los pacientes con enfermedad leve o moderada tiene menor carga bacteriana pero mayor diversidad que la de los pacientes con EPOC intensa²⁵⁻²⁷. Estos hallazgos están más

en relación con la presencia de la enfermedad que con el tabaquismo, que parece afectar poco la microbiota de la vía aérea inferior^{9,11}.

Varios estudios han coincidido en que los pacientes con EPOC muestran una microbiota que difiere de la del individuo sano, aunque con resultados contradictorios en la riqueza y variedad¹¹. Estas diferencias pueden explicarse por los distintos grados de afectación o por el uso de fármacos. Por ejemplo, los corticoides inhalados han sido implicados en el cambio de las comunidades microbianas con aumento de la riqueza de la mayoría de los gémenes²⁸.

Las exacerbaciones en los pacientes con EPOC se asocian a un cambio en la diversidad microbiana y un aumento de la proporción de Proteobacteria²⁸⁻³⁰. Además se ha descrito una proliferación de *Moraxella*³⁰, que es un patógeno que estimula la inflamación en la vía aérea. En la exacerbación en pacientes intubados el aspirado traqueal ha mostrado una gran diversidad interindividual en la riqueza de la microbiota³¹. La aparición en la exacerbación parecía asociarse a la aparición de determinados gémenes considerados como patógenos (con independencia de la colonización previa por *Pseudomonas*)²⁹. También se ha descrito la detección, con métodos indirectos, de cambios en la función metabólica de las poblaciones microbianas durante las agudizaciones de la EPOC³².

Huang *et al.*²⁸ y Wang *et al.*³⁰ estudiaron los esputos expectorados por pacientes con EPOC antes de la exacerbación, durante la exacerbación y tras la recuperación después de haber sido tratados con diversos fármacos. Observaron que en la agudización había una mayor riqueza de la microbiota, con identificación de bacterias tanto las habitualmente asociadas a esta enfermedad como de otros gémenes, pero con depleción de otras bacterias que en estudios funcionales están asociadas a la producción de compuestos antiinflamatorios.

El tratamiento de la exacerbación alteraba la microbiota pulmonar y, como consecuencia, la microbiota de esputo era diferente en función del tipo de fármaco empleado. En pacientes tratados sólo con corticoides se produce una reducción en la diversidad microbiana y un aumento de la ratio Proteobacteria:Firmicutes, mientras que ocurre lo contrario en los pacientes que reciben antibióticos^{28,30}. En los tratados con ambos fármacos había un efecto interme-

dio, pero parecía predominar el efecto depletivo de los antibióticos. En los tratados sólo con antibióticos había una persistencia de la disminución de los gémenes, mientras que en los otros grupos se producía una estabilización o una recuperación con vuelta a la situación previa a la exacerbación.

Se ha observado la existencia de dos patrones microbianos diferentes, uno asociado a la exacerbación bacteriana y otro a la exacerbación eosinofílica. Las exacerbaciones víricas parecen tener un perfil microbiótico mixto. La presencia o ausencia de inflamación eosinofílica puede ser un potencial biomarcador para la estratificación del microbioma subyacente asociado³⁰.

También se ha sugerido que un incremento de *Haemophilus* y posiblemente otras Proteobacteria actúa como un punto de inicio especial que puede modificar el ecosistema normal microbiano de la vía aérea hacia un estado de disbiosis que favorece una respuesta proinflamatoria³⁰.

La microbiota en otras enfermedades respiratorias

Fibrosis quística. Como ocurre en otros procesos respiratorios crónicos, en la vía aérea de pacientes con fibrosis quística existe una gran diversidad de géneros bacterianos incluidos gémenes anaerobios. En un estudio longitudinal de microbiota de esputo se ha descrito que la reducción en la diversidad bacteriana se asocia con la progresión de la enfermedad y la colonización de la vía aérea por patógenos³³. Sin embargo, varios estudios han mostrado que la microbiota bronquial en estos pacientes es bastante estable, con pocos cambios en las exacerbaciones o como respuesta a los tratamientos^{34,35} y que aunque los antibióticos pueden disminuir la carga de *Pseudomonas* las comunidades microbianas vuelven a su situación previa a los pocos días de haber empezado el fármaco³⁶.

Fibrosis pulmonar idiopática. En los pacientes con fibrosis pulmonar idiopática se ha observado que una carga bacteriana más elevada predice el mayor deterioro de la función pulmonar y se asocia a un aumento de la mortalidad³⁷.

HIV. En pacientes con infección por VIH se ha descrito una gran abundancia de *Tropheryma whippelii*³⁸ lo que podría

ser característico de estos pacientes. El tratamiento antirretroviral tiene un efecto en la microbiota modificando sus características^{38,39}.

Bronquiectasias. La microbiota en pacientes con bronquiectasias no debidas a fibrosis quística es muy diversa y compleja, y existe una correlación entre la función pulmonar y la riqueza de especies en estos pacientes⁴⁰. En pacientes con bronquiectasias se ha señalado que la complejidad de la comunidad microbiana no cambia durante las exacerbaciones⁴¹. Asimismo se ha propuesto que los pacientes con una abundancia relativa de *Pseudomonas* o *Veillonella* tienen más probabilidades de sufrir una exacerbación que los pacientes que muestran abundancia de *Haemophilus*⁴² y que la clasificación de estos pacientes en función de las características taxonómicas de su población bacteriana, permite establecer grupos pronósticos más útiles que otros criterios microbiológicos convencionales⁴².

El futuro del estudio de la microbiota respiratoria

El análisis de la microbiota ha constituido una nueva aproximación conceptual a la complejidad de las poblaciones microbianas y sus relaciones, aunque es todavía difícil extraer implicaciones de aplicación clínica inmediata. Definir la microbiota normal y los estados de disbiosis y cómo estos influyen en los procesos respiratorios debe ser el resultado de integrar la multitud de estudios que se están realizando. Pero los hallazgos del probable papel de algunos gérmenes o sus asociaciones, la distinta respuesta a los fármacos y el comportamiento dinámico de las poblaciones microbianas abren expectativas para la mejor comprensión de las enfermedades respiratoria y la posibilidad de intervenir en ellas. Se espera que un mejor conocimiento de la microbiota de la vía aérea inferior aporte importantes bases para el tratamiento y la prevención de las enfermedades respiratorias¹⁶.

Hay pasos, ya iniciados, que pueden tener una clara influencia clínica, al definir con nuevas técnicas no ya qué gérmenes están presentes sino qué están haciendo estos gérmenes, con el análisis de la transcripción de genes (transcriptómica), las proteínas que se producen (proteómica) y la actividad metabólica (metabolómica). El estudio metagenómico (del ADN completo, no limitado a determinados fragmen-

tos) es uno de los aspectos más prometedoras con aplicaciones clínicas y epidemiológicas ya en curso⁴³.

El análisis de la microbiota, la comprensión de sus implicaciones y la posibilidad de intervenir en ella han supuesto un enorme avance en el conocimiento de nuestro organismo y su compleja interrelación con el medio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010; 464:59-65.
2. Segal LN, Rom WN, Weiden MD. Lung microbiome for clinicians. New discoveries about bugs in healthy and diseased lungs. *Ann Am Thorac Soc* 2014; 11:108-116.
3. Rogers GB, Shaw D, Marsh RL, et al. Respiratory microbiota: addressing clinical questions, informing clinical practice. *Thorax* 2015; 70:74-81.
4. Dickson RP, Huffnagle GB. The lung microbiome: new principles for respiratory bacteriology in health and disease. *PLoS Pathog* 2015; 11:e1004923.
5. Cvejic L, Harding R, Churchward T, et al. Laryngeal penetration and aspiration in individuals with stable COPD. *Respirology* 2011;16: 269-275.
6. Charlson ES, Bittinger K, Hass AR, et al. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184:957-963.
7. Dickson RP, Martínez FJ, Huffnagle GB. The role of the microbiome in exacerbations of chronic lung diseases. *Lancet* 2014; 384:691-702.
8. Bassis CM, Erb-Downward JR, Dickson RP, et al. Analysis of the upper respiratory tract microbiotas as the source of the lung and gastric microbiotas in healthy individuals. *MBio* 2015; 6:e00037.
9. Morris A, Beck JM, Schloss PD, et al. Lung HIV Microbiome Project. Comparison of the respiratory microbiome in healthy non-smokers and smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 187:1067-1075.
10. Dickson RP, Erb-Downward JR, Freeman CM, et al. Spatial variation in the healthy human lung microbiome and the adapted island model of lung biogeography. *Ann Am Thorac Soc* 2015; 12:821-830.
11. Aho VTE, Pereira PAB, Haahtela T, Pawankar R, Auvinen P, Koskinen K. The microbiome of the lower human airways: a next generation sequencing perspective. *World Allergy Organizat J* 2015; 8:23.
12. Salami O, Marsland BJ. Has the airway microbiome been overlooked in respiratory disease. *Genome Med* 2015;7:62.

13. Dickson RP, Erb-Downward JR, Huffnagle GB. Towards an ecology of the lung: new conceptual models of pulmonary microbiology and pneumonia. *Lancet Respir Med* 2014; 2:238-246.
14. Gallacher DJ, Kotecha S. Respiratory microbiome of new-born infants. *Front Pediatr* 2016; 4:10.
15. Lal CV, Travers C, Aghai ZH, et al. The airway microbiome at birth. *Sci Rep* 2016; 6:31023.
16. Taylor SL, Wessenlingh S, Rogers GB. Host-microbiome interactions in acute and chronic respiratory infections. *Cell Microbiol* 2016; 18:652-662.
17. Nembrini C, Sichelstiel A, Kisielow J, Kurrer M, Kopt M, Marsland BJ. Bacterial-induced protection against allergic inflammation through a multicomponent immunoregulatory mechanism. *Thorax* 2011; 66:755-763.
18. Fujimura KE, Lynch SV. Microbiota in allergy and asthma and the emerging relationship with the gut microbiome. *Cell Host Microbe* 2015; 17:592-602.
19. Bisgaard H, Li N, Bonnelykke K, et al. Reduced diversity of the intestinal microbiota during infancy is associated with increased risk of allergic disease at school age. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 128:646-652.
20. Huang YJ, Nelson CE, Brodie EL, et al. Airway microbiota and bronchial hyperresponsiveness in patients with suboptimal controlled asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127:372-381.
21. Marra F, Marra CA, Richardson K, et al. Antibiotic use in children is associated with increased risk of asthma. *Pediatrics* 2009; 123:1003-1010.
22. Ege MJ, Mayer M, Normand AC, et al. Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. *N Engl J Med* 2011; 364:701-709.
23. Zang Q, Cox M, Liang Z, et al. Airway microbiota in severe asthma and relationship to asthma severity and phenotypes. *PLoS One* 2016; 11:e052724.
24. Goleva E, Jackson LP, Harris JK, et al. The effects of airway microbiome on corticosteroid responsiveness in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 188:1193-1201.
25. Aguirre E, Galiana A, Mira A, et al. Analysis of microbiota in stable patients with chronic obstructive pulmonary disease. *APMIS* 2015; 123:427-432.
26. Galiana A, Aguirre E, Rodriguez JC, et al. Sputum microbiota in moderate versus severe patients with COPD. *Eur Respir J* 2014; 43:1787-1790.
27. García-Núñez M, Millares L, Pomares X, et al. Severity-related changes of bronchial microbiome in chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Microbiol* 2014; 52:4217-4223.
28. Huang YJ, Sethi S, Murphy T, Nariya S, Boushey HA, Lynch SV. Airway microbiome dynamics in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Microbiol* 2014; 52:2813-2823.
29. Millares L, Ferrari R, Gallego M, et al. Bronchial microbiome of severe COPD patients colonized by *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014; 33:1101-1111.
30. Wang Z, Bafadhel M, Haldar K, et al. Lung microbiome dynamics in COPD exacerbations. *Eur Respir J* 2016; 47:1082-1092.
31. Huang YJ, Boushey HA. The sputum microbiome in chronic obstructive pulmonary disease exacerbations. *Ann Am Thorac Soc* 2015; 12 (Suppl 2):S176-S180.
32. Millares L, Pérez-Brocail V, Ferrari R, et al. Functional metagenomics of the bronchial microbiome in COPD. *PLoS One* 2015; 10:e0144448.
33. Zhao J, Schloss PD, Kalikin LM, et al. Decade-long bacterial community dynamics in cystic fibrosis airways. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109:5809-5814.
34. Fodor AA, Klem ER, Gilpin DF, et al. The adult cystic fibrosis airway microbiota is stable over time and infection type, and highly resilient to antibiotic treatment of exacerbations. *PLoS One* 2012; 7:e45001.
35. Price KE, Hampton TH, Gifford AH, et al. Unique microbial communities persist in individual cystic fibrosis patients throughout a clinical exacerbation. *Microbiome* 2013; 1:27.
36. Smith DJ, Badrick AC, Zakrzewski M, et al. Pyrosequencing reveals transient cystic fibrosis lung microbiome changes with intravenous antibiotics. *Eur Respir J* 2014; 44:922-930.
37. Molyneux PL, Cox MJ, Willis-Owen SA, et al. The role of bacteria in the pathogenesis and progression of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 190:906-913.
38. Lozupone C, Cota-Gomez A, Palmer BE, et al. Widespread colonization of the lung by *Tropheryma whipplei* in HIV infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 187:1110-1117.
39. Iwai S, Fei M, Huang D, et al. Oral and airway microbiota in HIV-infected pneumonia patients. *J Clin Microbiol* 2012; 50:2995-3002.
40. Rogers GB, Van der Gast CJ, Cuthbertson L, et al. Clinical measures of disease in adult non-CF bronchiectasis correlate with airway microbiota composition. *Thorax* 2013; 68:731-737.
41. Tunney MM, Einarsson GG, Wei L, et al. 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.
42. Rogers GB, Zain NM, Bruce KD, et al. A novel microbiota stratification system predicts future exacerbations in bronchiectasis. *Ann Am Thorac Soc* 2014; 11:496-503.
43. Comas I, Gil A. Secuenciación masiva para el diagnóstico y la epidemiología de la tuberculosis. *Enf Infecc Microbiol Clin* 2016; 34(Suppl.3):32-39.

