

# CARATTERIZZAZIONE DEL MICROBIOMA DELLE PRIME VIE AEREE DI VITELLI PIEMONTESI: RISULTATI PRELIMINARI

Nicola Isabella (\*), Cerutti Francesco (\*\*), Peletto Simone (\*\*), Grego Elena (\*), Bertone Iride (\*), Cagnasso Aurelio (\*), D'Angelo Antonio (\*), Bellino Claudio (\*) (\*) Dipartimento di Scienze Veterinarie – Università degli studi di Torino. (\*\*) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta – SS. Genetica e Immunobiochimica. **Riassunto** Recenti acquisizioni suggeriscono che la composizione delle comunità microbiche delle vie respiratorie possa assumere un ruolo nella patogenesi della patologia. Gli obiettivi del presente lavoro sono stati di caratterizzare il microbioma delle prime vie aeree di vitelli di razza Piemontese e identificare eventuali associazioni fra questo e reperti ottenuti mediante esame ecografico polmonare. Su ogni animale è stata svolta una visita clinica, un esame ecografico ed è stato effettuato il tampone nasale. I vitelli sono stati monitorati in 3 tempi sperimentali: a 0, 7 e 21 giorni. Sono stati inclusi 11 vitelli (7 mostravano lesioni ecografiche). Previa estrazione del DNA dai campioni, la regione V3-V4 del gene 16S rRNA è stata amplificata e sequenziata. Complessivamente sono state ottenute un totale 525.190 sequenze, 4.232 OTU, 29 *phyla* e 304 generi. I *phyla* riscontrati con maggior abbondanza erano: *Proteobacteria* (36,15%), *Tenericutes* (27,74%), *Firmicutes* (18,37%), *Bacterioidetes* (10,03%) e *Actinobacteria* (6,28%). I 2 generi maggiormente rappresentati erano *Mycoplasma* e *Moraxella*. Nessuna differenza statisticamente significativa è stata riscontrata a livello di struttura delle comunità microbiche nei due gruppi di animali ( $p=0.52$ ). I risultati preliminari di questo studio suggeriscono che il microbioma delle prime vie aeree sia rappresentato da una grande quantità di diverse popolazioni microbiche e che esse siano influenzate dall'ambiente esterno. Ulteriori studi sul microbioma polmonare del bovino sono necessari al fine di meglio comprendere il ruolo delle diverse comunità batteriche nello sviluppo della BRD. **Parole chiave:** bovino, BRD, ecografia toracica, metagenomica, microbioma

## Introduzione

La Piemontese è una razza di bovini da carne diffusa prevalentemente nella regione Piemonte, di particolare pregio economico. Il ciclo produttivo prevede che i vitelli vengano svezzati a 4-6 mesi di età per essere macellati a 16-18 mesi. Considerando l'elevata morbilità, il complesso della patologia respiratoria bovina (BRD) rappresenta un'importante problematica sanitaria nell'allevamento dei bovini da carne (11). Si tratta di una patologia multifattoriale, che origina dall'interazione di fattori immunitari e gestionali con microorganismi patogeni (virus e batteri) (25, 27). Essa è causa di ingenti perdite economiche in relazione al costo della terapia e alla riduzione dell'incremento ponderale (7, 28). Il solo esame clinico presenta una scarsa accuratezza nella diagnosi della patologia, in quanto frequentemente animali non sintomatici presentano lesioni polmonari (5, 6, 30). Per questa ragione, negli ultimi decenni è stata proposta l'ecografia toracica come possibile ausilio nella diagnosi di BRD. Tale indagine collaterale, infatti, può rappresentare un metodo pratico ed accurato per la valutazione delle lesioni polmonari (5, 6, 23, 24).

Oltre alla diagnosi clinica, anche l'identificazione dell'agente patogeno assume una notevole importanza nel controllo della patologia (12). Mediante i metodi culturali standard, i principali



batteri isolati in corso di BRD sono rappresentati da *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Histophilus somni* e *Mycoplasma* spp (13, 21). Questi microorganismi possono tuttavia rappresentare parte della flora batterica delle vie respiratorie di animali clinicamente sani (2,14). Attraverso nuove tecniche di biologia molecolare (NGS = Next Generation Sequencing), mediante il sequenziamento massivo del gene 16S rRNA (metabarcoding), è stato possibile caratterizzare l'intero microbioma del tratto respiratorio dell'uomo (26). Questo ha permesso di ipotizzare che tra i meccanismi patogenetici della polmonite umana possa assumere notevole importanza un'alterazione dell'equilibrio tra ospite e microbioma del tratto respiratorio (disbiosi) (10, 17). Anche in campo buiatico si stanno diffondendo l'utilizzo delle NGS nel tentativo di meglio comprendere il ruolo del microbioma respiratorio nella patogenesi della BRD (16). Gli studi sinora condotti hanno caratterizzato il microbioma nasofaringeo di bovini sani o con segni clinici di BRD (15, 19, 29). Non esistono attualmente studi volti a caratterizzare il microbioma delle prime vie aeree di vitelli di razza Piemontese.

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di applicare le NGS al fine di ottenere una mappatura delle specie batteriche delle prime vie respiratorie di vitelli di razza Piemontese. Un obiettivo secondario di questo studio è stato quello di indagare eventuali variazioni del microbioma in relazione ai reperti dell'ecografia polmonare.

### **Materiali e metodi**

Il progetto è stato approvato dal comitato Bioetico e del Benessere Animale del Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università di Torino e per ogni vitello è stato chiesto all'allevatore di firmare un consenso informato.

Lo studio è stato condotto tra settembre 2015 e marzo 2016, in allevamenti di bovini di razza Piemontese. Sono stati inclusi vitelli nella fase post-svezzamento (5-6 mesi di vita), stabulati in box multipli e non sottoposti a trattamenti farmacologici al momento della visita. Per ogni animale è stata compilata una scheda clinica allestita ad hoc, per la registrazione dei reperti relativi all'esame obiettivo (generale e particolare) e all'esame ecografico. Su ogni soggetto sono stati inoltre eseguiti dei tamponi nasali.

Durante la visita clinica, è stata prestata particolare attenzione ai segni clinici di patologia respiratoria: scolo nasale, tosse e presenza di rumori anomali (sibili o rantoli) all'auscultazione.

L'esame ecografico (convex 2-5MHz; SonoSite MicroMaxx®, SonoSite Inc.) è stato eseguito fra il 10° e il 3° spazio intercostale di entrambi gli emitoraci, suddividendoli in 4 aree (cranio-ventrale, cranio-dorsale, caudo-ventrale, caudo-dorsale). In base al tipo e alla gravità delle lesioni ecografiche riscontrate, a ogni area è stato assegnato un punteggio da 0 a 3 (0: assenza di lesioni, 1: presenza di "comet-tail artifacts", 2: consolidamento lobulare, 3: consolidamento lobare) (22). Il punteggio complessivo di ogni animale era dato dalla somma dei punteggi ecografici assegnati a ciascuna delle aree scansionate. L'esame clinico e l'ecografia polmonare sono stati nuovamente eseguiti dopo 7 e 21 giorni.

Il tampone nasale (DrySwab, 15 cm, Copan S.p.A.) è stato eseguito, previa accurata pulizia delle narici, e stoccato a -80°C fino al momento della processazione.

L'estrazione del DNA è stata effettuata utilizzando il DNAzol® reagent (Invitrogen) in accordo con le istruzioni del produttore. Brevemente i tamponi nasali, subito dopo il prelievo, sono stati immersi in 500 ml di DNAzol® reagent, omogenati ripetutamente ed incubati a 4°C per 18 h. In seguito alla precipitazione del DNA mediante l'utilizzo di etanolo il pellet è stato sottoposto a 2

lavaggi consecutivi. Il DNA è stato eluito in 30  $\mu$ l di acqua sterile RNAsi e DNAsi free. La concentrazione di DNA presente in ogni campione è stata determinata mediante fluorimetria (Qubit®, Invitrogen) e normalizzata a 5 ng/ml.

Per il sequenziamento è stata utilizzata la piattaforma MiSeq (Illumina) e le fasi di preparazione dei campioni sono state svolte seguendo il protocollo suggerito dal produttore.

Con una prima PCR, la regione V3-V4 del gene 16S rRNA è stata amplificata utilizzando i primer descritti da Klindworth et al. (18) e il KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Kit (KAPA Biosystems). Una seconda PCR (index PCR) è stata eseguita per legare agli ampliconi gli indici campione-specifici (Nextera XT Index Kit, Illumina) e gli adattatori necessari per il legame dei frammenti alla superficie della flow-cell. Dopo ogni PCR il prodotto di amplificazione è stato purificato mediante biglie magnetiche (AMPure XP beads, Ambion). Le librerie di materiale genetico ottenute sono state validate utilizzando il Bioanalyzer DNA 1000 chip (Agilent Technologies), e quantificate mediante qPCR con NEBNext® Library Quant Kit for Illumina® (New England BioLabs), per normalizzarle a 4nM, in modo da unirle per creare un pool con tutte le librerie ugualmente rappresentate. Il pool è stato infine denaturato e quindi sequenziato utilizzando il MiSeq v3 reagent kit (Illumina) sulla piattaforma MiSeq (Illumina) con sequenziamento paired-end 2x300.

### Bioinformatica e analisi statistica

Per ogni campione le read sono state filtrate per qualità, ripulite dalle sequenze dei primer e successivamente appaiate utilizzando i programmi bbduk2 e bbmerge, presenti all'interno del pacchetto BBMap (BBMap v. 36.28). Le sequenze sono state così categorizzate in Unità Tassonomiche Operazionali (OTU), utilizzando le pipeline presenti nel pacchetto Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME v. 1.9.0), basandosi sul 97% di identità con le sequenze presenti sul database Greengenes, utilizzando l'algoritmo UCLUST.

I gruppi di sequenze con bassa abbondanza sono stati filtrati e le chimere sono state rimosse utilizzando USEARCH. Per lo svolgimento delle analisi statistiche e il confronto tra i campioni è stato utilizzato sempre QIIME. I risultati sono riportati come mediana, media, valore minimo (min), valore massimo (max) e deviazione standard ove appropriato.

La variabilità intra-campione ( $\alpha$ -diversità) è stata valutata utilizzando gli indici di Shannon, Simpson e Chao1, previa rarefazione delle librerie ad una eguale profondità di 3.500 sequenze. Al fine di indagare eventuali variazioni del microbioma in relazione ai reperti dell'ecografia polmonare, gli animali sono stati suddivisi in 2 gruppi in base alla presenza/assenza di lesioni ecografiche. Gli indici di Shannon, Simpson e Chao1 e le sequenze sono state analizzate mediante ANOVA. La struttura delle comunità microbiche dei due gruppi è stata analizzata mediante un'analisi multivariata permutazionale della varianza (PERMANOVA). Per tutte le analisi è stato considerato un livello di significatività

$\alpha < 0,05$ .

### **Risultati**

In totale sono stati inclusi 11 vitelli (7 maschi e 4 femmine), provenienti da 3 diversi allevamenti. Ecograficamente sono state evidenziate lesioni polmonari in 7 vitelli (64%), di questi, 5 avevano concomitanti segni clinici di BRD. In 4 casi le alterazioni erano bilaterali, mentre in 3 erano

localizzate a livello di emitorace sinistro. La maggior parte delle lesioni (92%) era localizzata a livello delle aree cranio-ventrali. La mediana del punteggio ecografico complessivo assegnato ai diversi animali era di 2 (min. 1 – max. 6) il giorno dell'inclusione, di 4 (min. 1 – max. 7) dopo 7 giorni e di 5 (min. 2 – max. 9) dopo 21 giorni. Nessuno dei 4 vitelli senza lesioni polmonari ha manifestato segni clinici di BRD durante lo studio. Due di questi hanno, però, sviluppato lesioni polmonari, rappresentate da comet tail artifacts, durante i 21 giorni di osservazione.

Dagli 11 tamponi processati, previo controllo di qualità ed eliminazione di eventuali chimere, sono state ottenute un totale di 525.190 sequenze. Da ogni campione è stato ottenuto un numero medio di sequenze pari 44.774,55 (min. 3.929 – max. 167.212) con un numero totale di OTU di 4.232.

L'analisi delle sequenze ha permesso di identificare un totale di 29 differenti *phyla* e 304 generi (Fig. 1). Analizzando la distribuzione quantitativa dei *phyla*, la maggior parte dell'abbondanza relativa (98,57%) era attribuibile ai seguenti 5 *phyla*: *Proteobacteria* (36,15%), *Tenericutes* (27,74%), *Firmicutes* (18,37%), *Bacteroidetes* (10,03%) e *Actinobacteria* (6,28%). Nel *phylum* dei *Proteobacteria*, il 46,73% era rappresentato dal genere *Moraxella*, mentre *Pasteurella* e *Mannheimia* rappresentavano il 2,58% e l'1,36%, rispettivamente. Il *phylum Tenericutes* era rappresentato per il 98,24% dal genere *Mycoplasma*.

Analizzando la distribuzione quantitativa dei generi, i maggiormente rappresentati erano *Mycoplasma* e *Moraxella*, seguiti, in termini di abbondanza relativa, da: *Aggregatibacter*, *Sphingomonas*, *Corynebacterium*, *Psychrobacter* e *Coproccoccus*. I restanti generi erano presenti con una abbondanza relativa inferiore all'1% sul totale (Tab. 1).

Suddividendo la popolazione in base ai reperti dell'esame ecografico, nel gruppo degli animali con lesioni il *phylum* maggiormente rappresentato era *Proteobacteria* (40,24%), mentre nel gruppo di animali senza lesioni era *Tenericutes* (39,83%) (Fig. 2).

Sulla totalità dei generi identificati, 195 (64%) erano comuni a entrambi i gruppi. Di questi, 12 generi avevano un'abbondanza relativa maggiore dell'1% in almeno uno dei due gruppi (Tab. 1).

**Tabella 1:** Distribuzione dei generi con la maggior abbondanza relativa sul totale dei vitelli e in base alla presenza di lesioni ecografiche polmonari. Sono mostrati solo i generi che all'interno di ogni gruppo rappresentavano più dell'1% delle sequenze.

Genere	Presenza di lesioni	Assenza di lesioni	Totale
<i>Mycoplasma</i>	24,87%	39,38%	27,25%
<i>Moraxella</i>	19,74%	2,38%	16,89%
<i>Aggregatibacter</i>	4,31%	0,30%	3,65%
<i>Sphingomonas</i>	3,83%	1,14%	3,39%
<i>Corynebacterium</i>	1,29%	1,53%	1,33%
<i>Psychrobacter</i>	1,28%	0,61%	1,17%
<i>Coprococcus</i>	1,02%	1,22%	1,05%
<i>Pasteurella</i>	1,06%	0,28%	0,93%
<i>Acinetobacter</i>	0,89%	1,06%	0,92%
<i>Prevotella</i>	0,80%	1,02%	0,84%
<i>Ruminobacter</i>	0,74%	1,02%	0,79%
<i>Mannheimia</i>	0,04%	2,78%	0,49%

**Tabella 2:** Confronto tra le misure di  $\alpha$ -diversità del microbioma in vitelli con e senza lesioni ecografiche polmonari, riportate come media  $\pm$  deviazione standard. Il confronto degli indici di Shannon, Simpson e Chao1 riscontrati nei due gruppi non ha mostrato nessuna differenza statisticamente significativa (Tab. 2).

	Presenza di lesioni	Assenza di lesioni	<i>p</i> -value
Indice di Shannon	5,05 $\pm$ 1,88	5,41 $\pm$ 1,50	0,30
Indice di Simpson	0,81 $\pm$ 1,34	0,84 $\pm$ 1,25	0,86
Indice di Chao1	801,35 $\pm$ 296,22	776,36 $\pm$ 123,96	0,85

Nessuna differenza della struttura delle popolazioni microbiche è stata riscontrata negli animali con lesioni ecografiche se comparati con quelli senza ( $p=0,52$ ).



## Discussione

In questo studio, è stata utilizzata per la prima volta una tecnica di sequenziamento massivo del gene 16S rRNA al fine di ottenere una mappatura dell'intero microbioma nasofaringeo di vitelli di razza Piemontese. Grazie a tale metodica, è stato possibile identificare 4.232 OTU a livello delle prime vie respiratorie. Questo risultato preliminare suggerisce che il microbioma delle prime vie aeree del vitello di razza Piemontese sia rappresentato da una grande quantità di diverse microorganismi. Lo studio della composizione complessiva e della dinamica di una estesa comunità batterica risulta difficilmente praticabile a mezzo dei comuni metodi basati sull'approccio colturale (9). Il numero di *phyla* identificati nel presente studio risulta superiore ai 16 ottenuti da Timsit et al., campionando 30 bovini provenienti dallo stesso allevamento (29). Holman et al., hanno invece identificato 22 diversi *phyla* da 10 bovini provenienti da aziende differenti (15). L'analisi di questi dati, potrebbe suggerire che l'ambiente in cui vive l'animale possa influenzare direttamente la composizione del microbioma delle alte vie respiratorie. Le prime vie aeree sono infatti direttamente a contatto con l'ambiente esterno e la composizione del microbioma nasofaringeo potrebbe essere in parte influenzata dall'ambiente in cui vive l'animale.

In accordo con la letteratura (16, 19, 29), nel presente studio il microbioma nasofaringeo era rappresentato principalmente da 5 *phyla*: *Proteobacteria*, *Tenericutes*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Actinobacteria*. Tale riscontro mostra delle similitudini con i risultati ottenuti in medicina umana, dove sembrano prevalere *Proteobacteria*, *Firmicutes* e *Actinobacteria* (8). Il genere maggiormente riscontrato nel presente studio è stato *Mycoplasma*, presente in tutti i campioni analizzati con un abbondanza relativa maggiore dell'1%. La letteratura evidenzia come questo genere sia frequentemente riscontrato nel microbioma nasofaringeo del bovino con alta abbondanza relativa (16, 19, 29). Infatti, si ipotizza che alcune specie appartenenti al genere *Mycoplasma* siano commensali a livello di nasofaringe (14, 19, 21, 29). In particolare, i risultati del presente studio, portano ad ipotizzare il genere *Mycoplasma*, sia ampiamente diffuso nella regione Piemonte.

I risultati del nostro studio confermano come il genere *Moraxella*, oltre ad essere isolato in corso di cherato-congiuntivite infettiva bovina (IBK) (1), possa essere un importante componente della flora microbica nasofaringea del bovino (16, 29). Recenti studi, inoltre, hanno ipotizzato che vi sia una correlazione tra la presenza di questo genere e la patologia respiratoria (19).

Per confrontare il microbioma dei vitelli con e senza lesioni ecografiche polmonari sono stati utilizzati gli indici di Shannon, Simpson e Chao1. Questi indici permettono di valutare dal punto di vista qualitativo e quantitativo le caratteristiche del microbioma a livello di singolo campione o gruppo di campioni. Nel presente studio, questi indici, non differivano in maniera significativa fra i due gruppi di animali. Analogamente da quanto osservato da Lima et al su animali sani e affetti da BRD, il microbioma delle prime vie aeree sembrerebbe più influenzato dall'ambiente esterno piuttosto che dal microbioma delle vie aeree profonde (19).

La struttura delle comunità microbiche non differiva statisticamente tra i due gruppi di animali. Seppur questo risultato sia in disaccordo con la letteratura (15, 19), va interpretato con cautela. In relazione al ridotto numero di animali inclusi, infatti, non è stato possibile eseguire un'analisi approfondita, tenendo in considerazione la gravità delle lesioni ecografiche osservate. Inoltre, il riscontro di focolai di consolidamento polmonare non è necessariamente correlato alla presenza di un focolaio attivo d'infezione (3). Infine, essendo stata riscontrata, in medicina umana (4,8), una differenza tra il microbioma nasofaringeo e quello polmonare, si può ipotizzare che le basse vie respiratorie siano la sede più opportuna per gli studi sul microbioma in corso di patologia.

In conclusione, il sequenziamento massivo del gene 16S rRNA ha permesso di ottenere una visione complessiva della struttura microbica delle prime vie aeree in vitelli di razza Piemontese. Il microbioma nasofaringeo sembrerebbe fortemente influenzato dall'ambiente esterno sia in termini di numero sia in termini di distribuzione delle specie microbiche. I risultati preliminari ottenuti con questo studio suggeriscono che la mappatura del microbioma polmonare possa meglio definire il ruolo delle differenti popolazioni microbiche nella patogenesi della BRD.

## Bibliografia

1. Angelos J (2009) Infectious Bovine Keratoconjunctivitis. In: Smith B (ed) Large animal internal medicine, 4th edn. Mosby Elsevier, St. Louis, pp 1286–1288
2. Angen Ø, Thomsen J, Larsen LE, et al (2009) Respiratory disease in calves: Microbiological investigations on trans-tracheally aspirated bronchoalveolar fluid and acute phase protein response. *Vet Microbiol* 137:165–171.
3. Babkine M, Blond L (2009) Ultrasonography of the Bovine Respiratory System and Its Practical Application. *Vet Clin North Am - Food Anim Pract* 25:633–649.
4. Bassis CM, Erb-Downward JR, Dickson RP, et al (2015) Analysis of the Upper Respiratory Tract Microbiotas as the Source of the Lung and Gastric Microbiotas in Healthy Individuals. *MBio* 6:e00037–15.
5. Buczinski S, Forté G, Francoz D, Bélanger a. M (2014) Comparison of thoracic auscultation, clinical score, and ultrasonography as indicators of bovine respiratory disease in preweaned dairy calves. *J Vet Intern Med* 28:234–242.
6. Buczinski S, L Ollivett T, Dendukuri N (2015) Bayesian estimation of the accuracy of the calf respiratory scoring chart and ultrasonography for the diagnosis of bovine respiratory disease in pre-weaned dairy calves. *Prev Vet Med* 119:227–31.
7. Cernicchiaro N, White BJ, Renter DG, Babcock AH (2013) Evaluation of economic and performance outcomes associated with the number of treatments after an initial diagnosis of bovine respiratory disease in commercial feeder cattle. *Am J Vet Res* 74:300–309.
8. Charlson ES, Bittinger K, Haas AR, et al (2011) Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med* 184:957–63.
9. Cowan D, Meyer Q, Stafford W, et al (2005) Metagenomic gene discovery: Past, present and future. *Trends Biotechnol* 23:321–329.
10. Dickson RP, Erb-Downward JR, Huffnagle GB (2014) Towards an ecology of the lung: new conceptual models of pulmonary microbiology and pneumonia pathogenesis. *Lancet Respir Med* 2:238–46.
11. Edwards T a. (2010) Control methods for bovine respiratory disease for feedlot cattle. *Vet Clin North Am - Food Anim Pract* 26:273–284.
12. Gorden PJ, Plummer P (2010) Control, management, and prevention of bovine respiratory disease in dairy calves and cows. *Vet Clin North Am - Food Anim Pract* 26:243–259.
13. Griffin D (2010) Bovine Pasteurellosis and Other Bacterial Infections of the Respiratory Tract. *Vet Clin North Am - Food Anim Pract* 26:57–71.
14. Griffin D, Chengappa MM, Kuszak J, McVey DS (2010) Bacterial pathogens of the bovine respiratory disease complex. *Vet Clin North Am - Food Anim Pract* 26:381–394.



15. Holman DB, McAllister TA, Topp E, et al (2015a) The nasopharyngeal microbiota of feedlot cattle that develop bovine respiratory disease. *Vet Microbiol* 180:90–5.
16. Holman DB, Timsit E, Alexander TW (2015b) The nasopharyngeal microbiota of feedlot cattle. *Sci Rep* 5:15557.
17. Huffnagle GB, Dickson RP (2015) The bacterial microbiota in inflammatory lung diseases. *Clin Immunol* 159:177–182.
18. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, et al (2013) Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res* 41:e1.
19. Lima SF, Teixeira AG V, Higgins CH, et al (2016) The upper respiratory tract microbiome and its potential role in bovine respiratory disease and otitis media. *Sci Rep* 6:29050.
20. Marsh RL, Kaestli M, Chang AB, et al (2016) The microbiota in bronchoalveolar lavage from young children with chronic lung disease includes taxa present in both the oropharynx and nasopharynx. *Microbiome* 4:37.
21. Maunsell FP, Donovan GA (2009) *Mycoplasma bovis* Infections in Young Calves. *Vet Clin North Am - Food Anim Pract* 25:139–177.
22. Nicola I, Bertone I, Dondo A, et al (2016) Application of thoracic ultrasonography for the diagnosis of bovine respiratory disease in Piedmontese calves. In: *Atti LXX Convegno SISVet*. pp 141–142
23. Ollivett TL, Buczinski S (2016) On-Farm Use of Ultrasonography for Bovine Respiratory Disease. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 32:19–35.
24. Ollivett TL, Caswell JL, Nydam D V, et al (2015) Thoracic Ultrasonography and Bronchoalveolar Lavage Fluid Analysis in Holstein Calves with Subclinical Lung Lesions. *J Vet Intern Med* 29:1728–34.
25. Panciera RJ, Confer AW (2010) Pathogenesis and pathology of bovine pneumonia. *Vet Clin North Am - Food Anim Pract* 26:191–214.
26. Segal LN, Rom WN, Weiden MD (2014) Lung microbiome for clinicians: New discoveries about bugs in healthy and diseased lungs. *Ann Am Thorac Soc* 11:108–116.
27. Taylor JD, Fulton RW, Lehenbauer TW, et al (2010) The epidemiology of bovine respiratory disease: What is the evidence for predisposing factors? *Can Vet J* 51:1095–102.
28. Thompson PN, Stone a., Schultheiss W a. (2006) Use of treatment records and lung lesion scoring to estimate the effect of respiratory disease on growth during early and late finishing periods in South African feedlot cattle. *J Anim Sci* 84:488–498.
29. Timsit E, Workentine M, Schryvers AB, et al (2016) Evolution of the nasopharyngeal microbiota of beef cattle from weaning to 40days after arrival at a feedlot. *Vet Microbiol* 187:75–81.
30. White BJ, Renter DG (2009) Bayesian estimation of the performance of using clinical observations and harvest lung lesions for diagnosing bovine respiratory disease in post-weaned beef calves. *J Vet Diagn Invest* 21:446–453.



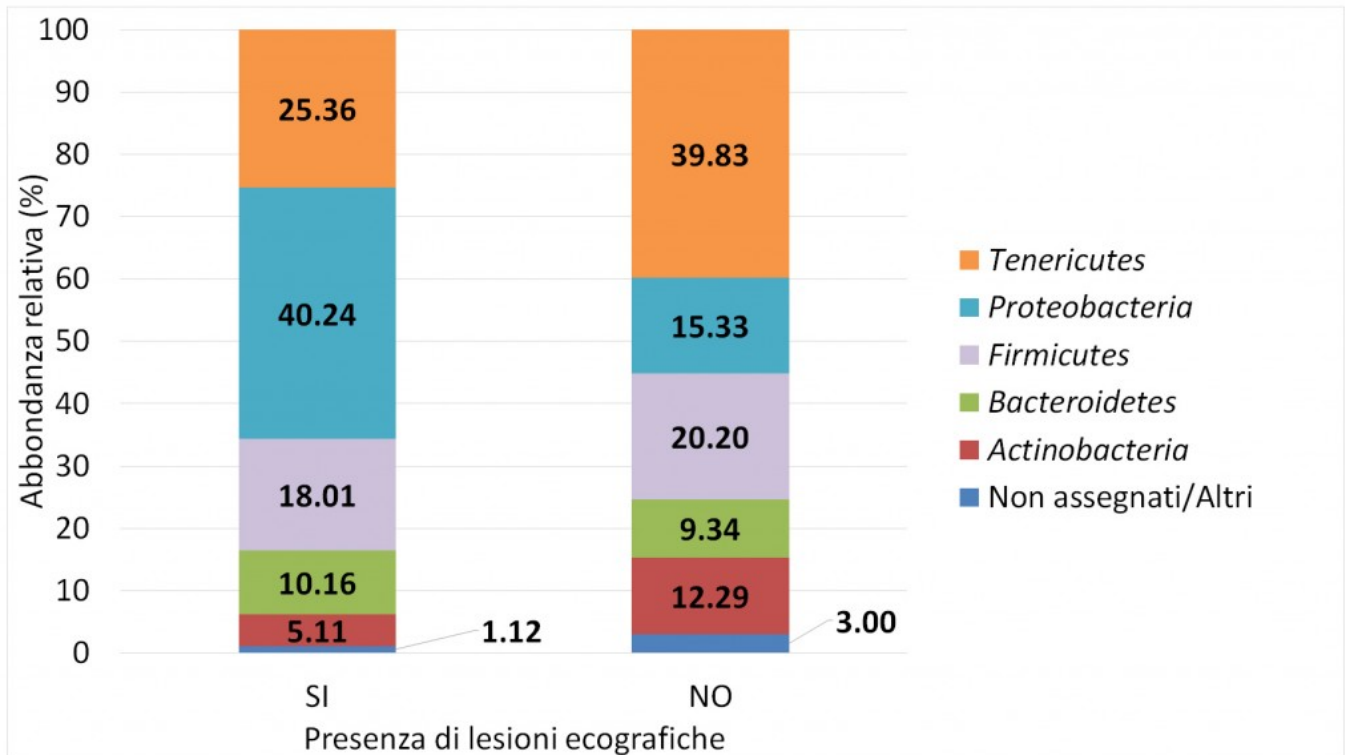


Fig. 2: Abbondanza relativa (%) dei 5 principali *phyla* identificati nei due gruppi di animali, suddivisi in base alla presenza di lesioni ecografiche polmonari.

Fig. 1: Distribuzione dei *phyla* (A) e dei generi (B) con abbondanza relativa superiore all'1% negli 11 vitelli campionati.

