**人体肺部微生物组 —— 微生物与人类健康和疾病之间的隐秘关联**

**简题**：肺部微生物组

易歆竹，高静远，**王璋\***

华南师范大学生命科学学院生态科学研究所

广州，510631，中国

 **\*通讯作者：**王璋 (wangz@m.scnu.edu.cn)

**摘要**

曾经被认为是无菌的肺部，如今被证实存在菌群的定植。在诸多呼吸系统疾病中，肺部微生物组均发生改变，包括慢性阻塞性肺病、哮喘、支气管扩张等慢性呼吸系统疾病；肺炎、脓毒症和COVID-19引起的急性呼吸系统疾病；以及其他呼吸疾病，如肺移植、肺癌和HIV等。同时，肺部微生物组在调控宿主免疫及同远端器官互作方面的作用正被阐明。然而，肺部微生物组与宿主互作的确切机制仍不明确。肺部菌群领域存在许多技术与生物学挑战，以至需要量身定制检测及分析手段来突破这些瓶颈。在本综述中，我们总结概述了肺部微生物组研究的原理与方法。接下来，我们回顾了现阶段已知的肺部微生物组在人类疾病中所扮演的角色，着重突出机制层面的认识。最后，我们讨论了肺部菌群领域所面临的挑战，并分享了我们对这一领域未来研究的思路。

**关键词：** 肺部微生物组，呼吸系统疾病，微生物-宿主相互作用，肠-肺轴

**文章亮点**

* 痰液、肺泡灌洗液、支气管刷洗物及肺组织是获取肺部微生物组的常规样本类型。多组学技术已越来越多被用于表征肺部微生物组。
* 肺部微生物组广泛涉及于慢性呼吸系统疾病、急性呼吸系统疾病、肺癌等。
* 目前肺部微生物组研究领域所面临的主要挑战包括微生物/宿主比例低，疾病异质性高，以及精准干预和培养手段的缺乏等。
* 肺部微生物组研究的前景包括了解肺部微生物组作为生物标志物在呼吸疾病诊断中的潜力，肺部微生物组的空间动态性，肺部微生物组与宿主的互作机制，以及肺部与远端器官之间的交互作用。

**背景介绍**

作为人体的“第二基因组”，人体微生物组在人类健康和疾病中起着至关重要的作用，并在过去几十年中受到广泛关注**[1]**。与主导人体微生物组研究的肠道菌群相比，我们对人体呼吸道微生物组的关注要少得多。导致这一现象的部分原因是，在过去的一个多世纪里，我们一直认为健康的肺部是一个洁净无菌的器官。随着高通量测序技术的成熟，“肺部无菌论“被彻底推翻，测序技术的运用使得Hilty等在2010年首次发现了气道中的微生物群落**[2]**。此后，肺部微生物组相关研究便呈现出指数级增长。多项研究表明，肺部微生物组在多种呼吸系统疾病中发生改变，如慢性呼吸系统疾病（哮喘，慢性阻塞性肺疾病[COPD]，支气管扩张症和特发性肺纤维化[IPF]），急性呼吸系统疾病（肺炎，败血症，急性呼吸窘迫综合征[ARDS]和COVID-19），以及肺移植术后并发症，艾滋病、肺结核及肺癌等。随后的动物研究进一步探究了肺部微生物组调节宿主病理生理过程的分子机制，它们共同揭示了肺部微生物组与人类疾病之间的隐秘联系。然而，与肠道微生物组研究的快速发展相比，肺部微生物组领域仍处于起步阶段。由于肺部独特的解剖结构以及肺部较低的生物量（较肠道低几个数量级），肺部微生物组领域面临着一系列挑战。因此，我们需要开发为肺部微生物组研究量身定制的新方法。在这篇综述中，我们总结概述了有关人体肺部或下呼吸道微生物组的系列相关研究，包括其原理和方法、在人类疾病中的应用、当前面临的挑战以及未来的研究前景。我们希望该综述能够激发研究者对肺部微生物组这一新兴领域更大的兴趣。

**肺部微生物组的研究方法**

**肺部微生物组采样**

尽管同肠道菌群建立的大多数原则类似，肺部微生物组在分析及测序方法上有其独特的一面，尤其是在采样这一步。从本质上讲，除非存在手术临床指征（即肺移植，肿瘤切除），否则直接获得人体肺组织是不切实际的。因此，几种非侵入性的肺部取样方式作为替代被广泛使用。其中，痰液一直是研究气道微生物组最常用的标本之一，因为它的非侵入性（特别是对于通常能够自发产生痰液的慢性呼吸疾病患者）这一特点有助于样本收集。对于无法自然产生痰液的患者或健康个体，使用雾化盐水来诱导痰液的产生是临床上安全且有效的一种常规手段**[3]**。因此，痰液是研究健康个体气道微生物组的最可行选择之一。然而，痰液样本能否足够代表下气道菌群组成，一直存在争议**[4]**。因此，实际操作中，应将痰液样本中的痰栓（痰液的粘液部分）部分从唾液中分离出来，然后对其进行质量评估（即在显微镜下观察白细胞/鳞状上皮细胞的比例），以此来尽量减少口腔内物质对痰液的污染**[5]**。此外，来自同一个个体的口腔润洗样本可用被用作评估口腔对痰液污染的对照**[6]**。

支气管肺泡灌洗（BAL）是另一种常用的肺部微生物组采样的方法。BAL可以通过操作支气管镜获得，BAL的获取过程存在侵入性，而且比痰液取样更昂贵耗时，这使得纵向样本的采集存在难度。然而，BAL 相对于痰液的明显优势在于，它与下气道的相似性更高。肺部微生物组采样的其他方法还包括支气管刷洗以及气管抽吸物**[7-10]**。从理论上讲，肺组织是研究肺部微生物组的最理想标本，并且在捕获菌群在肺部拓扑结构的分布上具有独特的优势**[11]**。然而，由于在大多数临床条件下无法直接获取肺组织，使得肺组织只能在接受肺切除以及癌症相关手术或活检的患者中得以应用。

**肺部微生物组测序**

与肠道和口腔相比，呼吸道中的微生物生物量明显较低，因此在对肺部微生物组进行采样，处理和分析时，需格外注意**（图1）**。对于样品处理，细菌基因组DNA存在于DNA提取液和PCR试剂中**[12]**。当起始DNA的浓度较低时，试剂的影响将进一步被放大。因此，尽管在肠道微生物组研究中，设置阴性试剂对照这一步骤经常被忽视，但肺部微生物组研究的标准做法中包含了阴性试剂对照的设定**[13]**。在下游的分析中，从阴性对照中鉴定出的细菌分类群通常被从真实的样品中移除。或者也可以被标记为潜在污染菌，并保留在真实数据中，因为简单地排除它们也可能会导致一些潜在的“真实”信号被消除，并使得观察到的菌群组成出现偏倚**[14]**。

针对测序策略而言，16S rRNA基因扩增子测序因其较强的易用性和鲁棒性而被广泛应用于肺部微生物组的研究中。16S rRNA基因的V4可变区常被选为测序对象，然而它无法提供更深入的分类分辨率（大部分只到属水平）**[15]**。在第三代长读长测序技术（PacBio）的推动下，最近研究通过对16S rRNA全长基因进行测序，将肺部微生物组的物种表征至菌种甚至菌株水平，进一步揭示了微生物多样性和异质性**[16，17]**。16S rRNA基因测序存在一些难以消除的误差，其主要来源于不同细菌16S rRNA基因存在扩增效率的差异。16S rRNA基因拷贝数变异进一步为细胞丰度的估计带来偏差。宏基因组测序技术已经展现出其在分析微生物组功能方面的力量，将科学重点从“有什么”转移到“它们能做什么”**[18]**。宏基因组方法通常被认为无需扩增。然而，全基因组扩增技术偶尔被应用于低生物量样品以增加DNA起始浓度，但这同时可能液会引入额外的偏差**[19]**。由于肺部存在着极高的宿主/菌群比例，宏基因组仍较少应用于肺部微生物组的研究中。绝大多数宏基因组测序获得的序列将来自于宿主。目前存在一些方法和试剂盒可以在测序之前去除样本的宿主基因组DNA**[20，21]**，然而，这些方法和试剂盒的去宿主效率存在较大差异，同时还可能去除掉一些细菌的DNA。目前，对宿主-菌群DNA同时进行测序，并在测序后过滤掉宿主序列是一种可行的方法**[22]**，然而，为了全面获取菌群信息，需要较深的测序深度，使得这种测序策略存在较高的成本。类似限制也存在于其他无扩增测序手段中，比如宏转录组学。

尽管肺部微生物组中真菌和病毒群落至关重要，但直到目前为止，我们仍缺乏对其准确的认知**（图1）**。肺部真菌菌群可通过18S rRNA基因或内部转录间隔（ITS）区域测序获得。真菌DNA的提取需要额外的程序（研磨）来破坏真菌的细胞壁**[23]**。由于真菌分类参考数据库并不完整，这为气道真菌研究带来技术上的瓶颈**[24]**。不同真菌物种ITS区域的长度变异性使得后期的序列处理以及物种鉴定变得更加复杂**[25]**。尽管呼吸道致病病毒在临床上已得到较好表征（通过多重qPCR）**[26]**，但肺部整体病毒群落组成仍不清楚。在提取病毒DNA / RNA之前，需要对病毒颗粒进行纯化和富集并去除非病毒成分。然而，由于肺部样品的独特特征（如高粘度）以及病毒成分的丰度较低而且易损，在气道样品中实施病毒富集依然难度很大。值得注意的是，最近的一项研究证实痰液病毒组测序存在可行性，其同时指出，与细菌菌群相比，哮喘患者肺部病毒组与临床参数之间的关联要强得多**[27]**。最后，人类肺部依然被证实有古菌的存在，其中，Woesearchaeota（DPANN超门）成员占主导地位**[28]**。

人类微生物组研究已进入多组学时代**[29]**。沿着微生物组-宿主的互作途径整合多个组学，如宏基因组学、宏转录组学、宏代谢组及宏蛋白组，使研究人员能够更全面地了解微生物组的功能及其与宿主之间的相互作用**（图1）**。多组学越来越多地被应用于肠道微生物组的研究中**[30，31]**，但它在肺部微生物组研究的应用仍较为局限。非靶向代谢组学常被应用于处理一些气道样本（痰液，BAL）**[32，33]**。针对一些感兴趣的关键代谢物的水平，通常会使用具有参考标准的靶向代谢组学来进行验证。宏蛋白组学可通过表征来自特定微生物分类群和宿主的功能性蛋白，从而获取对微生物组-宿主互作的独特认知**[34]**。然而，由于其相对较高的成本，宏蛋白组学在肺部菌群中的应用仍然很少**[35，36]**。

**肺部微生物组与人类健康和疾病**

**健康肺部微生物组**

由于肺部长期暴露在与外部相通的环境中，并具备独特的拓扑结构，肺部菌群时刻处于一个动态变化的状态，这主要由三个因素塑造，即微生物迁移（迁入，通过来自上呼吸道的微吸气），微生物的迁移（迁出）或清除，以及微生物的复制**[37]**。厚壁菌门和拟杆菌门是健康肺部微生物组中的主要门类，普氏菌属，韦氏菌属和链球菌属是最常见的菌属**[11，38]**。在健康个体中，肺部微生物组的组成由微生物迁入和迁出之间的平衡所决定，而微生物复制对肺部微生物组成的贡献却有限**[39]**。在疾病状态下，肺部结构及局部微环境的改变，包括肺粘膜pH、氧梯度、营养物质、温度和炎症等，会促进肺部微生物生长并导致肺部微生物组组成的改变（例如变形菌门增加）。

遵循上述提到的原则和方法，许多研究已经表征了人类健康和疾病状态中的肺部微生物组，并发现菌群紊乱与疾病关键临床参数（如疾病严重程度，恶化，表型，内型，炎症及死亡率）显著相关。本节我们回顾了呼吸系统疾病中肺部微生物组的相关认知，涵盖慢性，急性和其他类型的呼吸系统疾病**（图2，表1）**。

**慢性呼吸系统疾病**

慢性呼吸系统疾病是肺部微生物组研究广泛关注的一个疾病领域，它包括慢性阻塞性肺疾病（慢阻肺/COPD）、哮喘、支气管扩张症、囊性纤维化、间质性肺纤维化等。这些疾病的一个关键表型是在整个疾病进展过程中持续伴随的慢性气道炎症。在Hilty等人对“肺部无菌论”提出质疑的这一标志性研究中，研究者发现肺部菌群在COPD、哮喘和健康对照之间存在差异，疾病状态下变形菌门的丰度升高**[2]**。这种差异模式得到了之后许多研究的支持，表明变形菌门成员（如嗜血杆菌，莫拉氏菌和假单胞菌）与疾病关键临床特征存在关联。

本研究团队先前纵向收集了来自87名慢阻肺患者疾病稳定期、急性加重期、治疗后2周和6周恢复期共476份痰液样本，我们发现变形杆菌，特别是莫拉氏菌在急性加重期显著升高，这种趋势在接受治疗后出现逆转**[40]**。嗜血杆菌在菌群网络中处于中心节点的位置，并与痰液白细胞介素-8呈现正相关**[40]**。这些结果在我们随后对多中心287名COPD患者，775份痰液样本的更大规模的肺部微生物组研究中得到进一步证实**[41]**。变形菌门的升高也与COPD患者长期死亡率升高以及抗生素治疗耐药性的增加有关**[42，43]**。我们最近对1,666个来自公共数据库的样本进行大规模的微生物组荟萃分析，结果表明，与健康对照组相比，COPD中存在嗜血杆菌，链球菌，莫拉氏菌和乳酸杆菌的富集**[44]**。在我们的一项COPD多组学探索性研究中，嗜血杆菌及莫拉氏菌与不同的宿主免疫及炎症模式相关，表明它们在COPD发病机制起不同的作用**[45]**。在哮喘患者中，同样也观察到变形菌门的增加，并伴随卟啉单胞菌，梭杆菌和[鞘氨醇单胞菌](https://baike.baidu.com/item/%E9%9E%98%E6%B0%A8%E9%86%87%E5%8D%95%E8%83%9E%E8%8F%8C/7766647)等非变形菌门的升高**[46]**。并且这一趋势与哮喘严重程度**[47]**、以及Th17相关基因的表达相关**[48]**。作为关键的致病因子，假单胞菌的丰度在支气管扩张症（特别是在亚洲人群）中显着升高**[49，50]**。同时在支气管扩张症中也同时发现真菌成分的改变，比如曲霉菌，青霉菌和隐球菌丰度的增加**[51]**。Mac Aogain等人最近的一项开创性研究通过整合细菌组，真菌组和病毒组来描绘支气管扩张症中的微生物组，表明它们的相互作用与关键临床特征例如急性加重频率及抗生素治疗等密切相关**[52]**。嗜血杆菌和假单胞菌也与囊性纤维化**[53]**及特发性肺纤维化**[54，55]**存在一定的关联，其他致病菌如葡萄球菌和无节胞菌也通常与这两种疾病有关**[56-59]**。

疾病的异质性是哮喘和COPD等慢性呼吸道疾病的一个重要特征，它们由不同的临床表型，炎症内型（特定表型背后的炎症模式）以及病理生理学过程所决定。这种异质性使得新的疾病管理模式被提出，即不通过疾病“标签”，而根据“可治疗性状”来诊断和管理疾病**[60]**。肺部微生物组在同一疾病不同的表型或内型之间存在显著差异，使得疾病特异性微生物组的特征很难被识别。就临床表型而言，由细菌感染所导致的COPD急性加重表型中，变形菌门增加最为明显，但在其他亚型（如病毒感染或嗜酸性粒细胞炎症）中则不显著**[40，41]**。在炎症内型方面，嗜中性粒细胞和嗜酸性粒细胞炎症是哮喘和COPD的两大主要炎症内型，其各自具有独特的肺部菌群特征。嗜血杆菌在嗜中性粒细胞炎症内型中占主导，而某些低丰度菌（如孪生球菌，颗粒链菌和弯曲杆菌）在嗜酸性粒细胞炎症内型中显著升高**[61-63]**。随着哮喘炎症内型的变化，真菌的差异也很明显，镰刀菌，克拉多孢菌和曲霉菌在II型哮喘中存在富集**64]**。我们最近对多中心510名COPD患者共1706份痰液样本进行了大规模综合分析，根据气道菌群组成将嗜中性COPD细分为两个亚组 - “嗜血杆菌优势”和“平衡微生物组”亚组。我们发现这两个亚组具有不同的炎症特征、时间变异性以及微生物组-宿主互作模式，该研究为COPD“菌群-宿主”联合分型提供了理论框架**[62]**。同时，我们最近一项研究揭示了嗜中性和嗜酸性粒细胞COPD肺部耐药谱（即抗生素抗性基因集）存在差异，这表明在进行抗生素治疗时，需要考虑炎症内型**[65]**。

**急性呼吸系统疾病**

急性呼吸系统疾病是由诸如肺炎、脓毒症、以及近年全球爆发的COVID-19等局部或全身性致病性感染引起的肺部急性炎症。急性肺损伤 （ALI） 和更严重的急性呼吸窘迫综合征 （ARDS） 是两类与肺部微生物组存在紧密联系的急性呼吸系统症状。Dickson等人研究表明，脓毒症和ARDS患者的BAL样本中存在肠道特异性细菌（如拟杆菌属）的富集，且其与气道TNF-α显著关联**[66]**，这一发现为危重症患者的肠道菌群易位提供了证据。该研究小组后续由对91名危重病人的BAL样本进行了研究，发现一些肠道特异菌（包括毛螺菌科和肠杆菌科）的富集与较差的临床结局相关**[67]**。Panzer等人一致发现，危重患者进展为ARDS这一过程与肠杆菌在肺部的富集以及和一些与吸烟相关的菌属（如普氏菌及梭杆菌）存在关联**[10]**。通过采集和分析47例机械通气患者BAL样本，Kyo等人发现葡萄球菌，链球菌和肠杆菌科与血清中的白细胞介素-6以及死亡率呈正相关**[68]**。同样，Kitsios等人发现，气管抽吸物中葡萄球菌和假单胞菌的富集与通气患者临床结局存在关联**[69]**。这些结果都表明，ALI/ARDS患者中气道生态失调伴随着肠道相关或其他病原菌的富集，并且该趋势与较差的临床结局存在关联。

COVID-19 已在全球范围内感染了5亿多人**[70]**。早期感染急性SARS-CoV-2会使机体产生不受控的炎症反应以及细胞因子风暴，并发展为ALI和ARDS**[71，72]**。气道微生态失衡可能是新冠患者的重要特征之一。通过对新冠危重症患者下呼吸道进行采样，Sulaiman等人发现，下呼吸道口腔共生唾液支原体的富集与较差的临床结局存在关联，同时该研究表明继发性细菌感染可能不会导致新冠患者致死率的升高**[73]**。通过对一系列连续的临床标本（痰液、鼻腔和咽拭子、肛拭子和粪便）进行宏转录组学分析，Zhong等人发现在重症新冠患者中，洋葱伯克霍尔德菌、表皮葡萄球菌以及支原体处于优势地位，研究同时在重症患者中检出多种呼吸道病毒，其在轻症患者中未被发现**[74]**，该研究表明，针对重症新冠患者，在住院期间应谨防抗生素耐药性的传播。通过对192名COVID-19患者和95名对照组进行纵向采样所获得的588份咽拭子标本进行宏转录组分析，Ren等人阐明新冠患者上呼吸道微生态失调特征，其中链球菌在康复患者上呼吸道中占主导**[75]**。研究表明，上气道中的副血链球菌可能作为非重度新冠患者预后的生物标志物。

**其他呼吸系统疾病**

肺部菌群还与其他免疫类呼吸系统疾病有关，包括肺癌，肺移植术后并发症，艾滋病和结核病等。由于慢性气道炎症增加了感染肺癌的几率，气道微生态失衡可能参与肺癌发病过程**[76]**。一项探索性研究发现肺腺癌患者BALF中共生韦氏菌和巨球型菌富集**[77]**。Huang等人研究进一步证实了这一发现**[78]**。随后的多项研究将肺部微生物组与肺癌关键突变位点和信号通路进一步关联。Greathouse等人的研究表明，肺部食酸菌属的增加与TP53突变有关**[79]**。Tsay等人发现，下气道中口腔类群（如链球菌和韦永氏菌）的富集与ERK和PI3K信号传导有关**[80]**。进一步机制研究表明，肺部生态失调与肺癌的发展以及较差的预后有关，特别是口腔来源的小韦氏球菌富集会导致肺癌小鼠模型存活率降低、肿瘤负荷增加、IL-17炎症上调以及**免疫检查点抑制剂表达**上调 **[81]**。肺部微生物组也与肺癌免疫治疗反应有关**[82]**。Jang等人的研究表明，殊异韦氏菌在PD-L1较高肺癌患者中占主导地位，而深黄奈瑟氏球菌在对免疫治疗无效的患者中占主导地位**[83]**。

肺移植是晚期呼吸疾病患者的最后治疗选择。接受肺移植后最常见的并发症包括急性和慢性的移植物功能障碍。Combs等人分析了134名患者移植后1年内收集的BAL，发现肺部载菌量的增加可以作为预测肺移植后出现慢性排斥反应以及死亡的依据，表明肺部菌群失衡可作为移植物失功的风险因子**[84]**。通过结合扩增子测序以及传统培养学方法，Das等人在肺移植受者中鉴定出了不同的“肺型”，并建立了微生物组，肺功能和临床指标之间的联系**[85]**。在机制层面，同一研究小组进一步证明了气道生态失调会导致移植肺中巨噬细胞炎症与重塑的失衡**[86]**。在一项肺移植供受体多组学研究中，对肺部微生物组、代谢组以及脂质组数据的整合分析可以实现对移植患者术后肺功能变化的预测**[87]**。

在HIV肺部微生物组项目的推动下，HIV是早期肺部微生物组研究所关注的疾病领域之一。研究发现在HIV病毒携带者的下气道中检测到惠普尔养障体细菌，且其含量在经过高活性抗逆转录病毒治疗（HAART）后明显减少**[88]**。随后研究表明，在经历HAART治疗1年后，HIV病毒携带者肺部的普氏菌和韦氏菌含量增加**[89]**。同时，在HIV感染的人类与灵长类动物（SIV）中均观察到耶氏肺孢子虫生长**[90，91]**。对于结核病来说，其致病因子结核菌在结核病患者BAL中含量升高**[92]**，尽管其在不同研究中检出率存在差异**[93]**。其他与结核病呈正相关的菌还包括贪铜菌属，卟啉单胞菌以及链球菌**[94，95]**。曲霉菌和念珠菌在结核病患者肺部也同样存在富集**[95]**。

**肺部微生物组的作用机制**

微生物组领域已从探究菌群与疾病的关联关系发展到明确其因果效应。肠道菌群相关机制研究已逐渐完善，与之相比，肺部菌群的功能与机制尚不完全明确**[96，97]**。微生物组可通过调节宿主免疫和炎症反应来影响慢性呼吸系统疾病进展**（图3）**。通过比较无菌小鼠和特定病原体消除小鼠的过敏性气道炎症，Herbst等人发现，气道菌群的存在对于宿主正常免疫功能和过敏性气道炎症的控制至关重要**[98]**。同一研究小组借助滴鼻LPS和弹性蛋白酶的方式建立肺气肿小鼠模型，进一步发现微生物组参与了宿主气道IL-17A炎症反应以及自身免疫过程**[99]**。Yang等人探究了肺部菌群在IPF中的作用机制，表明肺部生态失调通过TLR-Myd88信号传导驱动白细胞介素-17B的产生以及肺纤维化**[101]**。吸入性糖皮质激素（ICS）是嗜酸性粒细胞 炎症COPD 的标准治疗手段，但其同时也伴随着细菌感染风险。通过整合人、细胞以及小鼠的数据，Singanayagam等人发现ICS抑制了cathelicidin抗菌肽，导致气道菌群失调及链球菌增殖，这一发现为ICS治疗后肺炎风险增加提供了机制解释**[102]**。虽然呼吸道病原菌的致病机理较为明确，但我们对肺部共生菌的作用仍了解较少。Rigauts等人最近的一项研究表明，气道微生物组中黏液罗氏菌可以通过抑制NF-κb途径来缓解气道炎症**[103]**。除炎症外，肺部菌群在调节关键的宿主病理生理过程，如氧化应激、上皮凋亡、胶原沉积、黏液高分泌以及气道重塑中起着重要作用。D'Alessandro-Gabazza等人的研究发现葡萄球菌分泌的**corisin肽可**诱导肺上皮细胞凋亡和胶原沉积，进而导致IPF急性加重**[104]**。Mouraux等人的研究表明，肺部微生物组与肺移植后气道合成及分解代谢重塑之间存在差异性关联，这表明菌群-宿主互作可能决定了移植肺的重塑过程**[105]**。肺部微生物组在塑造宿主的免疫耐受性方面也起着至关重要的作用**[106]**。Gollwitzer等人研究表明，肺部微生物组促进了**调节性T细胞**的发育，导致新生小鼠通过PD-L1对过敏原产生耐受性**[107]**。宿主通过分泌免疫球蛋白（即IgA，IgG，IgM）对微生物定植作出反应，这一过程亦与呼吸系统疾病有关。Collin等人研究显示，在囊性纤维化中，铜绿假单胞菌感染导致IgA增加**[108]**。Richmond等人研究表明，气道IgA缺失导致宿主对肺部菌群免疫反应持续激活，进而出现COPD进展表型**[109]**。

肺部微生物组也和肺部与远端器官之间的互作有关**（图3）**。例如，多项证据表明，口腔菌群在下呼吸道的富集是一种常见现象，其通过增强肺Th17炎症**[110，111]**、上调ERK和PI3K信号传导**[80]**以及增加肺肿瘤负荷**[81]**，对肺部病理学产生复杂的影响。在急性肺损伤中，下呼吸道中存在肠杆菌科和其他肠道相关菌群的富集，表明“肠—肺”轴的存在**[112]**。同时，更多证据表明肠道菌群失调在呼吸系统疾病中发挥作用，支持“肠—肺”轴理论。Lai等人发现COPD小鼠模型中肠道菌群显著改变，并发现肠道共生菌**金氏拟杆菌**通过LPS介导的宿主TLR4信号传导的拮抗作用缓解COPD症状**[113]**。Li等人在接受COPD患者粪便移植的小鼠中观察到更为突出的肺部炎症、气道重塑以及粘液高分泌症状**[114]**。肥胖人群患哮喘的风险较高，肠道菌群紊乱参与其中。Michalovich等人研究表明，哮喘的严重程度与粪便中的阿克曼菌的丰度呈负相关，并且在哮喘小鼠模型中给予这种细菌可缓解小鼠气道高反应性及炎症**[115]**。Hosang等人的最近一项开创性研究表明，肺部菌群失调伴随着富含脂多糖菌门的缺失，其增强了宿主大脑自身免疫疾病的易感性，自此首次提出了“肺-脑”轴的概念**[116]**。

**肺部微生物组面临的挑战**

尽管肺部菌群领域研究取得了一定进展，但仍然面临着许多挑战。首先，如前所述，肺部菌群较低的生物量以及高宿主污染限制了宏基因组学和宏转录组学手段的应用。因此，我们需要一种高效的样品处理方法及测序手段，以合理的成本获得充足的气道宏组学信息。其次，与其他慢性病相似，慢性呼吸系统疾病存在异质性—不同疾病具有不同的临床表现、疾病表型和气道微生物组组成。解析微生物组与疾病表型和内型之间错综复杂的关系是精确量化气道菌群在疾病中作用的先决条件。第三，微生物组可合成代谢物或肽类物质，其可作为配体与宿主受体进行相互作用并触发下游信号的传导。与已在肠道中获得良好表征的分子（如短链脂肪酸、吲哚衍生物、氨基酸、胆汁酸）相比，人们目前对肺部微生物组特异性代谢分子及其功能的了解仍十分有限。因此，我们需要借助系统生物学手段绘制呼吸系统“微生物-宿主”互作的多组学图谱，精准识别哪些气道微生物能够产生或消耗哪些分子，以及这些分子如何与宿主信号通路及生理过程发生相互作用。第四，实现动物模型中气道菌群的精准调控，对于评估菌群功能及其对宿主的影响至关重要。与广泛应用于肠道菌群功能研究的粪菌移植技术相比，目前我们还缺乏对于气道微生物组的精准调控与干预方式。第五，实现呼吸道微生物的培养对转化研究至关重要。尽管临床培养呼吸道病原菌已较为成熟，对肺部共生微生物组的培养却鲜有尝试。值得注意的是，Whelan等人的研究表明，通过培养组学手段，囊性纤维化病人的痰液中82.1%的分类单元可被培养**[117]**。

**肺部微生物组的未来前景**

鉴于存在以上的诸多挑战，针对肺部微生物组量身定制的创新技术对于推动该领域的发展至关重要。纵向、干预以及机制研究可进一步阐明“菌群-疾病”因果关系。我们希望借此回答肺部微生物组相关更多的科学问题，例如：健康肺部微生物组的基线状态如何？肺部微生物组对环境刺激有何反应？肺部微生物组在呼吸系统疾病不同内型中扮演何种角色？具有不同影像学特征患者的肺部微生物组有何不同？微生物组是否可以作为标志物来协助呼吸系统疾病患者的诊断、表型判断和预后？肺部微生物组拓扑学结构和时空动态性如何？呼吸道细菌、真菌和病毒如何相互作用，它们如何共同调节宿主免疫反应？调控宿主炎症或其他病理生理学过程的关键菌群代谢物是什么？哪些远端器官受到肺部菌群的影响，其背后的机制是什么？对这些问题的回答有助于实现我们最终的目标，即监测（作为生物标志物）并操控（作为治疗靶点）肺部菌群，朝着呼吸疾病精准医学的方向迈进。

**致谢**

本论文的研究工作是在中国国家自然科学基金 (31970112, 32170109, 41907211)和广东省科学技术基金(2019A1515011395)的资助下完成。

**利益冲突**

作者表明不存在利益上的竞争。

**作者贡献**

本文由易歆竹负责文献综述并撰写文稿。高静远负责文献综述。项目由王璋指导，撰写并修改文稿。所有作者均已阅读终稿并同意出版。

**图例**

**图1. 肺部微生物组的原理和方法。包括取样方法、测序策略以及可获得的微生物组与宿主的信息。**对于每种测序类型，其难度级别的划分基于作者对相关技术挑战的经验性评估。图中同时展示了肺部菌群领域所面临的挑战，以及针对它们可能的解决方案。

**图2. 肺部微生物组在呼吸系统疾病中的应用，按慢性呼吸系统疾病、急性呼吸系统疾病以及其他呼吸系统疾病进行分类。**与疾病之间呈正相关（相较于对照组在疾病组中存在富集，或与关键临床指标呈正相关）或负相关（与对照组相比，在疾病组中丰度降低或与关键临床特征呈现负相关）的细菌、病毒或真菌类群分别用向上或向下的箭头表示。在COPD和哮喘中，分别用红色或蓝色箭头区分与其特定炎症内型（嗜中性或嗜酸性粒细胞炎症内型）相关的菌群。

**图3. 肺部微生物-宿主互作，及其与远端器官之间的交互联系。**在呼吸系统中，病原体或共生菌、真菌以及病毒间存在相互作用，并且这些微生物作为一个整体，与宿主间通过产生或消耗代谢物来进行相互作用，其参与呼吸疾病关键病理生理过程（如肺纤维化、肺气肿、炎症反应、上皮凋亡以及气道重塑）。病原体、共生菌、其潜在代谢物、以及其对宿主代谢途径的调节均显示在通路图中。在肺和远端器官之间，下呼吸道中存在口腔微生物（即普氏菌和韦氏菌）的富集，其对肺部病理学产生了复杂的影响。下呼吸道中肠杆菌科以及其他肠道相关菌群的富集证实了“肠-肺”轴的存在。来自肺部微生物组的产黑素普雷沃菌可调节脑部自身免疫，这意味着“肺-脑”轴存在的可能性。

**表1. 慢性、急性和其他类型呼吸系统疾病的肺部菌群研究总结。**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 疾病类型 | 文献 | 样品种类 | 实验分组和样品量 | 研究方法 | 重要发现 |
| 慢性阻塞性肺疾病 | Wang et al. 2016 | 痰液 | 稳定期，急性加重期，治疗后期，恢复期，476个样本，87例患者 | 16S V3-V5 | * 莫拉氏菌属在急性加重期上升
* 与嗜酸性粒细胞急性加重相比，细菌感染型急性加重亚组中变形菌门增多
 |
| 慢性阻塞性肺疾病 | Wang et al. 2018 | 痰液 | 稳定期，急性加重期，715个样本，287例患者 | 16S V4 | * 韦荣氏球菌在急性加重期阶段减少
* 与嗜酸性粒细胞急性加重相比，细菌感染型急性加重亚组中变形菌门增多
* 频繁急性加重患者气道菌群时间变异性增加
 |
| 慢性阻塞性肺疾病 | Dicker et al. 2020 | 痰液 | 稳定期，急性加重期，252例患者 | 16S V4 | * 变形菌门在非嗜酸性表型中增加，并与死亡率和嗜中性粒细胞炎症的增加相关
 |
| 慢性阻塞性肺疾病 | Wang et al. 2020 | 痰液 | 1666个微生物组样本，1340个宿主转录组样本 | 16S, 宏基因组, 宿主转录组 | * COPD患者中嗜血杆菌、莫拉菌、链球菌和乳酸菌含量升高
* 丁酸、同型半胱氨酸和棕榈酸与COPD宿主基因表达相关
 |
| 慢性阻塞性肺疾病 | Wang et al. 2021 | 痰液 | 稳定期，急性加重期，1706个样本，510患者 | 16S V4, V3-V5 | * 嗜中性粒细胞COPD中由嗜血杆菌分化的两种菌群群落与IL-1β和TNFα或IL-17A分别相关
* 弯曲杆菌和颗粒链菌与痰嗜中性粒细胞先关
 |
| 哮喘 | Huang et al. 2015 | 支气管刷检 | 40例患者 | 16S 芯片, 宿主转录组 | * 变形菌门与气道白细胞相关
* 放线菌与激素治疗反应指标FKBP5相关
 |
| 哮喘 | Taylor et al. 2018 | 痰液 | 167 例患者 | 16S V1-V3 | * 嗜血杆菌在嗜中性粒细胞性哮喘中占优势
* 孪生球菌和卟啉单胞菌在嗜酸细胞粒哮喘中富集
 |
| 哮喘 | Abdel-Aziz et al. 2020 | 痰液 | 100例重度哮喘患者和24例中轻度哮喘患者 | 16S, 宏基因组 | * 发现了两个微生物组亚群
* 亚群II的患者存在微生态失衡，中性粒细胞增多，预后较差
 |
| 哮喘 | Sharma et al. 2019 | 支气管肺泡灌洗液，支气管内刷 | 39 例哮喘患者，19 例对照 | 16S V4, ITS | * 镰刀菌、枝孢菌和曲霉在II型哮喘患者中富集
* 曲霉、镰刀菌和青霉菌与 FEV1相关
 |
| 支气管扩张 | Guan et al. 2018 | 痰液 | 106例患者，17例对照 | 16S V4 | * 患者分为三组（PA、PPM和共生组）
* PA组的α-多样性降低
* PPM组中嗜血杆菌增多
 |
| 支气管扩张 | Mac Aogain et al. 2018 | 痰液 | 238例患者，10例对照 | ITS | * 曲霉、隐球菌和棍孢菌与支气管扩张有关
* 土曲霉与支气管扩张急性加重相关
 |
| 支气管扩张 | Mac Aogain et al. 2021 | 痰液 | 217例患者，30例对照，166例患者验证队列 | 16S V3-V4, ITS, 病毒qPCR, 宏基因组 | * 频繁加重患者中微生物网络复杂性降低
* 急性加重期微生物拮抗作用在治疗后得到解决
 |
| 囊性纤维化 | Zemanick et al. 2017 | 支气管肺泡灌洗 | 146例患者，45例对照 | 16S V1-V2 | * 链球菌、普雷沃氏菌和韦荣氏球菌与气道炎症相关
* 在两岁以下的患者中，链球菌占主导
 |
| 特发性肺纤维化 | Molyneaux et al. 2017 | 支气管肺泡灌洗液, 血液 | 60例患者，20例对照，患者样本纵向采样 | 16S V3-V5, 人体宿主转录组 | * 两个基因模块分别与气道微生物组、细菌负荷和嗜中性粒细胞有关
 |
| 急性肺炎 | Kitsios et al. 2018 | 气管内吸出物 | 56例患者 | 16S V4 | * 对病原菌的检测，测序结果比培养更敏感
 |
| 脓毒症/急性呼吸窘迫综合征 | Dickson et al. 2016 | 支气管肺泡灌洗液 | 来自68例患者的100个样本 | 16S V4 | * 肺部菌群以肠道相关细菌（拟杆菌属）为主
* 肺泡TNF-α与肺部菌群失调正相关
 |
| 急性呼吸窘迫综合征 | Kyo et al. 2019 | 支气管肺泡灌洗液 | 40例患者, 7例对照 | 16S V5-V6 | * ARDS微生物组落多样性降低，细菌负荷增加
* 葡萄球菌、链球菌和肠杆菌与死亡率相关
 |
| 急性呼吸窘迫综合征 | Panzer et al. 2018 | 气管内抽吸 | 74例ICU住院, 30例入院后48小时采样 | 16S V4 | * 链球菌、梭杆菌、普雷沃氏菌和密螺旋体菌与吸烟相关
* 急性呼吸窘迫综合征与肠杆菌、普雷沃氏菌和梭杆菌相关
 |
| 新型冠状病毒肺炎 | Sulaiman et al. 2021 | 支气管镜检 | 142例患者 | 宏基因组, 宏转录组, 宿主转录组  | * 临床结局不良与唾液支原体相关
* SARS-CoV-2丰度和宿主转录组可预测死亡率
 |
| 新型冠状病毒肺炎 | Zhong et al. 2021 | 痰液, 鼻咽拭子, 肛门拭子和粪便 | 轻度患者8例，重症患者15例，47份气道样本，20份肛拭子和粪便样本 | 宏转录组 | * 洋葱伯克霍尔德菌、葡萄球菌和支原体在重症患者中增加
 |
| 新型冠状病毒肺炎 | Ren et al. 2021 | 咽拭子 | 588份样本, 192例患者和95个对照 | 宏转录组 | * 康复患者中链球菌数量增加
* 副溶血链球菌与非重症患者预后相关
 |
| 肺癌 | Tsay et al. 2018 | 气道刷 | 39例肺癌患者, 36例非癌症患者，10例健康对照 | 16S V4, 宿主转录组 | * 链球菌和韦荣氏球菌在肺癌患者中增加
* 韦荣氏球菌、普雷沃氏菌和链球菌与ERK和PI3K信号通路相关
 |
| 肺癌 | Tsay et al. 2021 | 支气管镜，气道刷 | 83例肺癌患者 | 16S V4, 宿主转录组 | * 小韦荣氏球菌与患者生存率降低、肿瘤负荷增加、IL17炎症和检查点抑制剂标志物的激活相关
 |
| 肺移植 | Combs et al. 2021 | 支气管肺泡灌洗液 | 134例患者 | 16S, 微滴数字PCR | * 细菌负荷增加，但没有细菌类群与CLAD相关
 |
| 肺移植 | Bernasconi et al. 2016 | 支气管肺泡灌洗液 | 来自肺移植术后的112例患者的203份样本  | 16S V1-V2 | * 肺部菌群特征与固有免疫基因表达一致
* “炎症”和“重塑”特征与肺部菌群紊乱有关
 |
| 肺移植 | Watzenboeck et al. 2022 | 支气管肺泡灌洗液 | 78名肺捐赠者和受赠者 | 16S V1-V2, 脂质组和代谢组 | * 受体特异性和环境因素塑造了移植后肺部菌群
* 多组学联合可预测术后FEV1的变化
 |
| 艾滋病 | Lozupone et al. 2013 | 支气管肺泡灌洗液 | 82例艾滋病毒阳性，77例艾滋病毒阴性 | 16S, 宏基因组 | * 惠普尔养障体在HIV感染患者中增加，HAART治疗后减少
 |
| 艾滋病 | Twigg 3rd et al. 2016 | 支气管肺泡灌洗液 | 30例艾滋病毒阳性，22例艾滋病毒阴性 | 16S V1-V3 | * 链球菌在HIV感染患者中增加，黄杆菌在对照组中减少
* 治疗一年后，普雷沃氏菌和韦荣氏球菌数量增加
 |
| 肺结核 | Hu et al. 2020 | 支气管肺泡灌洗液 | 30例阳性, 30例结核分枝杆菌阴性 | 16S V3-V4, 宏基因组 | * 结核菌在结核菌阳性样本中占主导地位，并影响微生物功能谱和真菌群落
 |
| 肺结核 | Zhou et al. 2015 | 支气管肺泡灌洗液 | 32例结核分枝杆菌阳性, 24 例结核分枝杆菌阴性 | 16S V3 | * 贪铜菌在肺结核患者中增多
* 结核病灶内分枝杆菌和卟啉单胞菌增多
 |

**第一作者：易歆竹**

****

**博士毕业于新加坡国立大学，主要研究方向为环境及人体微生物抗生素耐药基因组。以第一作者在ISME Journal，Water Research， Microbiology Spectrum，Environmental Pollution 等期刊发表SCI论文10余篇， 获得国家自然科学基金青年项目等。**

**通讯作者：王璋**



**王璋、华南师范大学生命科学学院研究员，广东省青年珠江学者。博士毕业于美国弗吉尼亚大学，葛兰素史克（GSK）美国研发总部研究员，2018引进加入华南师范大学。从事呼吸道微生物组研究，研究揭示气道菌群与慢阻肺表型及内型关系，提出“菌群—炎症”联合分型新观点，开发气道菌群多组学联合分析方法，绘制“菌群—代谢—宿主”互作功能图谱。以第一或通讯作者在American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine，European Respiratory Journal，Thorax，ISME Journal，npj Biofilms and Microbiomes等期刊发表SCI论文30余篇，H-index为20。受到期刊Editorial评述与Faculty Opinions推荐。撰写Nature-Springer出版的Methods Molecular Biology系列专著《Bacterial Pangenomics》宏基因组分析方法学章节。主持国自然面上项目（2项）等。担任广东省精准医学应用协会微生态医学分会常务委员、广东省精准医学应用协会精准健康管理分会常务委员、广东省慢阻肺康复工程技术研究中心委员等职务。担任Medicine in Microecology、iMeta期刊青年编委。**

**引文：**Xinzhu Yi, Jingyuan Gao, Zhang Wang. 2022. The human lung microbiome—A hidden link between microbes and human health and diseases. ***iMeta*** 1: e33. <https://doi.org/10.1002/imt2.33>

**参考文献：**

1. Cho, I., M. J. Blaser. 2012. “The human microbiome: at the interface of health and disease.” *Nat Rev Genet* 13: 260-270. <https://doi.org/10.1038/nrg3182>

2. Hilty, M., C. Burke, H. Pedro, P. Cardenas, A. Bush, C. Bossley, J. Davies, et al. 2010. “Disordered microbial communities in asthmatic airways.” *PLoS One* 5: e8578. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008578>

3. Paggiaro, P. L., P. Chanez, O. Holz, P. W. Ind, R. Djukanovic, P. Maestrelli, P. J. Sterk. 2002. “Sputum induction.” *Eur Respir J Suppl* 37: 3s-8s. <https://doi.org/10.1183/09031936.02.00000302>

4. An, S. Q., A. Warris, S. Turner. 2018. “Microbiome characteristics of induced sputum compared to bronchial fluid and upper airway samples.” *Pediatr Pulmonol* 53: 921-928. <https://doi.org/10.1002/ppul.24037>

5. Murdoch, D. R., S. C. Morpeth, L. L. Hammitt, A. J. Driscoll, N. L. Watson, H. C. Baggett, W. A. Brooks, et al. 2017. “Microscopic Analysis and Quality Assessment of Induced Sputum From Children With Pneumonia in the PERCH Study.” *Clin Infect Dis* 64: S271-S279. <https://doi.org/10.1093/cid/cix083>

6. Sulaiman, I., B. G. Wu, Y. Li, A. S. Scott, P. Malecha, B. Scaglione, J. Wang, et al. 2018. “Evaluation of the airway microbiome in nontuberculous mycobacteria disease.” *Eur Respir J* 52: <https://doi.org/10.1183/13993003.00810-2018>

7. Durack, J., Y. J. Huang, S. Nariya, L. S. Christian, K. M. Ansel, A. Beigelman, M. Castro, et al. 2018. “Bacterial biogeography of adult airways in atopic asthma.” *Microbiome* 6: 104. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0487-3>

8. Denner, D. R., N. Sangwan, J. B. Becker, D. K. Hogarth, J. Oldham, J. Castillo, A. I. Sperling, et al. 2016. “Corticosteroid therapy and airflow obstruction influence the bronchial microbiome, which is distinct from that of bronchoalveolar lavage in asthmatic airways.” *J Allergy Clin Immunol* 137: 1398-1405 e1393. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.10.017>

9. Kalantar, K. L., F. Moazed, S. C. Christenson, J. Wilson, T. Deiss, A. Belzer, K. Vessel, et al. 2019. “Metagenomic comparison of tracheal aspirate and mini-bronchial alveolar lavage for assessment of respiratory microbiota.” *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 316: L578-L584. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00476.2018>

10. Panzer, A. R., S. V. Lynch, C. Langelier, J. D. Christie, K. McCauley, M. Nelson, C. K. Cheung, N. L. Benowitz, M. J. Cohen, C. S. Calfee. 2018. “Lung Microbiota Is Related to Smoking Status and to Development of Acute Respiratory Distress Syndrome in Critically Ill Trauma Patients.” *Am J Respir Crit Care Med* 197: 621-631. <https://doi.org/10.1164/rccm.201702-0441OC>

11. Charlson, E. S., K. Bittinger, A. R. Haas, A. S. Fitzgerald, I. Frank, A. Yadav, F. D. Bushman, R. G. Collman. 2011. “Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract.” *Am J Respir Crit Care Med* 184: 957-963. <https://doi.org/10.1164/rccm.201104-0655OC>

12. Salter, S. J., M. J. Cox, E. M. Turek, S. T. Calus, W. O. Cookson, M. F. Moffatt, P. Turner, J. Parkhill, N. J. Loman, A. W. Walker. 2014. “Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses.” *BMC Biol* 12: 87. <https://doi.org/10.1186/s12915-014-0087-z>

13. Marsh, R. L., M. T. Nelson, C. E. Pope, A. J. Leach, L. R. Hoffman, A. B. Chang, H. C. Smith-Vaughan. 2018. “How low can we go? The implications of low bacterial load in respiratory microbiota studies.” *Pneumonia (Nathan)* 10: 7. <https://doi.org/10.1186/s41479-018-0051-8>

14. Carney, S. M., J. C. Clemente, M. J. Cox, R. P. Dickson, Y. J. Huang, G. D. Kitsios, K. M. Kloepfer, et al. 2020. “Methods in Lung Microbiome Research.” *Am J Respir Cell Mol Biol* 62: 283-299. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2019-0273TR>

15. Johnson, J. S., D. J. Spakowicz, B. Y. Hong, L. M. Petersen, P. Demkowicz, L. Chen, S. R. Leopold, et al. 2019. “Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis.” *Nat Commun* 10: 5029. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>

16. Wang, Z., H. Liu, F. Wang, Y. Yang, X. Wang, B. Chen, M. R. Stampfli, et al. 2020. “A Refined View of Airway Microbiome in Chronic Obstructive Pulmonary Disease at Species and Strain-Levels.” *Front Microbiol* 11: 1758. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01758>

17. Toma, I., M. O. Siegel, J. Keiser, A. Yakovleva, A. Kim, L. Davenport, J. Devaney, et al. 2014. “Single-molecule long-read 16S sequencing to characterize the lung microbiome from mechanically ventilated patients with suspected pneumonia.” *J Clin Microbiol* 52: 3913-3921. <https://doi.org/10.1128/JCM.01678-14>

18. Knight, R., A. Vrbanac, B. C. Taylor, A. Aksenov, C. Callewaert, J. Debelius, A. Gonzalez, et al. 2018. “Best practices for analysing microbiomes.” *Nat Rev Microbiol* 16: 410-422. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0029-9>

19. Ahsanuddin, S., E. Afshinnekoo, J. Gandara, M. Hakyemezoglu, D. Bezdan, S. Minot, N. Greenfield, C. E. Mason. 2017. “Assessment of REPLI-g Multiple Displacement Whole Genome Amplification (WGA) Techniques for Metagenomic Applications.” *J Biomol Tech* 28: 46-55. <https://doi.org/10.7171/jbt.17-2801-008>

20. Marotz, C. A., J. G. Sanders, C. Zuniga, L. S. Zaramela, R. Knight, K. Zengler. 2018. “Improving saliva shotgun metagenomics by chemical host DNA depletion.” *Microbiome* 6: 42. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0426-3>

21. Nelson, M. T., C. E. Pope, R. L. Marsh, D. J. Wolter, E. J. Weiss, K. R. Hager, A. T. Vo, et al. 2019. “Human and Extracellular DNA Depletion for Metagenomic Analysis of Complex Clinical Infection Samples Yields Optimized Viable Microbiome Profiles.” *Cell Rep* 26: 2227-2240 e2225. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.091>

22. Mac Aogain, M., K. J. X. Lau, Z. Cai, J. Kumar Narayana, R. W. Purbojati, D. I. Drautz-Moses, N. E. Gaultier, et al. 2020. “Metagenomics Reveals a Core Macrolide Resistome Related to Microbiota in Chronic Respiratory Disease.” *Am J Respir Crit Care Med* 202: 433-447. <https://doi.org/10.1164/rccm.201911-2202OC>

23. Tang, J., I. D. Iliev, J. Brown, D. M. Underhill, V. A. Funari. 2015. “Mycobiome: Approaches to analysis of intestinal fungi.” *J Immunol Methods* 421: 112-121. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2015.04.004>

24. Liu, H., Z. Liang, N. Cao, X. Yi, X. Tan, Z. Liu, F. Wang, et al. 2020. “Airway bacterial and fungal microbiome in chronic obstructive pulmonary disease.” *Medicine in Microecology* 7,

25. Rolling, T., B. Zhai, J. Frame, T. M. Hohl, Y. Taur. 2022. “Customization of a DADA2-based pipeline for fungal internal transcribed spacer 1 (ITS1) amplicon data sets.” *JCI Insight* 7: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.151663>

26. Wylie, K. M. 2017. “The Virome of the Human Respiratory Tract.” *Clin Chest Med* 38: 11-19. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2016.11.001>

27. Choi, S., K. H. Sohn, J. W. Jung, M. G. Kang, M. S. Yang, S. Kim, J. H. Choi, S. H. Cho, H. R. Kang, H. Yi. 2021. “Lung virome: New potential biomarkers for asthma severity and exacerbation.” *J Allergy Clin Immunol* 148: 1007-1015 e1009. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2021.03.017>

28. Koskinen, K., M. R. Pausan, A. K. Perras, M. Beck, C. Bang, M. Mora, A. Schilhabel, R. Schmitz, C. Moissl-Eichinger. 2017. “First Insights into the Diverse Human Archaeome: Specific Detection of Archaea in the Gastrointestinal Tract, Lung, and Nose and on Skin.” *MBio* 8: <https://doi.org/10.1128/mBio.00824-17>

29. Jansson, J. K., E. S. Baker. 2016. “A multi-omic future for microbiome studies.” *Nat Microbiol* 1: 16049. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.49>

30. Pedersen, H. K., V. Gudmundsdottir, H. B. Nielsen, T. Hyotylainen, T. Nielsen, B. A. Jensen, K. Forslund, et al. 2016. “Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity.” *Nature* 535: 376-381. <https://doi.org/10.1038/nature18646>

31. Lloyd-Price, J., C. Arze, A. N. Ananthakrishnan, M. Schirmer, J. Avila-Pacheco, T. W. Poon, E. Andrews, et al. 2019. “Multi-omics of the gut microbial ecosystem in inflammatory bowel diseases.” *Nature* 569: 655-662. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1237-9>

32. Ahmed, N., T. Bezabeh, O. B. Ijare, R. Myers, R. Alomran, M. Aliani, Z. Nugent, et al. 2016. “Metabolic Signatures of Lung Cancer in Sputum and Exhaled Breath Condensate Detected by (1)H Magnetic Resonance Spectroscopy: A Feasibility Study.” *Magn Reson Insights* 9: 29-35. <https://doi.org/10.4137/MRI.S40864>

33. Zhu, T., S. Li, J. Wang, C. Liu, L. Gao, Y. Zeng, R. Mao, B. Cui, H. Ji, Z. Chen. 2020. “Induced sputum metabolomic profiles and oxidative stress are associated with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) severity: potential use for predictive, preventive, and personalized medicine.” *EPMA J* 11: 645-659. <https://doi.org/10.1007/s13167-020-00227-w>

34. Hardouin, P., R. Chiron, H. Marchandin, J. Armengaud, L. Grenga. 2021. “Metaproteomics to Decipher CF Host-Microbiota Interactions: Overview, Challenges and Future Perspectives.” *Genes (Basel)* 12: <https://doi.org/10.3390/genes12060892>

35. Thuy-Boun, P. S., S. Mehta, B. Gruening, T. McGowan, A. Nguyen, A. T. Rajczewski, J. E. Johnson, T. J. Griffin, D. W. Wolan, P. D. Jagtap. 2021. “Metaproteomics Analysis of SARS-CoV-2-Infected Patient Samples Reveals Presence of Potential Coinfecting Microorganisms.” *J Proteome Res* 20: 1451-1454. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00822>

36. Jagtap, P. D., K. J. Viken, J. Johnson, T. McGowan, K. M. Pendleton, T. J. Griffin, R. C. Hunter, J. D. Rudney, M. Bhargava. 2018. “BAL Fluid Metaproteome in Acute Respiratory Failure.” *Am J Respir Cell Mol Biol* 59: 648-652. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2018-0068LE>

37. Dickson, R. P., F. J. Martinez, G. B. Huffnagle. 2014. “The role of the microbiome in exacerbations of chronic lung diseases.” *Lancet* 384: 691-702. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61136-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736%2814%2961136-3)

38. Dickson, R. P., J. R. Erb-Downward, C. M. Freeman, L. McCloskey, N. R. Falkowski, G. B. Huffnagle, J. L. Curtis. 2017. “Bacterial Topography of the Healthy Human Lower Respiratory Tract.” *MBio* 8: <https://doi.org/10.1128/mBio.02287-16>

39. Whiteside, S. A., J. E. McGinniss, R. G. Collman. 2021. “The lung microbiome: progress and promise.” *J Clin Invest* 131: <https://doi.org/10.1172/JCI150473>

40. Wang, Z., M. Bafadhel, K. Haldar, A. Spivak, D. Mayhew, B. E. Miller, R. Tal-Singer, et al. 2016. “Lung microbiome dynamics in COPD exacerbations.” *Eur Respir J* 47: 1082-1092. <https://doi.org/10.1183/13993003.01406-2015>

41. Wang, Z., R. Singh, B. E. Miller, R. Tal-Singer, S. Van Horn, L. Tomsho, A. Mackay, et al. 2018. “Sputum microbiome temporal variability and dysbiosis in chronic obstructive pulmonary disease exacerbations: an analysis of the COPDMAP study.” *Thorax* 73: 331-338. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2017-210741>

42. Dicker, A. J., J. T. Huang, M. Lonergan, H. R. Keir, C. J. Fong, B. Tan, A. J. Cassidy, et al. 2020. “The Sputum Microbiome, Airway Inflammation and Mortality in Chronic Obstructive Pulmonary Disease.” *J Allergy Clin Immunol* <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.02.040>

43. Liu, H., D. Zheng, Y. Lin, Z. Liu, Z. Liang, J. Su, R. Chen, H. Zhou, Z. Wang. 2020. “Association of sputum microbiome with clinical outcome of initial antibiotic treatment in hospitalized patients with acute exacerbations of COPD.” *Pharmacol Res* 160: 105095. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105095>

44. Wang, Z., Y. Yang, Z. Yan, H. Liu, B. Chen, Z. Liang, F. Wang, et al. 2020. “Multi-omic meta-analysis identifies functional signatures of airway microbiome in chronic obstructive pulmonary disease.” *ISME J* 14: 2748-2765. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0727-y>

45. Wang, Z., B. Maschera, S. Lea, U. Kolsum, D. Michalovich, S. Van Horn, C. Traini, J. R. Brown, E. M. Hessel, D. Singh. 2019. “Airway host-microbiome interactions in chronic obstructive pulmonary disease.” *Respir Res* 20: 113. <https://doi.org/10.1186/s12931-019-1085-z>

46. Chung, K. F. 2017. “Airway microbial dysbiosis in asthmatic patients: A target for prevention and treatment?” *J Allergy Clin Immunol* 139: 1071-1081. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.02.004>

47. Abdel-Aziz, M. I., P. Brinkman, S. J. H. Vijverberg, A. H. Neerincx, J. H. Riley, S. Bates, S. Hashimoto, et al. 2021. “Sputum microbiome profiles identify severe asthma phenotypes of relative stability at 12 to 18 months.” *J Allergy Clin Immunol* 147: 123-134. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.04.018>

48. Huang, Y. J., S. Nariya, J. M. Harris, S. V. Lynch, D. F. Choy, J. R. Arron, H. Boushey. 2015. “The airway microbiome in patients with severe asthma: Associations with disease features and severity.” *J Allergy Clin Immunol* 136: 874-884. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.05.044>

49. Huang, H. Y., F. T. Chung, C. Y. Lo, H. C. Lin, Y. T. Huang, C. H. Yeh, C. W. Lin, Y. C. Huang, C. H. Wang. 2020. “Etiology and characteristics of patients with bronchiectasis in Taiwan: a cohort study from 2002 to 2016.” *BMC Pulm Med* 20: 45. <https://doi.org/10.1186/s12890-020-1080-7>

50. Guan, W. J., J. J. Yuan, H. M. Li, Y. H. Gao, C. L. Chen, Y. Huang, R. C. Chen, N. S. Zhong. 2018. “Altered community compositions of Proteobacteria in adults with bronchiectasis.” *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 13: 2173-2182. <https://doi.org/10.2147/COPD.S159335>

51. Mac Aogain, M., R. Chandrasekaran, A. Y. H. Lim, T. B. Low, G. L. Tan, T. Hassan, T. H. Ong, et al. 2018. “Immunological corollary of the pulmonary mycobiome in bronchiectasis: the CAMEB study.” *Eur Respir J* 52: <https://doi.org/10.1183/13993003.00766-2018>

52. Mac Aogain, M., J. K. Narayana, P. Y. Tiew, Nabm Ali, V. F. L. Yong, T. K. Jaggi, A. Y. H. Lim, et al. 2021. “Integrative microbiomics in bronchiectasis exacerbations.” *Nat Med* 27: 688-699. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01289-7>

53. Zemanick, E. T., B. D. Wagner, C. E. Robertson, R. C. Ahrens, J. F. Chmiel, J. P. Clancy, R. L. Gibson, et al. 2017. “Airway microbiota across age and disease spectrum in cystic fibrosis.” *Eur Respir J* 50: <https://doi.org/10.1183/13993003.00832-2017>

54. Molyneaux, P. L., S. A. G. Willis-Owen, M. J. Cox, P. James, S. Cowman, M. Loebinger, A. Blanchard, et al. 2017. “Host-Microbial Interactions in Idiopathic Pulmonary Fibrosis.” *Am J Respir Crit Care Med* 195: 1640-1650. <https://doi.org/10.1164/rccm.201607-1408OC>

55. Valenzi, E., H. Yang, J. C. Sembrat, L. Yang, S. Winters, R. Nettles, D. J. Kass, et al. 2021. “Topographic heterogeneity of lung microbiota in end-stage idiopathic pulmonary fibrosis: the Microbiome in Lung Explants-2 (MiLEs-2) study.” *Thorax* 76: 239-247. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2020-214770>

56. de Koff, E. M., K. M. Groot, D. Bogaert. 2016. “Development of the respiratory tract microbiota in cystic fibrosis.” *Curr Opin Pulm Med* 22: 623-628. <https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000316>

57. Waters, V., Y. Yau, S. Prasad, A. Lu, E. Atenafu, I. Crandall, S. Tom, E. Tullis, F. Ratjen. 2011. “Stenotrophomonas maltophilia in cystic fibrosis: serologic response and effect on lung disease.” *Am J Respir Crit Care Med* 183: 635-640. <https://doi.org/10.1164/rccm.201009-1392OC>

58. Wolter, D. J., J. C. Emerson, S. McNamara, A. M. Buccat, X. Qin, E. Cochrane, L. S. Houston, et al. 2013. “Staphylococcus aureus small-colony variants are independently associated with worse lung disease in children with cystic fibrosis.” *Clin Infect Dis* 57: 384-391. <https://doi.org/10.1093/cid/cit270>

59. Molyneaux, P. L., M. J. Cox, S. A. Willis-Owen, P. Mallia, K. E. Russell, A. M. Russell, E. Murphy, et al. 2014. “The role of bacteria in the pathogenesis and progression of idiopathic pulmonary fibrosis.” *Am J Respir Crit Care Med* 190: 906-913. <https://doi.org/10.1164/rccm.201403-0541OC>

60. McDonald, V. M., J. Fingleton, A. Agusti, S. A. Hiles, V. L. Clark, A. E. Holland, G. B. Marks, et al. 2019. “Treatable traits: a new paradigm for 21st century management of chronic airway diseases: Treatable Traits Down Under International Workshop report.” *Eur Respir J* 53: <https://doi.org/10.1183/13993003.02058-2018>

61. Taylor, S. L., L. E. X. Leong, J. M. Choo, S. Wesselingh, I. A. Yang, J. W. Upham, P. N. Reynolds, et al. 2018. “Inflammatory phenotypes in patients with severe asthma are associated with distinct airway microbiology.” *J Allergy Clin Immunol* 141: 94-103 e115. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.03.044>

62. Wang, Z., N. Locantore, K. Haldar, M. Y. Ramsheh, A. S. Beech, W. Ma, J. R. Brown, et al. 2021. “Inflammatory Endotype-associated Airway Microbiome in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Clinical Stability and Exacerbations: A Multicohort Longitudinal Analysis.” *Am J Respir Crit Care Med* 203: 1488-1502. <https://doi.org/10.1164/rccm.202009-3448OC>

63. Beech, A. S., S. Lea, U. Kolsum, Z. Wang, B. E. Miller, G. C. Donaldson, J. A. Wedzicha, C. E. Brightling, D. Singh. 2020. “Bacteria and sputum inflammatory cell counts; a COPD cohort analysis.” *Respir Res* 21: 289. <https://doi.org/10.1186/s12931-020-01552-4>

64. Sharma, A., B. Laxman, E. T. Naureckas, D. K. Hogarth, A. I. Sperling, J. Solway, C. Ober, J. A. Gilbert, S. R. White. 2019. “Associations between fungal and bacterial microbiota of airways and asthma endotypes.” *J Allergy Clin Immunol* 144: 1214-1227 e1217. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.06.025>

65. Yi, X., Y. Li, H. Liu, X. Liu, J. Yang, J. Gao, Y. Yang, et al. 2022. “Inflammatory Endotype-Associated Airway Resistome in Chronic Obstructive Pulmonary Disease.” *Microbiol Spectr* e0259321. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02593-21>

66. Dickson, R. P., B. H. Singer, M. W. Newstead, N. R. Falkowski, J. R. Erb-Downward, T. J. Standiford, G. B. Huffnagle. 2016. “Enrichment of the lung microbiome with gut bacteria in sepsis and the acute respiratory distress syndrome.” *Nat Microbiol* 1: 16113. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.113>

67. Dickson, R. P., M. J. Schultz, T. van der Poll, L. R. Schouten, N. R. Falkowski, J. E. Luth, M. W. Sjoding, et al. 2020. “Lung Microbiota Predict Clinical Outcomes in Critically Ill Patients.” *Am J Respir Crit Care Med* 201: 555-563. <https://doi.org/10.1164/rccm.201907-1487OC>

68. Kyo, M., K. Nishioka, T. Nakaya, Y. Kida, Y. Tanabe, S. Ohshimo, N. Shime. 2019. “Unique patterns of lower respiratory tract microbiota are associated with inflammation and hospital mortality in acute respiratory distress syndrome.” *Respir Res* 20: 246. <https://doi.org/10.1186/s12931-019-1203-y>

69. Kitsios, G. D., H. Yang, L. Yang, S. Qin, A. Fitch, X. Wang, K. Fair, et al. 2020. “Respiratory Tract Dysbiosis is Associated With Worse Outcomes in Mechanically-Ventilated Patients.” *Am J Respir Crit Care Med* <https://doi.org/doi>: 10.1164/rccm.201912-2441OC. Online ahead of print.

70. Guan, W. J., Z. Y. Ni, Y. Hu, W. H. Liang, C. Q. Ou, J. X. He, L. Liu, et al. 2020. “Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China.” *N Engl J Med* 382: 1708-1720. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2002032>

71. Li, H., L. Liu, D. Zhang, J. Xu, H. Dai, N. Tang, X. Su, B. Cao. 2020. “SARS-CoV-2 and viral sepsis: observations and hypotheses.” *Lancet* 395: 1517-1520. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30920-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736%2820%2930920-X)

72. Li, L., Q. Huang, D. C. Wang, D. H. Ingbar, X. Wang. 2020. “Acute lung injury in patients with COVID-19 infection.” *Clin Transl Med* 10: 20-27. <https://doi.org/10.1002/ctm2.16>

73. Sulaiman, I., M. Chung, L. Angel, J. J. Tsay, B. G. Wu, S. T. Yeung, K. Krolikowski, et al. 2021. “Microbial signatures in the lower airways of mechanically ventilated COVID-19 patients associated with poor clinical outcome.” *Nat Microbiol* 6: 1245-1258. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-00961-5>

74. Zhong, H., Y. Wang, Z. Shi, L. Zhang, H. Ren, W. He, Z. Zhang, et al. 2021. “Characterization of respiratory microbial dysbiosis in hospitalized COVID-19 patients.” *Cell Discov* 7: 23. <https://doi.org/10.1038/s41421-021-00257-2>

75. Ren, L., Y. Wang, J. Zhong, X. Li, Y. Xiao, J. Li, J. Yang, et al. 2021. “Dynamics of the Upper Respiratory Tract Microbiota and Its Association with Mortality in COVID-19.” *Am J Respir Crit Care Med* 204: 1379-1390. <https://doi.org/10.1164/rccm.202103-0814OC>

76. Lee, G., T. C. Walser, S. M. Dubinett. 2009. “Chronic inflammation, chronic obstructive pulmonary disease, and lung cancer.” *Curr Opin Pulm Med* 15: 303-307. <https://doi.org/10.1097/MCP.0b013e32832c975a>

77. Lee, S. H., J. Y. Sung, D. Yong, J. Chun, S. Y. Kim, J. H. Song, K. S. Chung, et al. 2016. “Characterization of microbiome in bronchoalveolar lavage fluid of patients with lung cancer comparing with benign mass like lesions.” *Lung Cancer* 102: 89-95. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2016.10.016>

78. Huang, D., X. Su, M. Yuan, S. Zhang, J. He, Q. Deng, W. Qiu, H. Dong, S. Cai. 2019. “The characterization of lung microbiome in lung cancer patients with different clinicopathology.” *Am J Cancer Res* 9: 2047-2063. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31598405>

79. Greathouse, K. L., J. R. White, A. J. Vargas, V. V. Bliskovsky, J. A. Beck, N. von Muhlinen, E. C. Polley, et al. 2018. “Interaction between the microbiome and TP53 in human lung cancer.” *Genome Biol* 19: 123. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1501-6>

80. Tsay, J. J., B. G. Wu, M. H. Badri, J. C. Clemente, N. Shen, P. Meyn, Y. Li, et al. 2018. “Airway Microbiota Is Associated with Upregulation of the PI3K Pathway in Lung Cancer.” *Am J Respir Crit Care Med* 198: 1188-1198. <https://doi.org/10.1164/rccm.201710-2118OC>

81. Tsay, J. J., B. G. Wu, I. Sulaiman, K. Gershner, R. Schluger, Y. Li, T. A. Yie, et al. 2021. “Lower Airway Dysbiosis Affects Lung Cancer Progression.” *Cancer Discov* 11: 293-307. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-0263>

82. Bullman, S., A. Eggermont, C. D. Johnston, L. Zitvogel. 2021. “Harnessing the microbiome to restore immunotherapy response.” *Nat Cancer* 2: 1301-1304. <https://doi.org/10.1038/s43018-021-00300-x>

83. Jang, H. J., J. Y. Choi, K. Kim, S. H. Yong, Y. W. Kim, S. Y. Kim, E. Y. Kim, et al. 2021. “Relationship of the lung microbiome with PD-L1 expression and immunotherapy response in lung cancer.” *Respir Res* 22: 322. <https://doi.org/10.1186/s12931-021-01919-1>

84. Combs, M. P., D. S. Wheeler, J. E. Luth, N. R. Falkowski, N. M. Walker, J. R. Erb-Downward, V. N. Lama, R. P. Dickson. 2021. “Lung microbiota predict chronic rejection in healthy lung transplant recipients: a prospective cohort study.” *Lancet Respir Med* 9: 601-612. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30405-7](https://doi.org/10.1016/S2213-2600%2820%2930405-7)

85. Das, S., E. Bernasconi, A. Koutsokera, D. A. Wurlod, V. Tripathi, G. Bonilla-Rosso, J. D. Aubert, et al. 2021. “A prevalent and culturable microbiota links ecological balance to clinical stability of the human lung after transplantation.” *Nat Commun* 12: 2126. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22344-4>

86. Bernasconi, E., C. Pattaroni, A. Koutsokera, C. Pison, R. Kessler, C. Benden, P. M. Soccal, et al. 2016. “Airway Microbiota Determines Innate Cell Inflammatory or Tissue Remodeling Profiles in Lung Transplantation.” *Am J Respir Crit Care Med* 194: 1252-1263. <https://doi.org/10.1164/rccm.201512-2424OC>

87. Watzenboeck, M. L., A. D. Gorki, F. Quattrone, R. Gawish, S. Schwarz, C. Lambers, P. Jaksch, et al. 2022. “Multi-omics profiling predicts allograft function after lung transplantation.” *Eur Respir J* 59: <https://doi.org/10.1183/13993003.03292-2020>

88. Lozupone, C., A. Cota-Gomez, B. E. Palmer, D. J. Linderman, E. S. Charlson, E. Sodergren, M. Mitreva, et al. 2013. “Widespread colonization of the lung by Tropheryma whipplei in HIV infection.” *Am J Respir Crit Care Med* 187: 1110-1117. <https://doi.org/10.1164/rccm.201211-2145OC>

89. Twigg, H. L., 3rd, K. S. Knox, J. Zhou, K. A. Crothers, D. E. Nelson, E. Toh, R. B. Day, et al. 2016. “Effect of Advanced HIV Infection on the Respiratory Microbiome.” *Am J Respir Crit Care Med* 194: 226-235. <https://doi.org/10.1164/rccm.201509-1875OC>

90. Cui, L., L. Lucht, L. Tipton, M. B. Rogers, A. Fitch, C. Kessinger, D. Camp, et al. 2015. “Topographic diversity of the respiratory tract mycobiome and alteration in HIV and lung disease.” *Am J Respir Crit Care Med* 191: 932-942. <https://doi.org/10.1164/rccm.201409-1583OC>

91. Shipley, T. W., H. M. Kling, A. Morris, S. Patil, J. Kristoff, S. E. Guyach, J. E. Murphy, et al. 2010. “Persistent pneumocystis colonization leads to the development of chronic obstructive pulmonary disease in a nonhuman primate model of AIDS.” *J Infect Dis* 202: 302-312. <https://doi.org/10.1086/653485>

92. Hu, Y., M. Cheng, B. Liu, J. Dong, L. Sun, J. Yang, F. Yang, X. Chen, Q. Jin. 2020. “Metagenomic analysis of the lung microbiome in pulmonary tuberculosis - a pilot study.” *Emerg Microbes Infect* 9: 1444-1452. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1783188>

93. Ticlla, M. R., J. Hella, H. Hiza, M. Sasamalo, F. Mhimbira, L. K. Rutaihwa, S. Droz, et al. 2021. “The Sputum Microbiome in Pulmonary Tuberculosis and Its Association With Disease Manifestations: A Cross-Sectional Study.” *Front Microbiol* 12: 633396. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.633396>

94. Zhou, Y., F. Lin, Z. Cui, X. Zhang, C. Hu, T. Shen, C. Chen, X. Zhang, X. Guo. 2015. “Correlation between Either Cupriavidus or Porphyromonas and Primary Pulmonary Tuberculosis Found by Analysing the Microbiota in Patients' Bronchoalveolar Lavage Fluid.” *PLoS One* 10: e0124194. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124194>

95. Botero, L. E., L. Delgado-Serrano, M. L. Cepeda, J. R. Bustos, J. M. Anzola, P. Del Portillo, J. Robledo, M. M. Zambrano. 2014. “Respiratory tract clinical sample selection for microbiota analysis in patients with pulmonary tuberculosis.” *Microbiome* 2: 29. <https://doi.org/10.1186/2049-2618-2-29>

96. Ubags, N. D. J., B. J. Marsland. 2017. “Mechanistic insight into the function of the microbiome in lung diseases.” *Eur Respir J* 50: <https://doi.org/10.1183/13993003.02467-2016>

97. Budden, K. F., S. D. Shukla, S. F. Rehman, K. L. Bowerman, S. Keely, P. Hugenholtz, D. P. H. Armstrong-James, et al. 2019. “Functional effects of the microbiota in chronic respiratory disease.” *Lancet Respir Med* [https://doi.org/10.1016/S2213-2600(18)30510-1](https://doi.org/10.1016/S2213-2600%2818%2930510-1)

98. Herbst, T., A. Sichelstiel, C. Schar, K. Yadava, K. Burki, J. Cahenzli, K. McCoy, B. J. Marsland, N. L. Harris. 2011. “Dysregulation of allergic airway inflammation in the absence of microbial colonization.” *Am J Respir Crit Care Med* 184: 198-205. <https://doi.org/10.1164/rccm.201010-1574OC>

99. Yadava, K., C. Pattaroni, A. K. Sichelstiel, A. Trompette, E. S. Gollwitzer, O. Salami, C. von Garnier, L. P. Nicod, B. J. Marsland. 2016. “Microbiota Promotes Chronic Pulmonary Inflammation by Enhancing IL-17A and Autoantibodies.” *Am J Respir Crit Care Med* 193: 975-987. <https://doi.org/10.1164/rccm.201504-0779OC>

100. O'Dwyer, D. N., S. L. Ashley, S. J. Gurczynski, M. Xia, C. Wilke, N. R. Falkowski, K. C. Norman, et al. 2019. “Lung Microbiota Contribute to Pulmonary Inflammation and Disease Progression in Pulmonary Fibrosis.” *Am J Respir Crit Care Med* 199: 1127-1138. <https://doi.org/10.1164/rccm.201809-1650OC>

101. Yang, D., X. Chen, J. Wang, Q. Lou, Y. Lou, L. Li, H. Wang, et al. 2019. “Dysregulated Lung Commensal Bacteria Drive Interleukin-17B Production to Promote Pulmonary Fibrosis through Their Outer Membrane Vesicles.” *Immunity* 50: 692-706 e697. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.02.001>

102. Singanayagam, A., N. Glanville, L. Cuthbertson, N. W. Bartlett, L. J. Finney, E. Turek, E. Bakhsoliani, et al. 2019. “Inhaled corticosteroid suppression of cathelicidin drives dysbiosis and bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease.” *Sci Transl Med* 11: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aav3879>

103. Rigauts, C., J. Aizawa, S. Taylor, G. B. Rogers, M. Govaerts, P. Cos, L. Ostyn, et al. 2021. “Rothia mucilaginosa is an anti-inflammatory bacterium in the respiratory tract of patients with chronic lung disease.” *Eur Respir J* <https://doi.org/10.1183/13993003.01293-2021>

104. D'Alessandro-Gabazza, C. N., T. Kobayashi, T. Yasuma, M. Toda, H. Kim, H. Fujimoto, O. Hataji, et al. 2020. “A Staphylococcus pro-apoptotic peptide induces acute exacerbation of pulmonary fibrosis.” *Nat Commun* 11: 1539. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15344-3>

105. Mouraux, S., E. Bernasconi, C. Pattaroni, A. Koutsokera, J. D. Aubert, J. Claustre, C. Pison, et al. 2018. “Airway microbiota signals anabolic and catabolic remodeling in the transplanted lung.” *J Allergy Clin Immunol* 141: 718-729 e717. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.06.022>

106. Sommariva, M., V. Le Noci, F. Bianchi, S. Camelliti, A. Balsari, E. Tagliabue, L. Sfondrini. 2020. “The lung microbiota: role in maintaining pulmonary immune homeostasis and its implications in cancer development and therapy.” *Cell Mol Life Sci* 77: 2739-2749. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03452-8>

107. Gollwitzer, E. S., S. Saglani, A. Trompette, K. Yadava, R. Sherburn, K. D. McCoy, L. P. Nicod, C. M. Lloyd, B. J. Marsland. 2014. “Lung microbiota promotes tolerance to allergens in neonates via PD-L1.” *Nat Med* 20: 642-647. <https://doi.org/10.1038/nm.3568>

108. Collin, A. M., M. Lecocq, S. Noel, B. Detry, F. M. Carlier, F. Aboubakar Nana, C. Bouzin, et al. 2020. “Lung immunoglobulin A immunity dysregulation in cystic fibrosis.” *EBioMedicine* 60: 102974. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102974>

109. Richmond, B. W., R. M. Brucker, W. Han, R. H. Du, Y. Zhang, D. S. Cheng, L. Gleaves, et al. 2016. “Airway bacteria drive a progressive COPD-like phenotype in mice with polymeric immunoglobulin receptor deficiency.” *Nat Commun* 7: 11240. <https://doi.org/10.1038/ncomms11240>

110. Segal, L. N., J. C. Clemente, J. C. Tsay, S. B. Koralov, B. C. Keller, B. G. Wu, Y. Li, et al. 2016. “Enrichment of the lung microbiome with oral taxa is associated with lung inflammation of a Th17 phenotype.” *Nat Microbiol* 1: 16031. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.31>

111. Wu, B. G., I. Sulaiman, J. J. Tsay, L. Perez, B. Franca, Y. Li, J. Wang, et al. 2021. “Episodic Aspiration with Oral Commensals Induces a MyD88-dependent, Pulmonary T-Helper Cell Type 17 Response that Mitigates Susceptibility to Streptococcus pneumoniae.” *Am J Respir Crit Care Med* 203: 1099-1111. <https://doi.org/10.1164/rccm.202005-1596OC>

112. Budden, K. F., S. L. Gellatly, D. L. Wood, M. A. Cooper, M. Morrison, P. Hugenholtz, P. M. Hansbro. 2017. “Emerging pathogenic links between microbiota and the gut-lung axis.” *Nat Rev Microbiol* 15: 55-63. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.142>

113. Lai, H. C., T. L. Lin, T. W. Chen, Y. L. Kuo, C. J. Chang, T. R. Wu, C. C. Shu, Y. H. Tsai, S. Swift, C. C. Lu. 2021. “Gut microbiota modulates COPD pathogenesis: role of anti-inflammatory Parabacteroides goldsteinii lipopolysaccharide.” *Gut* <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-322599>

114. Li, N., Z. Dai, Z. Wang, Z. Deng, J. Zhang, J. Pu, W. Cao, et al. 2021. “Gut microbiota dysbiosis contributes to the development of chronic obstructive pulmonary disease.” *Respir Res* 22: 274. <https://doi.org/10.1186/s12931-021-01872-z>

115. Michalovich, D., N. Rodriguez-Perez, S. Smolinska, M. Pirozynski, D. Mayhew, S. Uddin, S. Van Horn, et al. 2019. “Obesity and disease severity magnify disturbed microbiome-immune interactions in asthma patients.” *Nat Commun* 10: 5711. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13751-9>

116. Hosang, L., R. C. Canals, F. J. van der Flier, J. Hollensteiner, R. Daniel, A. Flugel, F. Odoardi. 2022. “The lung microbiome regulates brain autoimmunity.” *Nature* 603: 138-144. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04427-4>

117. Whelan, F. J., B. Waddell, S. A. Syed, S. Shekarriz, H. R. Rabin, M. D. Parkins, M. G. Surette. 2020. “Culture-enriched metagenomic sequencing enables in-depth profiling of the cystic fibrosis lung microbiota.” *Nat Microbiol* 5: 379-390. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0643-y>