



UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICO-VETERINARIE
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN PRODUZIONI ANIMALI
INNOVATIVE E SOSTENIBILI

**UTILIZZO DI PLASMA RICCO DI PIASTRINE (PRP) PER IL
TRATTAMENTO DELLE MASTITI CLINICHE E SUBCLINICHE
NELLE BOVINE DA LATTE: PRIMI APPROCCI**

**USE OF PLATELET-RICH PLASMA (PRP) FOR THE TREATMENT OF
CLINICAL AND SUBCLINICAL MASTITIS IN DAIRY COWS: FIRST
APPROACHES**

RELATORE:

Chiar.ma Prof.ssa Maria Cristina OSSIPRANDI

CORRELATORE:

Prof. Stefano GROLLI

Dott. ssa Valentina ANDREOLI

LAUREANDO/A:
Sharon CROCI

ANNO ACCADEMICO: 2021 – 2022



UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICO-VETERINARIE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN
MEDICINA VETERINARIA

**UTILIZZO DI PLASMA RICCO DI PIASTRINE (PRP) PER IL
TRATTAMENTO DELLE MASTITI CLINICHE E SUBCLINICHE
NELLE BOVINE DA LATTE: PRIMI APPROCCI**

**USE OF PLATELET-RICH PLASMA (PRP) FOR THE TREATMENT OF
CLINICAL AND SUBCLINICAL MASTITIS IN DAIRY COWS: FIRST
APPROACHES**

RELATORE:

Chiar.ma Prof.ssa Maria Cristina OSSIPRANDI

CORRELATORE:

Prof. Stefano GROLLI

Dott. ssa Valentina ANDREOLI

LAUREANDO/A:
Sharon CROCI

ANNO ACCADEMICO: 2021 – 2022

Sommario

| | |
|---|----|
| RIASSUNTO..... | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| 1. INTRODUZIONE: GLI ALLEVAMENTI DI BOVINE DA LATTE IN ITALIA..... | 3 |
| 1.1 PATOLOGIE PRODUTTIVE E RIPRODUTTIVE DELLA BOVINA DA LATTE | 4 |
| 1.2 LA MASTITE: DEFINIZIONE E PROFILI DI PATOGENICITA' | 7 |
| 1.2.1 CLASSIFICAZIONE DELLE MASTITI..... | 8 |
| 1.2.2 FATTORI DI RISCHIO DELLA MASTITE..... | 10 |
| 1.2.2.1 AGENTI PATOGENI | 11 |
| 1.2.3 I COSTI DELLA MASTITE | 18 |
| 1.2.4 MASTITE, QUALITA' DEL LATTE E CASEIFICAZIONE | 20 |
| 1.3 APPROCCI CLASSICI E ALTERNATIVI AL TRATTAMENTO DELLA MASTITE..... | 21 |
| 1.3.1 TRATTAMENTI CONVENZIONALI..... | 21 |
| 1.3.2 TRATTAMENTI INNOVATIVI: LA SOSTENIBILITA' AL CENTRO DELL'ALLEVAMENTO | 24 |
| 1.3.3 COS'E' IL PRP E COME VIENE PRODOTTO..... | 28 |
| 1.3.4 IMPIEGHI NOTI DEL PRP..... | 32 |
| 1.3.5 IL PRP NELL'ALLEVAMENTO DI BOVINE DA LATTE..... | 32 |
| 2. SCOPO DELLA TESI..... | 40 |
| 3. MATERIALI E METODI..... | 41 |
| 3.1 PROGETTAZIONE DELLO STUDIO E CRITERI DI INCLUSIONE DEGLI ANIMALI..... | 41 |
| 3.2 CAMPIONAMENTO E PREPARAZIONE DEI TRATTAMENTI..... | 42 |
| 3.3 SOMMINISTRAZIONE E FOLLOW UP | 51 |
| 4. RISULTATI | 53 |
| 5. DISCUSSIONE | 59 |
| 6. CONCLUSIONI..... | 65 |
| Bibliografia..... | 66 |
| RINGRAZIAMENTI | 73 |

RIASSUNTO

La mastite è, sicuramente, una delle patologie produttive delle bovine da latte, più impattante sia sul bilancio dell'azienda, sia sul benessere animale.

Oggi, la sostenibilità da parte degli allevamenti, soprattutto di quelli intensivi, è sempre più ricercata e la resistenza agli antibiotici da parte dei microrganismi patogeni rappresenta un problema sempre più attuale ed importante. È quindi, assolutamente fondamentale, cercare di trovare strategie di trattamento alternative.

L'utilizzo del plasma ricco di piastrine, o PRP, può essere considerato un approccio innovativo al trattamento della mastite nella bovina da latte, in quanto può aiutare i veterinari e gli allevatori a rendere più efficace e soprattutto prudente l'utilizzo degli antibiotici.

Lo studio svolto per questa tesi di laurea, ha avuto come scopo quello di analizzare gli effetti del PRP nel trattamento delle mastiti sia cliniche che subcliniche delle bovine di un allevamento della provincia di Parma.

Lo studio si è svolto nel periodo tra il 27 gennaio 2023 e il 20 marzo 2023, su nove bovine caratterizzate da quadri clinici riconducibili a mastite subclinica e su due bovine affette da mastite clinica.

Per la valutazione dell'efficacia del trattamento con PRP, si è fatto ricorso ad esami batteriologici ed alla conta delle cellule somatiche e cellule somatiche differenziali su campioni di latte proveniente da ciascuna bovina oggetto dello studio.

ABSTRACT

Mastitis is, undoubtedly, one of the most impactful dairy cattle production diseases on both farm budget and animal welfare.

Nowadays, sustainability on the part of farms, especially intensive ones, is increasingly sought after, and antibiotic resistance by pathogenic microorganisms is an increasingly topical and fundamental problem. It is therefore important to try to find alternative treatments.

The use of platelet-rich plasma, or PRP, can be considered an innovative approach to the treatment of mastitis in dairy cattle, as it can help veterinarians and farmers make the use of antibiotics more effective and, above all, prudent.

This degree thesis study had the aim of analyzing the effects of platelet-rich plasma (PRP) in the treatment of both clinical and subclinical mastitis in cows from a farm located in the province of Parma.

The study was carried out in the period between 27 January 2023 and 20 March 2023, on nine cows characterized by subclinical mastitis and on two cows affected by clinical mastitis.

For the evaluation of the efficacy of the PRP treatment, bacteriological tests and the count of somatic cells and differential somatic cells were used on milk samples from each cow under study.

1. INTRODUZIONE: GLI ALLEVAMENTI DI BOVINE DA LATTE IN ITALIA

Il patrimonio bovino italiano, secondo quanto riportato dall'Anagrafe Nazionale Zootecnica-Statistiche, è localizzato per più di due terzi nel Nord Italia, con il primato detenuto dalla Lombardia (più di 1.500.000 di capi a dicembre 2022, seguita dal Piemonte, dal Veneto e dall'Emilia Romagna (1).

Per quanto riguarda il numero di aziende invece si ha una distribuzione più omogenea, nonostante sul totale degli allevamenti il 45% sia comunque localizzato nel nord del paese: la Lombardia e il Veneto detengono il numero più alto, l'11% e 9,5% rispettivamente, seguite dal Lazio, Piemonte e Sicilia (1).

| SPECIE REGIONE | BOVINI NUMERO ALLEVAMENTI | NUMERO CAPI |
|-----------------------|---------------------------------|------------------|
| ABRUZZO | 3.990 | 63.026 |
| BASILICATA | 2.676 | 94.548 |
| BOLZANO | 7.905 | 121.154 |
| CALABRIA | 8.384 | 110.383 |
| CAMPANIA | 9.581 | 154.091 |
| EMILIA ROMAGNA | 6.124 | 562.004 |
| FRIULI VENEZIA GIULIA | 1.881 | 73.683 |
| LAZIO | 11.786 | 188.349 |
| LIGURIA | 1.030 | 11.885 |
| LOMBARDIA | 14.927 | 1.531.182 |
| MARCHE | 2.909 | 43.378 |
| MOLISE | 2.030 | 33.867 |
| PIEMONTE | 11.448 | 786.976 |
| PUGLIA | 3.931 | 167.652 |
| SARDEGNA | 9.347 | 282.339 |
| SICILIA | 10.422 | 328.655 |
| TOSCANA | 3.472 | 78.786 |
| TRENTO | 1.611 | 41.879 |
| UMBRIA | 3.170 | 56.702 |
| VALLE D'AOSTA | 1.941 | 32.349 |
| VENETO | 12.545 | 731.158 |
| Totale | 131.110 | 5.494.046 |

Figura 1: Dati forniti dalla BDN dell'Anagrafe Zootecnica istituita dal Ministero della Salute presso il CSN dell'Istituto "G. Caporale" di Teramo".

Per quanto riguarda invece la zona di produzione del Parmigiano Reggiano (Parma, Reggio Emilia, Modena, Bologna alla sinistra del fiume Reno, e Mantova a destra del fiume Po), dal

punto di vista del numero di allevamenti troviamo a Parma circa 1.400 allevamenti; a Reggio Emilia circa 1260 allevamenti; a Modena circa 1000 allevamenti; a Bologna circa 60 allevamenti; e a Mantova circa 570 allevamenti.

1.1 PATOLOGIE PRODUTTIVE E RIPRODUTTIVE DELLA BOVINA DA LATTE

Nell'allevamento bovino la biosicurezza è fondamentale per prevenire quelle malattie che potrebbero produrre, oltre a conseguenze sanitarie, un serio danno economico al commercio mondiale dei prodotti derivati (carne e latte), come già verificatosi in passato per la BSE (*Bovine Spongiform Encephalopathy* ovvero Encefalopatia Spongiforme Bovina), per la Blue Tongue e, in alcuni paesi, per epidemie da Afta epizootica (2).

Con il termine “biosicurezza” si intendono tutte quelle misure necessarie a prevenire l'introduzione di determinate malattie all'interno dell'allevamento o, nel caso fossero già presenti, a limitarne la diffusione (3).

La definizione di piani efficaci per la biosicurezza in Italia non è un'impresa facile a causa della estrema varietà di tipologie di allevamento, sia per il tipo di produzione (carne o latte), densità (intensivo o estensivo), stabulazione (fissa o libera), destinazione del prodotto finale (latte crudo o caseificazione) e area geografica (pianura o alpeggio). Le misure adottate dovranno, quindi, essere specifiche per ogni situazione (3).

Per poter elaborare le misure di biosicurezza è assolutamente necessario comprendere l'interazione tra animale, ambiente e patogeno (determinante di malattia), all'origine della malattia. La sola esposizione ad un agente patogeno, infatti, non è di per se sufficiente a causare la malattia, poiché entrano in gioco diversi altri fattori di rischio che, se opportunamente minimizzati, possono aiutare a prevenirla.

Gli agenti patogeni (virus, batteri, funghi e parassiti) possono diffondersi principalmente attraverso le vie aeree, per contatto diretto, trasmissione sessuale e transplacentare oppure indirettamente attraverso oggetti contaminati o per via orale (ad esempio attraverso gli alimenti), e tramite vettori (3). Per quanto riguarda la bovina, i fattori di rischio variano in base all'età, la razza, lo stato immunitario, la conformazione della mammella, lo stadio di lattazione,

il livello produttivo e il periodo post-partum. È ormai risaputo che prolungati periodi di stress causano l'abbassamento delle difese immunitarie dell'animale, esponendolo perciò alla malattia. Lo stress può essere generato da cattive condizioni ambientali (livello igienico-sanitario), strutturali e di management dell'azienda, nonché dal rapporto uomo-animale (3).

Le bovine da latte ad alta produzione vanno incontro a numerosi problemi sanitari derivanti dal bilancio energetico negativo delle prime settimane di lattazione che risultano notevolmente presenti nella stagione calda, portando (nei casi più gravi) anche alla morte dell'animale (4).

Patologie come dislocazioni abomasali, mastiti, ritenzioni placentari, aumento del periodo inter-parto, paresi e para-paresi puerperali sono la punta dell'iceberg di una situazione generalizzata di malessere (stato para-fisiologico) (4).

La selezione genetica per l'elevata produzione di latte ha favorito la capacità da parte della bovina di mobilizzare il tessuto adiposo e muscolare finalizzato alla produzione di latte. Questo avviene nel momento in cui dal periodo di asciutta comincia la sintesi di latte che, insieme alla crescita del feto e quindi alla maggiore richiesta di nutrienti da parte della placenta, aumenta notevolmente e in modo repentino il fabbisogno energetico dell'organismo, che però non riesce ad essere compensato dalla dieta (5). Nelle prime settimane dopo il parto la bovina entra in una fase di bilancio energetico negativo in cui la carenza di glucosio e l'aumentata richiesta di amminoacidi e acidi grassi vengono compensate dall'utilizzo delle riserve lipidiche e muscolari (3).

Ne risulta una riduzione del BCS (*Body Condition Score*), a cui, in un 50% dei casi, si associa chetosi subclinica e lipidosi epatica (5). Quest'ultima può inoltre contribuire a peggiorare l'immunosoppressione già presente normalmente nel periodo di transizione e che è data dall'alterazione di alcune cellule infiammatorie ed ha lo scopo di proteggere il feto da possibili risposte immunitarie materne (fenomeni di auto-immunità), predisponendo la bovina ad infezioni specialmente a livello uterino (metrite ed endometrite) (5). Queste condizioni cliniche, ma anche lo stesso BCS ridotto, sono causa della ridotta fertilità in allevamento e dell'aumento dell'intervallo parto-concepimento, problemi non sempre risolvibili e che, in alcuni casi, rendono necessaria la riforma dell'animale (6).

Tutto ciò evidenzia l'importanza di una corretta nutrizione della bovina durante il periparto per evitare condizioni prolungate di bilancio energetico negativo (3).

Diversi studi hanno osservato la presenza di una correlazione positiva tra l'aumento della produzione di latte e l'incidenza di mastiti che viene misurata attraverso l'osservazione delle forme cliniche e la conta delle cellule somatiche (7). Esiste infatti un antagonismo tra i tratti genetici che predispongono alla resistenza alla mastite e quelli per la maggiore produzione di latte e la facilità di mungitura (3). Per questo una possibile soluzione per ridurre l'incidenza di infezione alla mammella, può essere quella di selezionare i tratti genetici di resistenza alla mastite nei programmi di selezione dei bovini da latte, in associazione ad un corretto management dell'azienda. I fattori principali, infatti, che entrano in gioco nel determinare la malattia, ancora prima della predisposizione genetica, sono l'igiene degli ambienti e della mungitura, e la struttura della stalla (8). È stato, infatti, ampiamente dimostrato come la stabulazione fissa e l'area di decubito su cuccette aumentino il rischio di infezione o trauma alla mammella, soprattutto se associati a materiale da lettiera scarso o inadeguato (8).

La mastite è, con l'infertilità, la maggior causa di eliminazione delle vacche da latte (tasso di riforma); inoltre, entrambe queste patologie, comportano anche elevati costi che gravano, in modo significativo, sul conto economico dell'azienda (9).

Data la complessa multifattorialità della mastite, la gestione consiste in un'ampia gamma di attività, tra cui il trattamento, l'asciutta selettiva, la prevenzione e il miglioramento del sistema immunitario dell'animale (10).

Oltre al costo di sostituzione di vacche riformate per le conseguenze di mastiti gravi o ricorrenti con manze da rimonta, occorre considerare le ore di lavoro supplementare dell'allevatore e/o dei mungitori, i costi dei farmaci, degli esami diagnostici, degli interventi veterinari, dei costi di prevenzione sulle altre bovine, la minor produzione di latte, il più basso prezzo di pagamento a qualità del latte e il peggioramento delle rese e della qualità dei prodotti ottenuti (9).

In pochissimi Paesi (in particolare in quelli scandinavi) sono disponibili *database* nazionali attendibili e sistematici sulle diagnosi cliniche della mastite e sui relativi trattamenti sanitari agli animali (9).

Negli altri Paesi si deve ricorrere ad una selezione indiretta generalmente basata sull'inclusione, nell'indice di selezione, del contenuto del latte di cellule somatiche (SCC: *Somatic Cell Count*) o del suo indice logaritmico (SCS: *Somatic Cell Score*) (9).

Inoltre, si è visto come il rapporto tra cellule somatiche e proprietà casearie del latte non sia lineare, ma come il latte presenti difetti tecnologici sia se presenta un contenuto di cellule somatiche alto, ma anche se ne ha uno estremamente basso. Appare, dunque, evidente l'esigenza di superare il ricorso al dato relativo alle cellule somatiche come unica fonte di informazione sulla salute della mammella e sulle correlate alterazioni delle proprietà tecnologiche del latte (9).

1.2 LA MASTITE: DEFINIZIONE E PROFILI DI PATOGENICITA'

La mastite bovina è definita come un'infezione della ghiandola mammaria. La patogenesi può essere sia di natura non infettiva che infettiva (batteri, funghi, micoplasmi, lieviti) nonostante ciò, la maggioranza delle infezioni attualmente caratterizzate sono prevalentemente di natura batterica. L'infezione batterica determina lo sviluppo di un processo infiammatorio con conseguente alterazione della composizione del latte ed una minore resa degli animali durante la lattazione (11; 12).

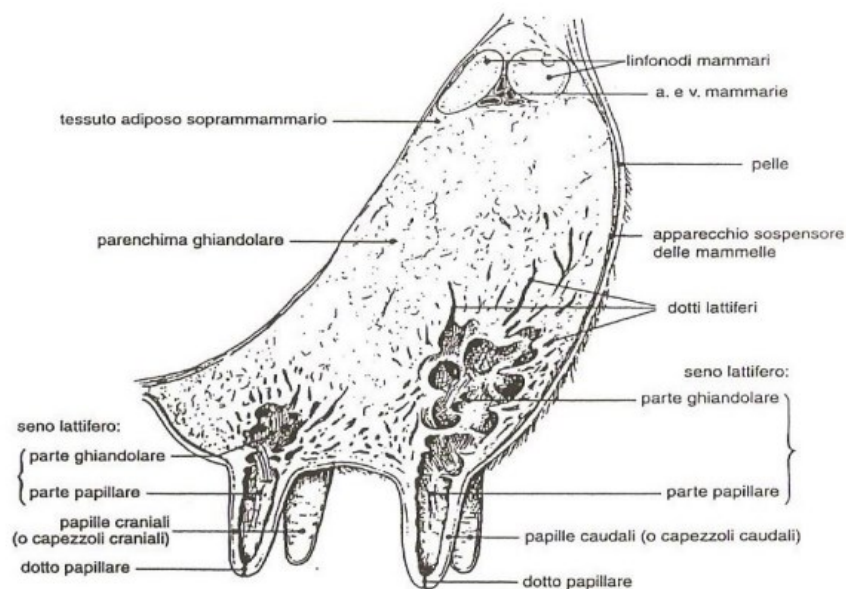


Figura 2: Conformazione interna delle mammelle di Vacca. (Da Bortolami et al., 2006).

Le difese immunitarie della mammella rappresentano un insieme di elementi, cellulari e umorali (immunoglobulina, in particolare Ig A), che hanno lo scopo di difenderla dalle infezioni (13).

Il capezzolo rappresenta la “porta d’ingresso” per i microrganismi. A questo livello, si trovano le prime difese anatomiche: sfintere capezzolare ed epitelio del canale del capezzolo, ai quali sono associati i relativi meccanismi di difesa sia umorale che cellulare (12). Le perdite causate da questa patologia sono duplici: in primo luogo il capo affetto da mastite si trova in una condizione non ottimale che, nel caso della forma clinica, può degenerare in dolore, febbre e nella generale riduzione del benessere dell’animale. In secondo luogo, lo stato di salute precario della bovina in mastite porta ad una produzione ridotta e quindi a perdite economiche rilevanti sia dirette che indirette. Le perdite dirette includono i costi del trattamento antibiotico, il latte scartato a causa dei giorni di sospensione obbligatoria indicati dopo l’uso dei farmaci, la manodopera dell’operatore che impiega più tempo nella gestione del capo in fase di mungitura, la percentuale di mortalità degli animali (alcune forme di mastite acuta come le mastiti da *E. coli* possono evolvere in forme setticemiche e risultare letali) e le possibili recidive (che generano un tessuto cicatriziale che rende il tessuto mammario incapace di azione secretiva). Le perdite indirette, invece, includono la minore produzione di latte, il peggioramento della qualità del latte, eventuale asciutta anticipata, peggioramento di vari aspetti del benessere animale e sensibilità maggiore nei confronti di altre patologie dovuto ad un forte impiego del sistema immunitario correlato alla mastite (14).

1.2.1 CLASSIFICAZIONE DELLE MASTITI

Esistono diverse forme di mastite che possono essere suddivise in categorie sulla base sia del conteggio delle cellule somatiche, sia sulla presenza/assenza e specificità del patogeno che causa lo stato infiammatorio (15).

La conta delle cellule somatiche, anche in assenza di batteri patogeni, può fornire utili indicazioni sullo stato sanitario stesso della mammella.

Sono definite “cellule somatiche” tutti gli elementi cellulari del latte, in particolare leucociti di origine ematica (> 90%) e cellule epiteliali di origine mammaria (< 10%) (14).

Nel corso del tempo sono stati effettuati moltissimi studi per comprendere a pieno la patogenesi della mastite. Ad oggi, grazie a questi studi ed all'applicazione di criteri oggettivi, è stata strutturata una classificazione condivisa in ambito internazionale che si basa principalmente su due punti cardine: caratteristiche del latte e stato della mammella (12).

Secondo questa classificazione internazionale, le mastiti possono essere suddivise in base alla gravità della sintomatologia generale in: mastiti latenti, sub-cliniche, acute e croniche. Le mastiti causate da microrganismi patogeni possono essere ulteriormente suddivise sulla base del tipo di batterio isolato in mastiti contagiose, ambientali o mastiti sostenute da batteri opportunisti.

La mastite di tipo latente è caratterizzata dalla presenza di un'infezione rilevabile esclusivamente attraverso specifici esami batteriologici, ma con assenza di alterazioni visibili a livello di secreto e, soprattutto in assenza di una specifica risposta cellulare (cellule somatiche < 100.000 cellule/ml). Questa infezione rappresenta la fase iniziale del processo infettivo e può evolvere in forme più gravi, oppure guarire spontaneamente grazie all'intervento delle difese immunitarie dell'animale (12). Nelle fasi iniziali e finali delle forme sia cliniche che sub-cliniche, possono presentarsi stati intermedi nei quali l'animale presenta un contenuto cellulare del latte compreso tra 100.000 e 200.000 cellule/ml associati ad esame batteriologico negativo. La mastite subclinica è caratterizzata da un contenuto cellulare superiore a 200.000 cellule/ml, accompagnate da esame batteriologico che può essere sia positivo che negativo. Questa mastite, come la forma precedente, è caratterizzata dalla totale assenza di sintomatologia clinica e la diagnosi può essere effettuata solo a seguito di analisi delle cellule somatiche nel latte. Questo tipo di mastite colpisce circa il 30% degli animali in lattazione e presenta un 30/35% di possibilità di involvere autonomamente (risoluzione spontanea). Tuttavia, i casi che non vanno incontro ad un'involuzione possono evolvere in forme cliniche (15).

La mastite clinica è la forma più aggressiva di infiammazione mammaria della bovina ed è rilevabile visivamente (rilevabile già ad un esame obiettivo generale). Si manifesta con alterazioni del latte (presenza di stoppini, aspetto sieroso), e/o della mammella (aumento di volume, arrossamento, dolore alla palpazione, secrezione ridotta o assente). Il contenuto cellulare può essere di diversi milioni di cellule/ml e l'esame batteriologico può risultare sia positivo che negativo. La mastite clinica può essere classificata a sua volta in base alla gravità in:

- Forma lieve, quando sono presenti alterazioni solo a livello di secrezione, ma il quarto si presenta normale;
- Forma moderata quando si osserva un risentimento a livello di quarto con calore, dolore ed eventualmente edema (quadro tipicamente infiammatorio). In questi casi può essere interessato solo il quarto, senza alterazioni a livello di secrezione;
- Forma grave quando accanto ai sintomi descritti per la forma lieve e moderata, compaiono sintomi generali quali febbre, anoressia e calo produttivo. Solitamente, questa forma ha un'insorgenza improvvisa (12).

La mastite cronica, infine, è un'infezione mammaria persistente accompagnata da rialzo costante del contenuto cellulare, generalmente associata a progressivi indurimenti e/o presenza di noduli a livello del parenchima mammario. La forma cronica può, a volte, dare origine a forme cliniche per lo più di forma lieve o moderata (12). La cronicizzazione comporta un numero medio di cellule somatiche nel latte costantemente elevato, ad indicare la cronicizzazione dell'iniziale stato infiammatorio della mammella.

1.2.2 FATTORI DI RISCHIO DELLA MASTITE

Vi sono diversi fattori di rischio noti per essere associati all'incidenza della mastite bovina che svolgono un ruolo significativo nella sua genesi ed evoluzione clinica: agenti patogeni, singolo individuo e fattori ambientali secondo la classica logica (Figura 2) della triade epidemiologica (13). Tutti questi fattori sono stati presi in considerazione nei programmi di controllo delle mastiti (16).

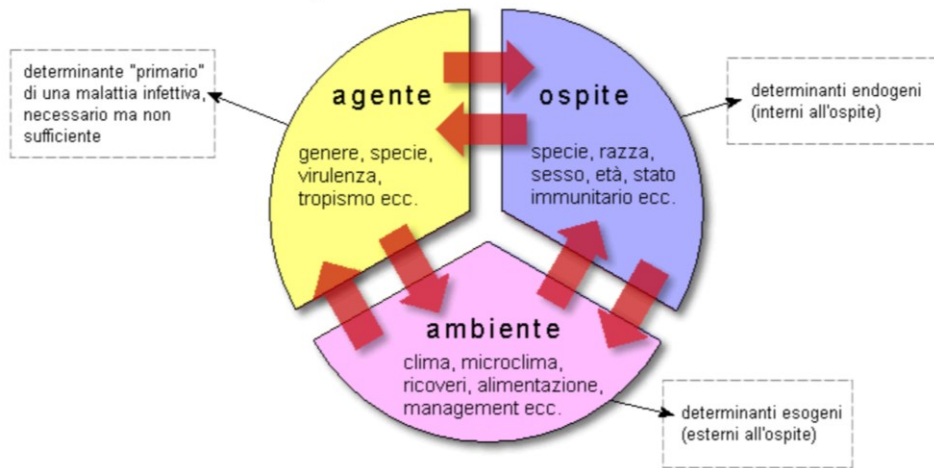


Figura 2: rappresentazione della "triade epidemiologica". Tratto da <https://www.quadernodiepidemiologia.it/epi/defin/determ.htm>

1.2.2.1 AGENTI PATOGENI

Le infezioni batteriche intramammarie (IMI: *Intramammary Infection*) sono considerate la principale causa di mastite nella specie bovina all'interno dell'industria lattiero - casearia. Molte sono le specie batteriche che sono state identificate come agenti che causano mastite (17).

Queste infezioni causate da microrganismi possono essere classificate in due categorie in base all'origine dei batteri: mastite contagiosa e mastite ambientale (18).

I batteri mastidogeni appartengono principalmente ai Gram positivi, ma sono relativamente frequenti anche le infezioni da Gram negativi. In letteratura sono stati segnalati anche casi saltuari di mastite causata da lieviti, muffe, e Alghe, in particolare *Prototheca* (12) .

Come precedentemente accennato, i determinanti di malattia batterici responsabili della forma infiammatoria possono essere classificati in base alle loro caratteristiche epidemiologiche. Si parla infatti di batteri contagiosi, batteri ambientali e batteri opportunisti (che danno il nome della rispettiva forma infiammatoria) (12).

Agenti patogeni contagiosi come *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, e i meno comuni *Mycoplasma bovis* e *Corynebacterium spp.*, si possono ritrovare su tutta la

mammella e sul singolo capezzolo, colonizzando e crescendo nel canale del capezzolo stesso (19).

Si diffondono soprattutto durante le operazioni di mungitura (contaminando le componenti dell'impianto, in particolare le tettarelle), ma possono essere favoriti anche da manualità non corrette come l'uso di stracci e/o carta per più di un animale o contaminazione delle mani del mungitore stesso (12).

Normalmente, a seguito dell'instaurazione di un'infezione, il numero medio di cellule somatiche dell'animale contagiato aumenta. Questo fenomeno sfocia in una mastite subclinica e meno frequentemente in forme cliniche lievi. Le cellule somatiche risultano elevate per lunghi periodi di tempo e le perdite produttive si dimostrano consistenti. (12).

Le cellule somatiche vengono considerate indicatrici dell'infezione da batteri mastidogeni, e sono costituite fondamentalmente da leucociti (neutrofili, macrofagi, linfociti e eritrociti) e cellule epiteliali (20).

Questi agenti patogeni sono in grado di stabilire infezioni subcliniche, solitamente, con un aumento della SCC.

Le infezioni contagiose possono essere controllate riducendo il contatto tra vacche infette e vacche non infette. Pertanto, un'adeguata manutenzione delle attrezzature per la mungitura, la disinfezione del capezzolo post -mungitura, l'abbattimento e l'asciutta selettiva o DCT (*Dry Cow Therapy*) sono importanti per prevenire infezioni contagiose (21).

A differenza degli agenti patogeni contagiosi, gli agenti patogeni ambientali di solito non vivono sulla mammella e sul capezzolo, infatti si trovano tipicamente nelle corsie della stalla e nelle lettiere. Vengono descritti come agenti patogeni opportunistici che "attendono" le giuste condizioni per innescare l'infezione (13).

Ad esempio, possono entrare nel canale del capezzolo durante la mungitura oppure quando l'immunità naturale della vacca è scarsa, causando mastite clinica. Patogeni ambientali come *Escherichia coli* o *Streptococcus uberis* invadono e si moltiplicano nel capezzolo, inducono una risposta immunitaria dell'ospite e vengono rapidamente eliminati (22).

È stato riportato come un'ampia gamma di specie batteriche causi la mastite ambientale, in particolare *Streptococcus spp.* (es. *Strep. uberis*), alcuni coliformi (es. *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*), *Pseudomonas spp.*, ect. (23)

Attualmente, *S. aureus* rappresenta il microrganismo patogeno maggiormente isolato in Italia (a maggiore prevalenza) e in molti altri paesi, prendendo il posto di *S. agalactiae* (12).

Staphylococcus aureus è il più diffuso patogeno Gram-positivo noto per essere associato a varie forme di mastite clinica e subclinica (24). Il *reservoir* fondamentale di *S. aureus* è la ghiandola mammaria cronicamente infetta, mantenendo quindi l'igiene della mammella e dell'impianto di mungitura è possibile ridurre le possibilità di infezione da una vacca infetta ad una sana (25). *S. aureus* non innesca nella vacca una risposta immunitaria forte come ad esempio *E. coli*, quindi, essendo l'infezione da *S. aureus* più lieve, può portare a mastite cronica che dura per alcuni mesi (26). *S. aureus* produce svariati enzimi degradativi e tossine che danneggiano irreversibilmente il tessuto della ghiandola mammaria, che porterà ad una diminuzione della produzione di latte (24).

Il trattamento delle infezioni da *S. aureus* prevede l'utilizzo di antibiotici. Tuttavia, Rainard e collaboratori (25) hanno ampiamente dimostrato come il trattamento antibiotico non costituisca un metodo efficiente a causa della resistenza sviluppata da *S. aureus* nei confronti degli antibiotici β -lattamici, in particolare, verso meticillina. I ceppi di *S. aureus* noti come resistenti alla meticillina (MRSA: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), posseggono un gene chiamato *mecA* che conferisce la resistenza a questa molecola (27). Oltre a questo, l'abilità di *S. aureus* è quella di generare biofilm (gruppi di cellule batteriche racchiuse in una matrice autoprodotta (esopolisaccaridi, proteine, acidi teicoici, enzimi e DNA), aderente a superfici biotiche o abiotiche) e adattarsi all'ambiente ospite. Tutte queste caratteristiche lo rendono un obiettivo ancora più difficile per il trattamento (28).

S. aureus produce inoltre un esopolisaccaride che lo aiuta ad aderire alle cellule dell'epitelio mammario e acquisire nutrienti, permettendogli di sopravvivere in un ambiente ostile, così come lo aiuta a proteggersi da stress ambientali quali trattamenti antibiotici e disinfettanti (29).

Quindi sono necessari opportuni trattamenti che vadano ad inibire come prima cosa la capacità di *S. aureus* di formare biofilm (29).

Streptococcus agalactiae è un patogeno Gram-positivo che causa mastite di tipo contagioso. Si può ritrovare nel tratto gastrointestinale della bovina così come nell'ambiente in cui stabulano le vacche da latte. Può essere trasmesso attraverso il processo di mungitura o per via oro-fecale, in particolare bevendo acqua contaminata da deiezioni; pertanto, uno studio recente ha dimostrato che il mantenimento dell'igiene della mammella e della mungitura non è sufficiente per il controllo di *S. agalactiae*, ma dovrebbe essere presa in considerazione anche la gestione delle deiezioni e dell'ambiente stesso (Kibebew, 2017). *S. agalactiae* causa mastite subclinica con elevata SCC e diminuita produzione di latte anche se non sono state evidenziate anomalie nel latte (Kibebew, 2017). Può sopravvivere nella ghiandola mammaria, formando un biofilm che gli permette di aderire e persistere nella ghiandola mammaria per lunghi periodi di tempo (Rosini & Margarit, 2015).

I batteri ambientali comprendono sia gli streptococchi (diversi da *S. agalactiae*) come per esempio *S. uberis*, *S. bovis* e *S. faecalis* come pure batteri Gram negativi quali *E. coli*, *Klebsiella* spp. ed *Enterobacter* spp (12). Questa categoria di batteri ha il proprio *reservoir* nell'ambiente circostante (lettieria) e la frequenza delle infezioni è correlata all'aumento della carica batterica ambientale. Questa situazione può essere determinata da fattori climatici come l'umidità e la temperatura, da fattori aziendali come un'elevata densità degli animali in rapporto alla superficie di stabulazione disponibile ed una scarsa igiene della lettiera e delle procedure di mungitura (12).

Questi microrganismi determinano mastiti per lo più cliniche, in forma lieve, moderata o grave. In particolare, *E. coli* e gli altri batteri Gram negativi sono frequentemente causa di mastiti cliniche gravi ad insorgenza acuta o iper-acuta. Le perdite economiche date da questi microrganismi sono consistenti sia per quanto riguarda la riduzione della produzione sia per gli interventi terapeutici che è necessario adottare (12).

Il controllo delle infezioni ambientali può essere ottenuto ad esempio riducendo l'esposizione delle estremità dei capezzoli ai patogeni ambientali e aumentando la resistenza della vacca alle IMI mediante vaccinazione ed un eventuale trattamento antibiotico mirato (24).

Escherichia coli è il patogeno Gram-negativo più frequente. Invade la mammella attraverso il capezzolo, prolifera (stipite caratterizzato da un rapido tempo di generazione) e attiva la risposta infiammatoria. Può essere trovato nell'ambiente, come ad esempio nella lettiera, soprattutto in condizioni di umidità elevata (21). La mastite causata da *E. coli* è solitamente clinica e transitoria. I sintomi sono diversi e possono variare da lievi con solo segni locali (rossore e gonfiore della mammella) a quadri clinici gravi (febbre intensa) (21).

E. coli può persistere nella ghiandola mammaria, causando infezioni ricorrenti di mastite che sono difficili da trattare, forse a causa della capacità di produrre biofilm a diversi livelli (30)

La mastite clinica acuta causata da *E. coli* può generare un danno irreversibile al tessuto ghiandolare ma anche completa perdita di produzione di latte, e talvolta può avere esito infausto (morte della vacca).

E. coli induce rapidamente una risposta infiammatoria nell'ospite. Il fattore di virulenza meglio conosciuto per scatenare la risposta infiammatoria è l'endotossina, che si trova sulla membrana esterna di *E. coli*, nota come lipopolisaccaride (LPS) (30).

All'interno del Genere *Enterococcus*, *Enterococcus faecalis* è considerato quello predominante. Sono patogeni ambientali Gram-negativi presenti nel materiale organico della lettiera. *E. faecalis* fa parte di quei batteri che portano alla formazione di biofilm (31). Inoltre, sia *E. faecalis* che *E. faecium* sono resistenti a diversi antibiotici come lincomicina, tetraciclina, kanamicina, streptomicina, quinupristin/dalfopristin (Synercid), eritromicina, cloramfenicolo e tilosina (32). Questo profilo di resistenza porta a frequenti e persistenti infezioni da enterococchi, difficili da trattare (31).

Streptococcus uberis è un patogeno ambientale che causa sia mastiti acute, associate a manifestazioni cliniche che mastiti subcliniche (33). È stato riportato che l' α -caseina e la β -caseina nel latte inducono la produzione di biofilm, che aiuta *S. uberis* a persistere nell'ambiente anche sotto stress fisici e chimici ed a resistere al trattamento antibiotico (30). È stata riscontrata la presenza di questo patogeno in diversi distretti anatomici della bovina,

tra cui labbra, tonsille, pelle, cavità orale, rumine, vie respiratorie, retto, orifizio del capezzolo, canale del capezzolo, mammelle, feci e ferite (34).

I batteri opportunisti comprendono gli stafilococchi coagulasi – negativi, ovvero, tutte le specie che non vengono classificate come *S. aureus* e fanno parte della normale flora presente sulla cute sana dei capezzoli. Tuttavia, questi microrganismi possono sopravvivere e moltiplicarsi anche nella lettiera. Questo gruppo è quello più frequentemente isolato nei campioni di latte. Se sono presenti determinate condizioni favorevoli, quali la depressione del sistema immunitario degli animali e l'alterazione delle normali difese del capezzolo (lesioni allo sfintere, evaginazione dello stesso, alterazione della circolazione ematica locale), questi microrganismi possono divenire agenti di mastite clinica o possono causare un aumento del contenuto cellulare del latte. L'andamento del tasso di infezione, in base ai giorni di lattazione è relativamente costante, solo gli stafilococchi tendono ad aumentare al crescere dei giorni di lattazione (12).

In uno studio redatto dal Professor Zecconi e dal suo gruppo di ricerca nel 2009, è stato analizzato l'andamento delle infezioni da batteri ambientali anche in funzione dell'età degli animali, ed è stato dimostrato come animali di età diverse abbiano tassi di malattia differenti. Degli animali presi in considerazione, il 3 – 4 % delle primipare, risultava positivo a batteri ambientali fino a 300 giorni di lattazione, quando si osservava un evidente aumento della percentuale di animali positivi. Nelle secondipare, all'inizio della lattazione, solo il 5% risultava positivo, percentuale che poi cresceva fino al 7% a 200 giorni di lattazione per poi diminuire col progredire della lattazione. Infine, nelle pluripare si è osservato un progressivo aumento di animali positivi, fino a 120 giorni di lattazione, a cui è seguita una lieve riduzione fino a 210 giorni di lattazione. Nella fase finale di lattazione degli animali pluripari, il tasso di positività aumentava nuovamente (35).

Questo studio ha anche dimostrato come la comparsa delle mastiti provocate prevalentemente da batteri ambientali sia fortemente influenzata dalla stagionalità: i coliformi, per esempio, aumentano in base alla temperatura della lettiera. La crescita dei batteri coliformi è stabile a 22 °C, aumenta tra 30° e 44 °C e decresce oltre i 50 °C. Il tasso di infezioni intramammarie da coliformi tende ad essere più elevato durante l'estate rispetto alle altre stagioni. Le infezioni da streptococchi risultano invece meno influenzate dalla stagione, ma sono comunque più

frequenti quando le condizioni di temperatura e soprattutto umidità elevate ne favoriscono lo sviluppo (35).

Fattore “ospite”

Allevamento e genetica: fattori genetici e modalità di allevamento della vacca da latte hanno effetto sulla suscettibilità e/o resistenza alla mastite. Bovine di razza pura o incroci di razze ad alto rendimento, in particolare la razza frisona, sembrano essere geneticamente più vulnerabili alla mastite rispetto alle razze che danno una resa media, non ad alto rendimento (36). Ad esempio, è stato segnalato che le bovine di razza Jersey hanno un tasso inferiore di mastite rispetto alle bovine di razza frisona (37).

Le bovine di razza Rendena, originarie dell'Italia nord-orientale, hanno dimostrato una maggiore resistenza alle malattie, tra cui la mastite (37).

Inoltre, le vacche pluripare risultano più vulnerabili rispetto alle primipare a causa dell'immuno - incompetenza (36).

Struttura della mammella: influenza anche la suscettibilità all'infezione. Animali con grande mammella a forma di imbuto, con capezzoli a forma pendolare e i quarti ciechi dopo il parto sono a maggior rischio di mastite subclinica (38). Anche le dimensioni del capezzolo e la distanza del capezzolo dal pavimento possono aumentare quindi la presenza di IMI (38).

Età: altro fattore che influenza le infezioni. Vacche più anziane sono più suscettibili alle infezioni, molto probabilmente a causa del canale del capezzolo più ampio o permanentemente parzialmente aperto (19). Inoltre, l'epitelio mammario delle vacche più anziane potrebbe essere più permeabile, a causa di danni irreversibili causati da precedenti infiammazioni (39). Inoltre, fattore non trascurabile è la reattività immunologica che risulta, chiaramente, meno efficace in soggetti o molto giovani o in soggetti anziani.

Periodo di transizione: è così definito il periodo che inizia a 3 settimane prima del parto. Viene anche indicato e definito come periodo periparto. Le vacche sono considerate a più alto rischio di contrarre infezioni come la mastite durante questo periodo (40). Uno studio ha dimostrato che le IMI si verificano maggiormente durante il periparto e, soprattutto, nel

primo mese di lattazione (41). È stata segnalata un'elevata incidenza di mastiti a causa dell'immunosoppressione, associata all'aumento di stress ossidativo (42).

Stress nutrizionale e sistema immunitario: durante l'allattamento, vi è una maggiore richiesta di energia e nutrienti per la sintesi di colostro e latte da parte delle bovine da latte. Così, quando l'assunzione della razione giornaliera non soddisfa le esigenze di allattamento/lattazione, le vacche mostrano un bilancio energetico negativo (19). Il bilancio energetico negativo è associato alle carenze dietetiche di oligoelementi (selenio, ferro, rame, zinco, cobalto, cromo), amminoacidi (cioè lisina, L-istidina) e vitamine (cioè A, C, E, β -carotene, licopene), che portano all'immunosoppressione a livello cellulare e livello umorale durante l'inizio della lattazione, aumentando di conseguenza la suscettibilità alle infezioni (36). Pertanto, la gestione corretta della dieta durante il periodo di transizione, come l'integrazione di vitamina E e zinco, è fondamentale per prevenire le mastiti e per aumentare la produzione di latte (36).

Fattori ambientali: Condizioni ambientali e pratiche di buona gestione dell'allevamento hanno effetti decisivi sulla salute e sul benessere degli animali. Mantenere l'ambiente d'allevamento pulito e confortevole può ridurre l'incidenza e la gravità delle mastiti. Elevata densità di allevamento, pavimentazioni contaminate, lettiera bagnata, scarsa ventilazione, caldo e umidità possono favorire la crescita di agenti patogeni della mastite, con una maggiore esposizione delle vacche, con conseguente maggiore presenza di mastite (42) (36).

1.2.3 I COSTI DELLA MASTITE

Le mastiti continuano ad essere una delle principali cause di perdita economica nell'allevamento di bovine da latte (43).

Vi è attualmente una richiesta generale di regolare monitoraggio, registrazione e ricerca per stabilire l'incidenza e la prevalenza della mastite (43).

Esiste, però, molta confusione tra i termini “perdita economica”, “spese” e “costi”, è quindi importante fare chiarezza.

- “*Perdita economica*”: implica un vantaggio che viene perso (ad esempio la perdita di produzione subita perché il latte infetto deve essere scartato); in alternativa, questo termine può rappresentare un potenziale beneficio che non si realizza (ad esempio un'evidente diminuzione della produzione di latte) (43).
- “*Spese*”: rappresentano alcuni effetti economici di una malattia che si manifestano come “imprevisti” nell'allevamento (ad esempio il trattamento e la prevenzione della mastite) (43).
- “*Costi*”: è considerato come il valore monetario delle perdite economiche e delle spese, conseguenti al verificarsi della malattia (43).

Quando si considerano i costi di qualsiasi malattia, occorre ricordare che ognuna ha costi diretti e indiretti. Da una ricerca effettuata da Bennett, è stato stimato come i costi totali di una malattia possano essere molto superiori alla spesa che questa comporterebbe in un bilancio presuntivo. La maggior parte delle stime disponibili tiene conto solo di una parte dei costi reali delle mastiti, poiché stimarne i costi reali per intero è notoriamente difficile (44). È ancora più difficile quantificare le perdite associate alla mastite subclinica, perché non sono “visibili” ai proprietari delle aziende agricole (44).

Le perdite legate allo stato patologico degli animali possono essere dirette, e sono legate alla minore produzione, alla riduzione della qualità del latte, con perdita di premi sul prezzo del latte o applicazione di penalità, minore resa casearia e costo delle terapie da effettuare. La mastite è inoltre in grado di determinare perdite indirette significative legate all'influenza negativa sulla fertilità e all'aumento della quota di rimonta forzata (12).

Il calo di produzione è facilmente spiegabile dal fatto che i microrganismi, alterano l'attività del tessuto secernente, riducendone la capacità produttiva (12).

La riduzione della qualità del latte è invece spiegata dall'aumento delle cellule somatiche e dalla riduzione di proteine “caseificabili” a favore di proteine di origine ematica (proteine infiammatorie) come conseguenza del processo infiammatorio stesso. Non vanno trascurati, inoltre, i costi per la terapia, l'influenza negativa sulla fertilità e l'aumento della quota di rimonta forzata (12).

La relazione tra mastiti e perdite produttive è nota da tempo. In particolare, il fatto che la mastite determini anche un aumento del contenuto cellulare del latte permette di stimare le perdite produttive in funzione del contenuto cellulare del latte (35). Ad esempio, la perdita di produzione raggiunge i 7 quintali per lattazione quando le cellule sono superiori a 800.000/ml (45).

In un'indagine di Daprà effettuata nel 2006 svolta su 6 allevamenti italiani partecipanti ad un programma di gestione sanitaria, è stato evidenziato che il costo delle mastiti per singolo animale può variare da 60 a 350 euro (46).

Quando si parla di mastite, non si può dimenticare il costo legato alla terapia. La spesa varia da allevamento ad allevamento ed è legata non solo alla gravità, ma soprattutto al tipo di protocollo terapeutico applicato spesso troppo costoso e poco efficace (46).

1.2.4 MASTITE, QUALITÀ DEL LATTE E CASEIFICAZIONE

Se la relazione tra mastite e calo di produzione è un dato generalmente conosciuto, non altrettanto si può dire per quello relativo agli effetti della mastite sul processo di caseificazione. In caso di infezione mammaria, infatti, si assiste ad un'alterazione delle principali componenti che garantiscono al formaggio un'elevata qualità nutrizionale e una facile ed equilibrata caseificazione (47).

In corso di mastite, osserviamo una riduzione della concentrazione di componenti utili del latte quali lattosio (5-20%), caseina (6-18%), solidi totali (3-12%), grasso (5-12%), minerali (calcio, fosforo, potassio) con una generale riduzione del valore nutritivo (47).

Nel latte di animali con mastite, inoltre, vi è un aumento del plasminogeno che, attivato dagli enzimi presenti nel caglio, riduce la concentrazione di k – caseine, essenziali per una corretta cagliata. Inoltre, l'aumento di sieroalbumina e immunoglobuline di derivazione ematica riduce la stabilità del latte ai trattamenti termici, complicando i processi stessi di trasformazione (48).

Ne consegue che la resa casearia diminuisce considerevolmente all'aumentare delle cellule somatiche, già a valori compresi tra le 300.000 e 400.000 cellule/ml (48).

Queste alterazioni della qualità del latte si traducono in perdite significative a livello di caseificazione, perdite che possono essere stimate in almeno 6,5 kg di formaggio giorno per caldaia, confrontando un latte con 400-1.000.000 cellule/ml ed uno < 400.000 cellule/ml. Se si applica un prezzo base di 10€ kg formaggio, per ogni singola caldaia la perdita annua è pari a circa 24.000 €/anno (35)

1.3 APPROCCI CLASSICI E ALTERNATIVI AL TRATTAMENTO DELLA MASTITE

Il *National Institute for Research in Dairying* (NIRD) nel 1960 ha stilato un “piano in cinque punti per rendere efficace il controllo dei patogeni che causano mastite contagiosa (25).

Questi cinque punti sono:

1. Identificare e trattare casi clinici;
2. Disinfezione dei capezzoli post mungitura;
3. Utilizzo dell’asciutta selettiva (DCT);
4. Selezionare nella mandria i casi di mastiti subcliniche;
5. Manutenzione ordinaria dell’impianto di mungitura.

Sfortunatamente, il piano in cinque punti non sembra essere molto efficace nei confronti di patogeni ambientali e quindi, viene integrato con altre strategie di controllo e prevenzione (49).

1.3.1 TRATTAMENTI CONVENZIONALI

Tra i trattamenti convenzionali per curare la mastite, l’uso di antibiotici può essere considerato il più comune. Gli antibiotici principalmente utilizzati sono penicillina, ampicillina, tetraciclina, gentamicina, ect., e possono essere somministrati mediante somministrazione intramammaria, iniezione intramuscolare o endovenosa (50).

Il periodo di asciutta è una fase importante nel ciclo di lattazione, infatti, qualsiasi infezione acquisita durante il periodo di asciutta influenzerà la successiva lattazione, e pertanto, è estremamente importante prendersi cura della salute della vacca durante questo periodo (49). Prima di asciugare le vacche, queste vengono controllate per scongiurare la presenza di qualsiasi segno di mastite (49).

Prima della messa in asciutta, inoltre viene effettuato il *California Mastitis Test* (CMT), un test rapido e accurato per la diagnosi delle mastiti subcliniche. Il latte di un animale con mastite subclinica non ha un aspetto anomalo, e l'animale non ha altri segni clinici come gonfiore o dolore alla mammella (49). Questo test si esegue utilizzando un supporto (paletta) in plastica divisa in quattro tazze porta campione all'interno delle quali si trova un segno per permettere di inserirvi esattamente il contenuto di 2 millilitri di latte. Una uguale quantità di reagente viene aggiunta al latte e la paletta viene fatta ruotare per miscelare il contenuto. In circa 10 secondi si può eseguire la lettura del risultato (49). Nel caso di presenza di un'alta quantità di cellule somatiche, e quindi di mastite subclinica, la soluzione di latte e reagente presenterà un addensamento proporzionale alla quantità di cellule presenti (49).

Un altro tipo di metodo convenzionale per il trattamento della mastite nella bovina da latte è l'utilizzo dell'asciutta selettiva, ovvero, alla fine dell'ultima mungitura, prima di asciugare l'animale, si somministra, per via intra-mammaria, una molecola antibiotica, seguita dall'applicazione di sigillante per capezzoli, che simula il tappo di cheratina, fornendo una barriera fisica all'invasione batterica (51). L'asciutta selettiva può aiutare ad eliminare l'insorgenza di infezioni batteriche a carico della mammella e a prevenirne di nuove durante il periodo dell'asciutta (52). Quindi, un tubetto di antibiotico per somministrazione intra – mammaria, è costituito da antibiotici a lunga persistenza, in quanto possono fornire tassi di guarigione migliori (51) (52). Un trattamento ideale dovrebbe essere abbastanza lungo da curare mastite subclinica e abbastanza breve da non causare antibiotico - resistenza una volta che la vacca ha partorito (52). Il periodo di asciutta è il migliore per effettuare trattamenti terapeutici per la mastite, poiché non c'è produzione di latte e quindi il rischio di incorporare l'antibiotico nella catena alimentare è fortemente ridotto (51).

In alcuni casi più gravi di mastite, il latte non può essere munto perché i dotti galattofori del capezzolo sono bloccati da coaguli di latte, in gergo detti stoppini, (sono un chiaro segnale del fatto che qualcosa non va nella mammella) che bloccheranno la distribuzione dell'antibiotico, somministrato per via intra – mammaria, in tutta la mammella. In tal caso, sotto prescrizione veterinaria, è consigliabile la somministrazione parenterale associata a quella intramammaria (50) (53).

Riportare la vacca alla mungitura il prima possibile è la priorità durante il trattamento della mastite; è quindi importante fin da subito sapere con quale tipo di patogeno si ha a che fare, per poter utilizzare il tipo di antibiotico più adatto (50).

Oltre il costo, l'uso e l'abuso di antibiotici nel trattamento della mastite bovina ha portato alcuni problemi all'industria lattiero-casearia, anche a causa della presenza di residui di antibiotico nel latte (14). In generale, il latte ottenuto da animali che sono stati trattati con antibiotico deve essere scartato (il periodo varia in base ai tempi di sospensione del singolo antibiotico) in quanto non può essere consumato a causa del rischio di allergie e farmacoresistenza che si possono instaurare (14). Tuttavia, molti farmaci vengono ancora trattenuti nel corpo dell'animale, anche dopo il termine del periodo di sospensione riportato nel foglietto illustrativo del farmaco. Quindi, il costo del trattamento è determinato dalla perdita subita a causa del latte scartato piuttosto che dal costo dei farmaci. Inoltre, anche se gli antibiotici possono eliminare l'infezione, non proteggono direttamente la ghiandola mammaria da danni strutturali che possono risultare irreversibili (54).

La vaccinazione delle vacche può essere considerata un trattamento preventivo della mastite nelle mandrie. La maggior parte dei vaccini sono progettati per contrastare *S. aureus*, *S. agalactiae* ed *E. coli*. Vaccini contro *S. aureus* e *S. agalactiae* sono costituiti dal microrganismo *in toto* (opportunamente inattivato corrispondente a vaccini attenuati) o può essere formulato a base di subunità specifiche responsabili del ciclo eziopatogenetico (tossine, batteriche estratto di superficie ed estratto grezzo di polisaccaridi). Nel caso specifico di *E. coli*, l'antigene core mutante J5 è stato ampiamente utilizzato (55).

Vi sono vari gradi di efficacia per quanto riguarda i vaccini; questo potrebbe essere associato alle diverse pratiche di gestione degli allevamenti in particolare in riferimento al livello igienico-sanitario ed alle norme di biosicurezza adottate (56).

Come accennato in precedenza, la mastite è causata da una serie di diversi batteri; quindi, conseguentemente, la mancanza di efficacia dei vaccini potrebbe essere dovuta alla natura multi eziologica della mastite bovina (56). Non solo il sito di infezione nella ghiandola mammaria varia tra i diversi ceppi batterici, ma anche le caratteristiche di virulenza e le capacità immunogeniche possono anche esse essere diverse ed avere un loro peso specifico nella dinamica infettiva (57). Quindi, indipendentemente dal tipo di vaccino, la vaccinazione

da sola non è considerata efficace nella prevenzione della mastite, specialmente negli allevamenti che hanno alti tassi di mastite. Per questo motivo, per ridurre l'incidenza e la durata dei casi di mastite, la vaccinazione deve essere associata ad altre procedure di controllo, come l'igiene durante la mungitura, il trattamento antibiotico, la separazione delle vacche infette da quelle sane e così via (55).

Occorre infatti trovare un vaccino che sia in grado di proteggere da una vasta gamma di ceppi poiché all'interno di una mandria o nella singola vacca, possono essere presenti stipiti diversi (30). Il “vaccino ideale” dovrebbe anche essere facilmente utilizzabile nella routine quotidiana ed essere economicamente conveniente (58).

1.3.2 TRATTAMENTI INNOVATIVI: LA SOSTENIBILITA' AL CENTRO DELL'ALLEVAMENTO

Per poter sviluppare strategie sostenibili per il controllo/trattamento della mastite, è molto importante comprenderne le cause, i fattori di rischio, l'importanza economica, le ipotesi terapeutiche e i metodi di prevenzione (59)

Queste strategie per divenire davvero sostenibili, dovrebbero concentrarsi sulla creazione di consapevolezza, educando gli allevatori e il personale che lavora in allevamento ad affrontare in modo informato e con cognizione di causa l'estrema variabilità che caratterizza il fenomeno clinico “mastite” nelle differenti aree geografiche e nelle diverse realtà zootecniche (gestione manageriale (59). Come detto sopra, anche se l'uso di antibiotici rimane la strategia terapeutica principale, la sua efficacia è limitata, e negli anni si è verificato lo sviluppo di ceppi resistenti agli antibiotici (60). La crescente preoccupazione per la salute pubblica per quanto riguarda l'antibiotico – resistenza, sta spingendo le industrie del latte a ridurre, per quanto possibile, l'utilizzo di antibiotici. Quindi, si punta sempre di più sulla ricerca di alternative alla terapia antibiotica, soffermandosi parecchio sui derivati di piante e animali (61) (62).

I composti di origine vegetale sono da anni utilizzati come una preziosa fonte per ottenere gli ingredienti che compongono medicinali tradizionali, e stanno guadagnando l'interesse dei ricercatori per il trattamento della mastite bovina. Rispetto agli antibiotici, hanno il vantaggio di non indurre resistenza anche dopo una somministrazione prolungata (63). Un altro vantaggio

è la loro bassa se non nulla tossicità (63). È stato dimostrato che varie specie vegetali presentano proprietà antimicrobiche e sono anche in grado di inibire l'infiammazione indotta da agenti patogeni o endotossine mediante l'inattivazione delle vie NF-κB (63).

Pur avendo un effetto sulla fisiologia cellulare, i composti di origine vegetale, in particolare gli oli essenziali, sono segnalati per la loro capacità di inibire o uccidere i patogeni che causano la mastite (63).

Fratini ed il suo staff (64) hanno testato dieci oli essenziali commerciali su alcuni agenti patogeni responsabili di mastite nella bovina (*S. aureus*, *S. chromogenes*, *S. siuri*, *S. warneri*, *S. xylosus* ed *E. coli*) e hanno riscontrato che tre dei dieci oli erano in grado di inibire i patogeni per cui sono stati testati: *Satureja montana*, *L. tymus vulgaris*, e *Origanum majorana*. Lo stesso studio ha dimostrato che timolo, carvacrolo e p-cimene sono i più abbondanti componenti di questi oli essenziali. I test antimicrobici sono stati effettuati utilizzando entrambe le miscele: miscela di componenti puri e miscela di oli essenziali. Queste due miscele hanno dimostrato una forte attività inibitoria, migliore del singolo olio essenziale, suggerendo quindi, la presenza di un effetto sinergico tra le miscele.

Cho (65) in una sua ricerca ha scoperto che il trattamento con olio essenziale di origano (OEO: *Origanum Vulgare Oil*) può migliorare la condizione fisica della mammella nelle vacche testate con modalità paragonabili a quelle della gentamicina (Tabella 1.)

Quindi l'OEO potrebbe essere una valida alternativa agli antibiotici nel controllo della mastite sub – clinica (65).

Tuttavia, poiché l'OEO conferisce un sapore e un aroma distinto ai campioni di latte degli animali trattati (profonda alterazione organolettica), le dosi e l'esposizione a lungo termine, dovrebbero essere ulteriormente studiate (66).

L'olio di arancia spremuto a freddo, privato di terpene è stato segnalato per avere un effetto antimicrobico nei confronti dei ceppi MRSA (*Staph. Aureus* resistente alla meticillina) (67).

L'olio derivato dagli agrumi (CDO), inoltre, non compromette la funzione dei leucociti polimorfonucleati, che svolgono un ruolo importante nella risposta immunitaria contro la mastite, inibendo allo stesso tempo la crescita batterica (68).

Per quanto riguarda invece i composti di origine animale, negli ultimi anni la ricerca si è concentrata sul veleno d'api, e su gli immuno-modulatori prodotti naturalmente dai mammiferi, come la lattoferrina (direttamente coinvolta nel mantenimento dell'omeostasi immunitaria). Vengono considerati come potenziali agenti antimicrobici non antibiotici per il trattamento e la prevenzione della mastite bovina (30). La lattoferrina è una glicoproteina multifunzionale che ha azione chelante verso il ferro presente nel latte, nel colostro e altre secrezioni esocrine come saliva e lacrime (69). L'effetto antimicrobico della lattoferrina sembra essere dato proprio da questa sua capacità di chelare il ferro, capacità che può inibire la produzione di biofilm attraverso il sequestro del ferro (69). È stata segnalata per fornire effetto antimicrobico contro *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. agalactiae*, e *S. aureus* (69).

Sempre sulla linea degli approcci alternativi e sostenibili al controllo/trattamento della mastite nella bovina da latte, i concentrati piastrinici (PC) o i relativi emoderivati possono rappresentare una terapia alternativa (70).

È di questi composti emoderivati che si è posta la maggiore attenzione per questo progetto di tesi.

| Essential oil origin | Mechanisms of action |
|---|--|
| Mixture of <i>Satureja montana</i> L., <i>Thymus vulgaris</i> L. ct. thymol, and <i>Origanum majorana</i> L. [95] | Antimicrobial activity against <i>Staph. aureus</i> |
| Mixture of <i>Origanum vulgare</i> and <i>Leptospermum scoparium</i> [96] | Antimicrobial activity against <i>Staph. aureus</i> , <i>Staph. chromogenes</i> , <i>Staph. siuri</i> , <i>Staph. warneri</i> , <i>Staph. xylosus</i> and <i>E. coli</i> |
| <i>Origanum vulgare</i> [97] | Decreased SCC and WBC in cows afflicted with subclinical mastitis, inhibits <i>Staph. aureus</i> and <i>E. coli</i> |
| Valencia orange [100] | Inhibits <i>Staph. aureus</i> growth and biofilm formation, reduced adhesion and invasion in MAC-T |
| <i>Minthostachys verticillata</i> and Citrus [134] | Antimicrobial activity against <i>Strep. uberis</i> |
| <i>Minthostachys verticillata</i> [140] | Attenuate <i>Enterococcus faecium</i> -induced inflammation in mammary gland tissue of mouse model by activating macrophage phagocytosis and modulating innate immune response |
| <i>Cinnamon cassia</i> [141] | Antimicrobial activity against <i>Staph. aureus</i> , <i>Staph. epidermidis</i> , <i>Staph. hyicus</i> , <i>Staph. xylosus</i> , and <i>E. coli</i> 29 |
| Patchouli, Cedar, Thyme, and Manuka [142] | Antimicrobial activity against <i>Staph. aureus</i> , <i>Staph. epidermidis</i> , and <i>Staph. xylosus</i> |

SCC, somatic cell count; WBC, white blood cell; MAC-T, bovine mammary alveolar cells.

Tabella 1: oli essenziali utilizzati nel trattamento delle mastiti e relativi meccanismi d'azione (71)

1.3.2 I CONCENTRATI PIASTRINICI

Le infezioni della mammella bovina inducono una varietà di cambiamenti nell'espressione genica di diversi fattori di crescita che spiegherebbe il loro possibile ruolo nella protezione del tessuto ghiandolare o nei processi di rigenerazione (72). I fattori di crescita, così come le

chemochine e le citochine possono agire sinergicamente per aumentare la produzione di neutrofili e macrofagi per promuovere l'angiogenesi, la fibroplasia, la deposizione di matrice e la riepitelizzazione (72).

Considerando le vaste proprietà di applicazione in medicina umana e le sue facilità di preparazione, i concentrati piastrinici (PCs: *Platelet Concentrates*), sono stati valutati negli ultimi anni come una terapia alternativa finalizzata a stimolare la rigenerazione del tessuto ghiandolare ed ad operare un controllo/trattamento delle mastiti sia subcliniche che cliniche nelle vacche da latte (72).

Come detto sopra, i concentrati piastrinici (PCs) e i relativi emoderivati, possono rappresentare un'alternativa alla terapia antibiotica nel controllo/prevenzione/trattamento della mastite, soprattutto di quella subclinica (70).

Secondo la classificazione di Dohan Ehrenfest, i PC liquidi possono essere classificati in due gruppi:

1. Prodotti di puro plasma ricco di piastrine (P-PRP: *Pure-Platelet-Rich Plasma*), che sono emoderivati senza leucociti o con concentrazioni trascurabili di queste cellule e una rete di fibrina a bassa densità dopo l'attivazione (73).
2. Prodotti leucocitari-PRP (L-PRP), che sono emoderivati con leucociti e una rete di fibrina a bassa densità dopo l'attivazione (73).

Gli emoderivati correlati alle piastrine, come il P-PRP, sono un'importante fonte di fattori di crescita (GF) tra cui fattore di crescita trasformante beta 1 (TGF- β 1) e fattore di crescita di derivazione piastrinica (PDGF), tra gli altri polipeptidi necessari per indurre la guarigione delle ferite e ridurre l'infiammazione (74). Inoltre, alcuni studi in vitro (75) (76) e alcuni studi in vivo (77) (78) hanno descritto un importante effetto batteriostatico del P-PRP nei confronti di diversi batteri sia Gram-positivi sia Gram-negativi, attraverso il complemento plasmatico, (cioè la frazione C3) (79) (80) e alcuni chemochine rilasciate durante l'attivazione piastrinica, come la beta-defensina e il fattore piastrinico 4 (PF4) (81). Quindi sembra che l'effetto batteriostatico descritto per diversi PC non sia correlato alle concentrazioni di globuli bianchi in tali emoderivati (75) (82).

I risultati ottenuti in uno studio di ricercatori italiani sono alquanto incoraggianti, in quanto PC hanno prodotto una riduzione delle cellule somatiche di circa il 67% nelle bovine con mastite acuta (clinica) e una riduzione del 53% negli animali con mastite cronica (sub-clinica) rispetto al trattamento con antibiotici (rispettivamente 52,5% e 15,4%); mentre con una combinazione di entrambi, PC e antibiotici si sono ottenute riduzioni, rispettivamente, del 90,6% e del 66,7% (72).

1.3.3 COS'E' IL PRP E COME VIENE PRODOTTO

Il plasma ricco di piastrine (PRP) è un'applicazione terapeutica innovativa nella rigenerazione dei tessuti grazie al suo arricchimento in fattori di crescita con potenziale mitogenico e antinfiammatorio (83). Questo tipo di concentrato piastrinico prevede una grande quantità di piastrine sospese in un piccolo volume di plasma (84).

In particolare, il PRP è una concentrazione di piastrine (3-5 volte il livello fisiologico di base del plasma), contenente: fattore di crescita β -1 (TGF- β 1) e TGF β -2, fattori di crescita derivati piastrinici (PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB), fattore di crescita insulino-simile (IGF-1), fattore di crescita epidermica (EGF), fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF), fattore di crescita dei fibroblasti (FGF) e fattore di crescita degli epatociti (HGF), che sono molto importanti per i processi di rigenerazione (83).

Questi fattori di crescita agiscono sinergicamente per aumentare la produzione di neutrofili e macrofagi, per favorire l'angiogenesi, la fibroplasia, la deposizione di matrice e la ripitelizzazione, inducendo la conseguente rigenerazione dei tessuti (85).

La presenza di molecole anti- infiammatorie, compreso HGF (*Hepatocyte Growth Factor*), inoltre, conferisce al PRP la capacità di arrestare il processo infiammatorio (83).

Un aumento della concentrazione di piastrine produce un aumento della concentrazione dei fattori di crescita sopra elencati.

Il PRP contiene anche le 3 proteine del sangue note per agire come molecole di adesione cellulare per osteoconduzione e come matrice per la formazione dell'osso e del tessuto connettivo. Queste molecole di adesione cellulare sono fibrina, fibronectina e vitronectina (84).

La somministrazione locale di maggiori concentrazioni di piastrine, e quindi di fattori di crescita, attraverso il PRP potrebbe ottimizzare la fase di guarigione a livello locale e quindi migliorare la capacità dei tessuti, patologicamente compromessi, di generare una risposta di riparazione del tessuto danneggiato (86).

Solitamente il PRP viene utilizzato in modo autologo, anche se nel trattamento delle mastiti, a causa dell'elevato numero di animali che necessitano del trattamento, è necessaria una grande quantità di dosi preconfezionate e quindi, si è proceduto anche con somministrazioni eterologhe, grazie alle preparazioni ottenute da animali donatori derivanti dall'allevamento in cui il trattamento deve essere utilizzato (87).

Il PRP ha proprietà antinfiammatorie (88), battericide e rigenerative (89) e la guarigione delle ferite risulta favorita dai fattori di crescita e dalle citochine contenuti nelle piastrine (87).

Il PRP funziona tramite la degranolazione dei granuli nelle piastrine, i quali contengono i fattori di crescita sintetizzati e pronti per essere utilizzati. La secrezione attiva di questi fattori di crescita viene iniziata dal processo di coagulazione del sangue e inizia entro dieci minuti dall'inizio della coagulazione. Più del 95% dei fattori di crescita vengono secreti entro 1 ora (90). Pertanto, PRP deve essere sviluppato in uno "stato anticoagulato" e deve essere utilizzato su innesto, lembo, o ferita, entro 10 minuti dall'inizio del coagulo (90). Analogamente alla maggior parte dei fattori di crescita, quelli all'interno dei granuli di piastrine sono incompleti perché devono essere solubili (90). Quando il processo di coagulazione attiva le piastrine, i fattori di crescita vengono secreti dalla cellula attraverso la membrana cellulare (90). In questo processo, i granuli si fondono con la membrana piastrinica, dove la proteina del fattore di crescita viene completata allo stato bioattivo grazie all'aggiunta di istoni e carboidrati (90).

Pertanto, le piastrine danneggiate o rese non vitali dalla lavorazione del PRP non secernono fattori di crescita bioattivi e possono dare risultati deludenti (90).

Dopo l'ondata iniziale di fattori di crescita legati al PRP, le piastrine sintetizzano e secernono ulteriori fattori di crescita per i restanti 7 giorni di vita (84).

Una volta che la piastrina si esaurisce e muore, il macrofago, arrivato nella regione attraverso la proliferazione vascolare stimolata dalle piastrine, si trova in una posizione di vantaggio:

assume una funzione di regolazione della guarigione della ferita secernendo alcuni degli stessi fattori di crescita (84).

Pertanto, il numero di piastrine all'interno del coagulo di sangue all'interno dell'innesto, della ferita o aderente ad un lembo, determina la velocità di guarigione della ferita (84).

Uno studio (91) proposto da Haynesworth, ha dimostrato come la proliferazione delle cellule staminali mesenchimali adulte e il loro differenziazione fossero direttamente correlati alla concentrazione piastrinica. Ne è stata ricavata una curva dose-risposta che indica che una risposta cellulare sufficiente inizia, di fatto, con un aumento da 4 a 5 volte rispetto al numero di piastrine di base.

Una ricerca simile (92) ha dimostrato che anche la proliferazione dei fibroblasti e la produzione di collagene di tipo I sono aumentate con l'aumento delle concentrazioni di piastrine e che gran parte della risposta è dipendente dal pH, con le migliori risposte che si verificano a livelli di pH più acidi.

Per la preparazione del PRP, in letteratura è riportato principalmente il metodo a doppia centrifugazione.

Inizialmente si procede con la preparazione chirurgica di alcuni cm di pelle nella zona della vena mammaria, successivamente con una sacca da 450 ml contenente CDPA-1 (Citrato Destrosio Fosfato Adenina, formula 1) e con incorporato un ago da 16 g, si effettua il prelievo, appunto dalla vena mammaria. Dopodiché la sacca verrà trasportata al laboratorio ad una temperatura di 4°C (72) (83).

Una volta giunto al laboratorio, il sangue viene messo in provette sterili tipo Falcon da 50 ml ciascuna. Non appena preparate le provette, queste vengono messe in centrifuga a 100xG per 30 minuti a 4°C (70) (72).

Questo primo passaggio in centrifuga divide il sangue in 3 frazioni all'interno della provetta: sul fondo si trovano i globuli rossi, nello strato intermedio il cosiddetto "*buffy coat*" (frazione di sangue anticoagulato che contiene la maggior parte dei globuli bianchi e delle piastrine) e lo strato superiore è composto dal PRP (72).

Una volta terminata la prima fase di centrifuga, il PRP è accuratamente separato dal resto del contenuto della provetta: è quindi aspirato e distribuito in altre provette, sempre tipo Falcon, e centrifugato nuovamente, questa volta a 1500xG per 10 minuti a 4°C. Questa seconda fase di centrifuga permette di ottenere il pellet piastrinico e il plasma povero di piastrine (PPP: *Platelet Poor Plasma*) (83) (72).

A questo punto, due terzi del volume del PPP vengono aspirati e separata per un eventuale utilizzo successivo, il pellet invece viene mescolato con il residuo volume di PPP per consentire la conta delle piastrine. Si ottiene, quindi, un PC ad una concentrazione standard di 1×10^9 piastrine/ml (72) (83) (70).

La quantità totale di PRP ottenuta da un singolo animale viene poi “aliquotata” in dosi pronte all’uso, da 5 ml e conservata in siringhe usa e getta.

Le siringhe vengono poi congelate a -80°C e scongelate a 37°C per tre volte, per consentire il rilascio dei fattori di derivazione piastrinica (93).

Il PRP viene poi, opportunamente, sottoposto ad esame batteriologico per verificarne la sterilità (72).

Le siringhe vengono poi congelate a -20°C fino al momento dell’utilizzo (72).

Agli animali a cui è stato prelevato il sangue per preparare il trattamento di PRP, è stato anche prelevato del latte, per eseguire una conta sulle cellule somatiche (SCC) e un test batteriologico (87).

La SCC viene effettuata al giorno 0 (inizio del trattamento), poi al settimo giorno post – trattamento, quattordicesimo giorno post – trattamento e trentesimo giorno post – trattamento (87).

I campioni di latte per le analisi batteriologiche invece, vengono raccolti prima della mungitura, in condizioni asettiche al giorno 0 (inizio del trattamento) a partire da ogni quarto interessato (87).

Le vacche vengono trattate dopo la mungitura. Dopo lo scongelamento, la siringa viene dotata di un ago per somministrazioni intramammarie per favorire la somministrazione del PRP attraverso il canale del capezzolo. A somministrazione avvenuta, la mammella viene

massaggiata delicatamente dal basso verso l'altro, per favorire la distribuzione del prodotto (87).

Nel caso in cui fosse necessaria la somministrazione combinata di antibiotico e PRP, quest'ultimo deve, chiaramente, essere somministrato per primo (87).

1.3.4 IMPIEGHI NOTI DEL PRP

In medicina umana il PRP viene utilizzato in vivo per il trattamento di patologie degenerative del ginocchio, dell'anca della caviglia e della cartilagine ialina, dovute a lesioni degenerative o traumatiche (94) (89).

È stato dimostrato come il PRP possieda un effetto più duraturo rispetto all'infiltrazione con l'acido ialuronico o corticosteroidi (89).

In ortopedia umana, sono stati riscontrati risultati promettenti anche in giovani sportivi con tendinopatie acute e croniche, e lesioni muscolari (95).

In dermatologia umana il PRP viene utilizzato principalmente per contrastare l'invecchiamento cutaneo del viso (in quanto stimola la produzione di collagene e acido ialuronico) e, recentemente, è stato impiegato anche nei pazienti diabetici per il trattamento delle ulcere cutanee (89).

Viene utilizzato anche in chirurgia maxillo – facciale, odontoiatria e medicina dello sport (96) (95).

In campo veterinario, il PRP è stato utilizzato principalmente per il trattamento di ferite profonde, ferite croniche, ulcere cutanee e fistole nel cane (97); per aiutare la guarigione delle patologie intestinali dei suini (94); nei cavalli sportivi è stato impiegato per trattare le tendinopatie (98) e nei bovini per trattare le mastiti e le endometriti (72).

1.3.5 IL PRP NELL'ALLEVAMENTO DI BOVINE DA LATTE

Per quanto riguarda l'allevamento di bovine da latte, il PRP si è dimostrato utile nel trattamento delle disfunzioni ovariche, ma soprattutto nel trattamento della mastite sia clinica che subclinica, con azione paragonabile a quella degli antibiotici (87).

Per quanto riguarda il trattamento delle disfunzioni ovariche, uno studio di Cremonesi e del suo staff, effettuato nel 2020 descrive la somministrazione di PRP intraovarico per trattare vacche con diagnosi di insufficienza ovarica al termine del periodo di attesa volontaria *post partum*. Una vacca è stata esclusa dallo studio a causa di una fistola rettovaginale che ha ostacolato l'iniezione di PRP (99).

Il presente studio si è concentrato sulla valutazione empirica dell'efficacia del PRP attraverso la misurazione dei livelli di progesterone (PRG) come marcatore del ripristino della ciclicità ovarica e del monitoraggio dell'estro per la successiva esecuzione della fecondazione artificiale (99).

I dati riportati in questo studio sono certamente limitati, ma supportano le recenti segnalazioni sulla capacità di ripristinare la funzione fisiologica di un ovaio malfunzionante ricorrendo al PRP (99).

In particolare, i dati mostrano che dopo l'iniezione intraovarica di PRP (settimana 0), il livello di PRG è aumentato tra 3 e 11 volte nelle quattro settimane successive (Tabella 2) (99). Questo aumento concentrazione di PRG indica il recupero della ciclicità ovarica.

| Cow ID | Age (years) | N° lactation | Progesterone concentration (ng/ml) | | | Pregnancy after PRP treatment |
|--------|-------------|--------------|---|--------|--------|-------------------------------|
| | | | week0 | week+2 | week+4 | |
| 70 | 3 | 2 | 0.89 | 1.57 | 4.27 | Yes |
| 175 | 2 | 1 | 0.32 | 0.31 | 3.54 | Yes |
| 424 | 4 | 3 | 0.45 | 2.63 | 0.58 | No |
| 438 | 3 | 2 | 1.87 | 1.14 | 6.23 | Yes |
| 779 | 5 | 4 | Not treated because of rectovaginal fistula | | | |
| 1,078 | 2 | 1 | 1.2 | 5.67 | 4.76 | Yes |

Tabella 2: dati che riportano le informazioni di identificazione di ogni vacca trattata (ID, età, lattazione), la concentrazione di progesterone e il rilevamento della gravidanza dopo l'iniezione intraovarica di PRP. (99)

Presumibilmente, alla luce delle ampie variazioni di PRG misurate, ogni vacca ha avuto più di un'ovulazione durante quelle 4 settimane (99). L'inseminazione artificiale è risultata necessaria per più di una bovina per ottenere una gravidanza ed è stata eseguita quando il monitoraggio dell'estro ha segnalato il calore (99).

L'intervallo di tempo tra l'iniezione di PRP e il rilevamento della gravidanza variava per ogni vacca e dipendeva dal successo dell'inseminazione artificiale (99).

La gravidanza si è instaurata solo nelle quattro vacche in cui si è verificato un aumento del livello di PRG. Solo un animale non ha risposto al trattamento con PRP (99).

Lo studio in questione (99) ha dimostrato che il PRP ha indotto un aumento dei recettori per il progesterone dopo la somministrazione intra-uterina in vacche sane e ha esercitato un effetto modulatore su una serie di molecole coinvolte nell'infiammazione, fatto questo che si è tradotto in un effetto antinfiammatorio in un modello di endometrite in vitro (83).

Presumibilmente, l'effetto del PRP sulla disfunzione ovarica è dovuto alla secrezione di fattori di crescita che producono effetti benefici sui follicoli. Ad oggi, il meccanismo d'azione sull'ovaio non è del tutto chiaro, ma esistono due ipotesi principali. La prima suggerisce che i fattori di crescita e le citochine presenti nel PRP agiscano sugli ovociti dormienti esercitando un effetto rivitalizzante e ripristinando la fertilità (100). La seconda ipotesi sostiene l'esistenza di cellule staminali ovariche da cui si genererebbero nuovi ovociti (100).

Tuttavia, dati i risultati ottenuti in questo studio di Cremonesi, non è possibile affermare che l'attività ovarica sia ripristinata a lungo termine dal PRP, perché essendo le quattro bovine trattate gravide, solo dopo il parto e il periodo di attesa volontaria, i segni di estro verranno valutati per confermare l'efficacia del PRP in questa patologia (99).

Un altro studio sperimentale messo in atto da Marini si è basato su tre esperimenti sia in vivo che in vitro. Il primo ha valutato l'endometrio dal punto di vista istologico e immunohistochimico dopo la somministrazione in vivo di PRP. Il secondo ha valutato l'effetto di una concentrazione del 5 % e del 10 % di PRP nel terreno di coltura, sulla proliferazione delle cellule endometriali in vitro e sull'espressione di alcuni geni coinvolti nella regolazione del ciclo estrale e dell'interazione feto-materna, al fine di stabilire se fosse in grado di migliorare le funzioni di questa linea cellulare. I geni includevano la prostaglandina-endoperossido-sintasi 2 (COX2 o PTGS2), la proteina tumorale p53 (TP53), i recettori per gli estrogeni (ER- α e PTGS2), il recettore del progesterone (PR) e v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog (c-Myc). Il terzo esperimento in vitro ha valutato la capacità del PRP di contrastare un modello di infiammazione in vitro (stressando le cellule endometriali con

LPS a diversi tempi e a concentrazioni variabili), l'espressione di geni pro-infiammatori e il rilascio di alcune citochine (83).

Gli animali oggetto di studio sono stati ricavati da un gruppo di vacche di razza frisona che si trovava a 150-180 giorni di lattazione (83).

I quattordici animali reclutati per il primo esperimento, hanno ricevuto una dose intra – muscolo di prostaglandine (PGF2 α) per sincronizzare il ciclo estrale. Tutti gli animali hanno mostrato segni di estro nelle 96 ore successive (83).

A quel punto, sono state effettuate analisi batteriologiche e citologiche, palpazione transrettale e vaginale ed ecografia del tratto riproduttivo per escludere eventuali patologie (83).

I campioni di endometrio per lo studio in vitro sono stati raccolti da bovini macellati secondo le norme di legge (83).

Esperimento 1: sette vacche sono state trattate con PRP (10 ml), mentre le altre sette sono state arruolate come gruppo controllo (CTR) e gli è quindi stata somministrata soluzione fisiologica (10 ml) (83).

Al termine dell'esperimento, non sono state rilevate alterazioni riportabili a stati patologici in nessuna delle biopsie esaminate (83). Tutti i campioni erano ricoperti da un monostrato epiteliale semplice colonnare (83), nello stroma erano rilevabili linfociti e non erano presenti né fibrosi né stati emorragici (83).

Esperimento 2: è stato valutato l'effetto di diverse concentrazioni di PRP sulla proliferazione e sull'espressione genica delle cellule endometriali in vitro (83).

Gli uteri freschi di bovina sono stati raccolti da tre diverse vacche destinate al macello, la cui carne, una volta macellate, era destinata al consumo umano. I campioni sono stati ottenuti da vacche normocicliche allo stadio di diestro (fase luteale medio-tardiva). Solo gli uteri di vacche con un evidente corpo luteo sull'ovaio sono stati utilizzati per la raccolta di frammenti endometriali e la successiva coltura cellulare (83).

I campioni di endometrio sono stati conservati a 4 °C in soluzione salina integrata con 4 μ g/ml di amfotericina B, 100 UI/ml di penicillina e 100 μ g/ml di streptomina e trattati entro 2 ore (83).

In modo estremamente rapido, l'endometrio è stato digerito in 25 ml di soluzione salina tamponata filtrata sterile, con 50 mg di collagenasi II, 100 mg di sieroalbumina bovina e 10 mg di DNasi-I per 90 minuti a 38,5 °C. Quindi, le cellule sono state filtrate con un filtro da 80µm, centrifugate a 300 x g per 10 minuti e lavate due volte in PBS (83). Prima della semina, il numero totale di cellule vitali è stato valutato con il metodo dell'esclusione, colorando con blu di Tripán e utilizzando una camera di Bürker (83).

Le cellule endometriali sono state coltivate in presenza di due diverse concentrazioni di PRP (5% e 10%), e l'espressione di mRNA di geni coinvolti nella regolazione del ciclo estrale e dell'interazione tra feto e madre è stata misurata mediante PCR quantitativa (83).

Al termine dell'esperimento è emerso che il PRP in concentrazione 5% ha avuto un effetto significativo sull'espressione dei geni endometriali rispetto ai livelli di espressione delle cellule non trattate (83). I risultati ottenuti hanno mostrato un aumento statisticamente significativo dell'espressione di tutti i geni studiati nelle cellule coltivate in presenza di PRP al 5 % rispetto a PRP al 10 %.

Esperimento 3: è stato valutato l'effetto del PRP sull'espressione genica, dopo il trattamento con LPS, in vitro (83).

Le cellule endometriali P5 sono state sistemate in piastre a sei pozzetti ad una densità di 50.000 cellule/pozzetto in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) standard completo, contenente due diverse concentrazioni di LPS: 10 ng/ml e 100 ng/ml (83).

La valutazione dell'espressione di geni coinvolti nell'infiammazione è stata eseguita a differenti intervalli temporali: 1, 6, 12, 24 e 48 ore. I surnatanti sono stati raccolti e conservati a -20 °C fino al momento in cui sono stati utilizzati per il test ELISA per la misurazione di PGE-2, IL-1β e IL-8 (83).

Per studiare l'effetto in vitro del PRP in cellule trattate con LPS, le cellule endometriali sono state trattate con 10 ng/ml di LPS e il 5% di PRP per 1, 6, 12, 24 e 48 ore (83).

Fondamentale è sottolineare come i dati ottenuti siano il risultato di tre repliche (83).

Al termine dell'esperimento, i risultati hanno rivelato che la concentrazione di 10 ng/ml di LPS tra 1 ora e 12 ore è la dose più efficace per indurre una sovra-espressione di geni pro-

infiammatori nelle cellule endometriali bovine (83). Entro 48 ore, tutti i geni sono tornati quasi ai valori di base (83).

Il trattamento con PRP ha avuto un effetto significativo sull'espressione genica endometriale di questi geni, rispetto ai livelli di espressione riscontrati nelle cellule trattate con LPS (10 ng/ml) (83).

Per quanto riguarda invece il trattamento delle mastiti bovine con PRP autologo è fattibile in condizioni sperimentali, ma è difficile da applicare sul campo, soprattutto in presenza di mastiti cliniche. Lo scenario ideale, infatti, sarebbe quello di avere PRP eterologo conservato in ogni allevamento, in modo che sia prontamente disponibile quando necessario (87).

Durante la preparazione del PRP eterologo per il trattamento della mastite, è noto che i millilitri di PRP ottenuti rispetto ai millilitri di sangue di partenza, è molto diversa tra i singoli animali (87). Ad oggi, in medicina veterinaria, non sono ancora stati definiti i parametri per identificare i donatori più adatti (87).

Nello studio di Lange – Consiglio sono stati analizzati i dati raccolti durante trattamenti di mastite acuta in bovine da latte, con PRP eterologo.

Nella specie bovina, il range fisiologico della conta delle piastrine è $412 - 1003 \times 10^3$ per ogni μL di sangue (87).

Le rese percentuali di PRP ottenute dal sangue delle vacche oggetto di studio variavano da 1,04% a 24,5% (87).

La resa più alta (24,5%) è stata ottenuta dal sangue di una bovina di 5 anni non gravida al momento del prelievo (effettuato due mesi dopo l'ultimo parto), ma che aveva già avuto tre gravidanze. La resa più bassa (1,04%), invece, è stata ottenuta a partire dal sangue di una bovina gravida che stava per essere messa in asciutta. Anche questo animale, però aveva 5 anni ed aveva avuto 3 gravidanze (87).

Le concentrazioni di piastrine variano da un minimo di $154 \times 10^3/\mu\text{L}$, ad un massimo di $602 \times 10^3/\mu\text{L}$ (87).

In tutti gli animali, il PRP finale presentava una quantità di piastrine tre volte superiore al campione di sangue iniziale, con un minimo di $462 \times 10^3/\mu\text{L}$ e un massimo di $1806 \times 10^3/\mu\text{L}$ (87).

Le concentrazioni di globuli bianchi (WBC) nei campioni di sangue iniziali variavano da un minimo di $1,17 \times 10^3/\mu\text{L}$ ad un massimo di $13,9 \times 10^3/\mu\text{L}$. Nel PRP finale, i globuli bianchi si trovavano in un range che andava da un minimo di $3,44 \times 10^3/\mu\text{L}$ ad un massimo di $10,01 \times 10^3/\mu\text{L}$ (87).

È quindi risultato chiaro come la resa del PRP non fosse correlata alla concentrazione iniziale di globuli bianchi (87).

Un'altra ricerca proposta da Duque-Madrid aveva come primo obiettivo quello di confrontare il tasso di guarigione delle mastiti subcliniche causate da batteri Gram-positivi nelle vacche da latte, somministrando per via intramammaria PRP, oppure un antibiotico (cefquinome solfato). Il tasso di guarigione è stato valutato attraverso la conta delle cellule somatiche (SCC) e dall'analisi batteriologica del latte.

Il secondo obiettivo dello studio era quello di confrontare la risposta infiammatoria/anti infiammatoria della ghiandola mammaria ai due tipi di trattamenti, attraverso l'analisi qualitativa di interleuchine (IL), interferone gamma (IFN- γ) e fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- α) nel latte.

Sono state selezionate 103 vacche, in base alla SCC e alla presenza di batteri Gram-positivi, 49 di queste, sono state trattate con antibiotico e 54 sono state trattate con PRP (70).

La guarigione è stata valutata mediante analisi sul latte al giorno 21 e 22 post trattamento. Le vacche che sono risultate ancora in fase di mastite subclinica sono state trattate nuovamente al 26° giorno e la guarigione si è riscontrata al 47° e 48° giorno. Complessivamente, la guarigione batteriologica è stata osservata in 16 vacche (30%) del gruppo trattato con PRP e in 35 vacche (71%) del gruppo trattato con antibiotico. La guarigione da *Staphylococcus aureus* è risultata più elevata nel gruppo di animali trattati con antibiotico (70).

La media di SCC è aumentata in relazione al tempo solo nel gruppo trattato con PRP (70).

IL-8, IFN- γ e TNF- α hanno mostrato un'interazione significativa in relazione a tempo e tipologia di trattamento. La concentrazione di IFN- γ è risultata più bassa nel gruppo trattato con PRP rispetto a quello trattato con antibiotico nei giorni 0 e 22 (70).

La conta dei leucociti era più bassa nel PRP rispetto al sangue intero, mentre le concentrazioni di TGF- β 1 e PF4 erano più elevate nei lisati piastrinici rispetto al PRP e al plasma (70).

Dai risultati ottenuti in questo studio è emerso come la mastite subclinica trattata con PRP abbia mostrato un tasso più basso di guarigione dal punto di vista batteriologico, rispetto a quella trattata con antibiotico (70).

2. SCOPO DELLA TESI

Il lavoro svolto per questa tesi di laurea ha avuto come finalità quella di valutare, attraverso specifiche analisi microbiologiche, conta di cellule somatiche (SCC) e conta di cellule somatiche differenziali (DSCC) nel latte, l'efficacia del trattamento delle mastiti bovine, sia cliniche che subcliniche, facendo ricorso a PRP autologo rispetto al classico approccio che prevede il trattamento mediante antibiotici.

L'utilizzo del PRP può essere considerato un approccio innovativo al trattamento della mastite nella bovina da latte, in quanto può rendere efficace e prudente l'impiego dei farmaci.

Al giorno d'oggi, la sostenibilità da parte degli allevamenti intensivi è sempre più ricercata e la resistenza agli antibiotici da parte dei microrganismi è un problema sempre più pressante. Un aspetto interessante di questa tesi è stato quello di poter lavorare su uno dei più grandi problemi che affliggono l'allevamento della bovina da latte, mantenendo come priorità la sostenibilità e il benessere animale senza tralasciare l'impatto economico.

Infatti, il prelievo di sangue per la preparazione del concentrato piastrinico, il prelievo di latte per le analisi microbiologiche e la conta delle cellule somatiche, e la somministrazione del trattamento non causano alcun dolore o sofferenza all'animale. Inoltre, la somministrazione di PRP non prevede tempi di sospensione, a differenza degli antibiotici, in quanto non lascia nessun tipo residuo né nel latte, né nella carne e nemmeno nell'ambiente.

Le cellule differenziali rappresentano uno strumento dinamico e puntuale, in grado di migliorare il controllo della mandria e rendere più mirato, efficace e prudente l'impiego dei farmaci, consentendo il trattamento dei soggetti ai primi sintomi di mastite e l'individuazione più precisa dei soggetti cronici, per i quali l'utilizzo di farmaci è divenuto inutile e dispendioso.

3. MATERIALI E METODI

Sono stati effettuati prelievi sia di latte che di sangue, su bovine che presentavano sintomi sia di mastite subclinica, sia di mastite clinica.

3.1 PROGETTAZIONE DELLO STUDIO E CRITERI DI INCLUSIONE DEGLI ANIMALI

L'allevamento in cui è stato effettuato lo studio, si trova in Provincia di Parma ed ha circa 150 animali in lattazione.

Per quanto riguarda le mastiti subcliniche, alla luce dei risultati ottenuti dai controlli funzionali sul latte, eseguiti dall'Associazione Regionale Allevatori, sono stati selezionati gli animali che sarebbero poi diventati oggetto di questo studio.

La selezione degli animali è avvenuta tramite l'utilizzo di un sito, *Randomize.org*, nel quale sono stati inseriti gli animali con una SCC superiore alle 200.000 e che avevano più di 100 giorni di lattazione e che quindi avevano già superato il picco. Il sito ha poi restituito due gruppi di bovine: cinque di queste sono state selezionate per il gruppo controllo, le quali sarebbero state solo monitorate attraverso prelievi di campioni di latte per il test batteriologico e per la SCC, e quindi non sarebbero state sottoposte a trattamento con PRP. Questo per valutare eventuali casi di remissione spontanea. Le altre cinque sono state selezionate per il gruppo trattamento, alle quali sarebbe stato prelevato sia il sangue per la preparazione del PRP, sia il latte per il test batteriologico e per la SCC.

Per quanto riguarda, invece, le mastiti cliniche, sono stati trattati animali (che non facevano parte né del gruppo controllo, né del gruppo trattamento) che in qualsiasi momento, durante la durata dello studio hanno iniziato a mostrare segni di mastite clinica (rossore e/o gonfiore e/o durezza del quarto, febbre, coaguli di latte). A questi animali veniva effettuato un prelievo di sangue e di latte il prima possibile.

Le bovine selezionate, sono state denominate, ai fini dello studio in base al gruppo a cui appartenevano:

- Gruppo "controllo": C1 (nata nel 2018, seconda lattazione), C2 (nata nel 2018, terza lattazione), C3 (nata nel 2016, quinta lattazione), C4 (nata nel 2017, quarta lattazione) e C5 (nata nel 2020, prima lattazione).

- Gruppo “trattamento”: T1 (nata nel 2014, settima lattazione), T2 (nata nel 2020, prima lattazione), T3 (nata nel 2020, seconda lattazione), T4 (nata nel 2017, quarta lattazione) e T5 (nata nel 2018, terza lattazione).
- Gruppo “cliniche”: A1(nata nel 2017, quarta lattazione) e A2 (nata nel 2018, terza lattazione).

3.2 CAMPIONAMENTO E PREPARAZIONE DEI TRATTAMENTI

I prelievi di sangue alle bovine del gruppo trattamento sono stati effettuati il giorno 30 gennaio 2023.

I campioni di latte sia delle bovine del gruppo “trattamento” sia di quelle del gruppo “controllo” sono stati prelevati al giorno 0 (Primo controllo - 30 gennaio 2023) pre - trattamento, al giorno 20 (secondo controllo - 20 febbraio 2023) e al giorno 40 (terzo controllo - 13 marzo 2023) post – trattamento.

I prelievi di sangue sono stati effettuati con le bovine catturate alla rastrelliera. Il sangue è stato prelevato dalla vena mammaria, tramite una sacca per prelievi da 250 mL, con incorporato il tubo di prelievo ed un ago da 16 G. La sacca era inoltre pre – riempita con CPDA-1 (*Citrate, Phosphate, Dextrose, Adenine*), uno specifico anticoagulante.



Figura 3*: Sacca pre – riempita di CPDA – 1, dopo un prelievo.

Durante il prelievo, la sacca doveva essere mantenuta in movimento per permettere la corretta miscelazione tra il sangue e l'anticoagulante, in modo da scongiurare la formazione di eventuali coaguli che avrebbero reso impossibile la preparazione del trattamento.

Una volta raggiunta la quantità di sangue desiderata, veniva estratto l'ago e opportunamente tamponato il punto da cui era stato estratto, per favorire la coagulazione del sangue facendo in modo che si interrompesse il sanguinamento (che, in ogni caso, era minimo).

Per quanto riguarda i prelievi di latte, sono sempre stati effettuati durante la mungitura della sera.

I capezzoli degli animali selezionati, venivano sottoposti inizialmente al pre – dipping di routine, poi puliti con apposita carta assorbente. Subito dopo, il capezzolo veniva ulteriormente disinfettato, soprattutto nell'area dell'orifizio, partendo dai due capezzoli anteriori, per poi passare ai posteriori.

Subito dopo la seconda disinfezione, veniva effettuato il primo prelievo di latte: quello per il test batteriologico. Questo prelievo, effettuato all'interno di una provetta sterile Falcon da 10 mL, doveva essere effettuato nel modo più sterile possibile, per evitare contaminazioni con patogeni provenienti eventualmente da materiale fecale o dalla lettiera, e che avrebbero reso la lettura del test microbiologico difficoltosa se non addirittura vana. Per cercare di rimanere il più sterili possibili, quindi, veniva aperta la provetta sterile, il tappo veniva tenuto nella mano sinistra, rivolto verso il basso, la provetta veniva tenuta sempre nella mano sinistra, a circa 1-2 cm di distanza dall'orifizio del capezzolo e con la mano destra si tirava il capezzolo per far scendere il latte, partendo dai capezzoli posteriori per poi passare a quelli anteriori. Questo perché nel caso in cui durante il prelievo di latte dai capezzoli anteriori, quelli posteriori venissero urtati accidentalmente dalle braccia dell'operatore, la sterilità del campione non era messa a rischio. Venivano così raccolti circa 2 mL di latte da ogni capezzolo, per un totale di 8 mL.

Dopo il prelievo per il test batteriologico, l'animale veniva attaccato alla mungitrice e, a questa veniva attaccato un raccogli – latte (di solito utilizzato per i controlli funzionali dell'Associazione regionale allevatori), all'interno del quale veniva convogliata una certa quantità di latte proveniente dai quattro quarti. Una volta finita l'operazione di mungitura,

venivano versati 40 – 45 mL di latte raccolto all'interno di una provetta tipo “Falcon” da 50 mL.



Figura 4: raccogli – latte.

Per i campioni delle vacche con mastite subclinica, subito dopo il prelievo, sia le sacche di sangue che le provette contenenti il latte, venivano stoccate in un contenitore isotermico in polistirolo, contenenti ghiaccio, e portati il prima possibile in laboratorio.

Per i campioni delle vacche con mastite clinica, invece, i campioni di sangue venivano solitamente effettuati la mattina, post mungitura, stoccati in frigorifero e portati al laboratorio nel giro di 3 – 4 ore. Invece, i campioni di latte venivano prelevati con la mungitura della sera, quindi stoccati in frigorifero fino alla mattina dopo, quando venivano portati in laboratorio.

Le modalità di prelievo sia del sangue che del latte sono state le medesime utilizzate per le mastiti subcliniche, con la sola differenza che i prelievi di latte sono stati effettuati unicamente dal capezzolo del singolo quarto che presentava sintomi di mastite (rossore, gonfiore, durezza).

Una volta arrivati al laboratorio dell'unità di Biochimica del Dipartimento di Scienze Medico Veterinarie dell'Università di Parma, i campioni di sangue venivano sottoposti alla lavorazione per ottenere il PRP.

I campioni di latte per il batteriologico, venivano portati al laboratorio dell'unità di Malattie Infettive del Dipartimento di Scienze Medico Veterinarie dell'Università di Parma, dove venivano seminati sia su piastre di agar sangue, un terreno ricco, che contiene particolari fattori di crescita (supplementi vitaminici, estratto di lievito) e prodotti biologici (sangue e siero), che permettono la crescita di molte specie di batteri, compresi quelli più esigenti (102). Contemporaneamente veniva effettuata una semina anche su piastre di terreno agar - MacConkey, un terreno selettivo e differenziale che contiene particolari sostanze in grado di inibire la crescita di alcuni batteri e consentire, invece, lo sviluppo di altri (102). Tra gli altri ingredienti, l'agar MacConkey contiene anche il lattosio ed un colorante, che vira al fucsia quando il pH scende al di sotto di 6,8 (102). Quindi, ogni microrganismo capace di fermentare il lattosio, acidifica il mezzo e la colonia diventa fucsia; al contrario, i batteri che non fermentano il lattosio, producono colonie incolori (102), come nel caso dei Gram negativi.

Dopo la semina, le piastre venivano lasciate in incubatore a 37°C per almeno 24/48 ore per permettere lo sviluppo delle colonie batteriche.

Se, al termine delle 24/48 ore, sulle piastre erano visibili colonie batteriche in un numero non definibile ad occhio nudo, queste venivano isolate e riseminate per determinare le caratteristiche del patogeno e poterlo, in un secondo momento, identificare.

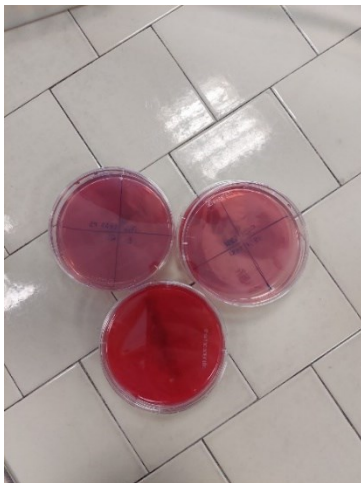


Figura 5: Piastre con Agar Mac Conkey (in alto) piastra con Agar Sangue (in basso) appena seminate.

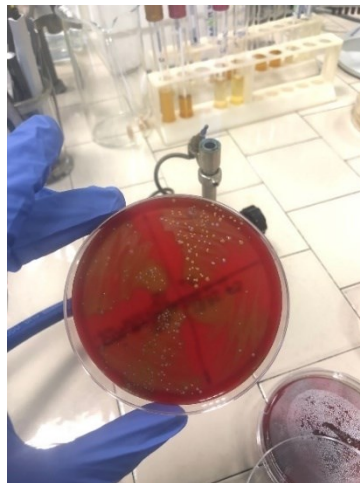


Figura 6: Piastra con Agar Sangue, dopo incubazione a 37°C per 24 ore.

Oltre alla SCC, veniva effettuata anche un'analisi per determinare la DSCC (*Differential Somatic Cell Count*). Le cellule differenziali misurano la percentuale di leucociti

polimorfonucleati, neutrofili e linfociti, all'interno della SCC; questa percentuale indica la presenza di una risposta immunitaria dell'animale nelle prime fasi dell'evento mastitico (101). Grazie alle cellule differenziali, non si analizza più la sanità della mammella solo in base all'ordine decrescente delle cellule somatiche, ma si considerano congiuntamente i due parametri che amplificano la precisione di giudizio (101).

I campioni di latte, prelevati per la conta delle cellule somatiche, venivano portati all'unità di Produzioni Animali del Dipartimento di Scienze Medico – Veterinarie dell'Università di Parma, dove venivano effettuate le SCC e le DSCC attraverso un macchinario Fossomatic™.

La preparazione del PRP avveniva, come detto in precedenza, nel laboratorio dell'unità di Biochimica del Dipartimento di Scienze Medico – Veterinarie dell'Università di Parma.

La modalità di preparazione era quella classica, seguendo il metodo a due centrifugazioni.

Il materiale utilizzato era quindi il seguente:

- Provette tipo “Falcon” da 50 mL, sterili
- Centrifuga
- Pipetta Pasteur
- Siringhe sterili monouso da 12 mL
- Ago sterile da 18G
- Tappi in plastica per siringhe monouso
- Provette Eppendorf da 2 mL
- Provette Eppendorf da 1,5 mL
- Cloruro d'ammonio
- Camera di Bürker

Partendo dalla sacca piena di sangue, opportunamente miscelato con l'anticoagulante CPDA-1 di cui era pre riempita la sacca, si procedeva aprendo la clip che teneva chiuso il tubo di prelievo, per fare in modo che fuoriuscisse il sangue rimasto all'interno di questo, in quanto, non essendoci anticoagulante potevano essere presenti dei coaguli. Successivamente, veniva versato il sangue dalla sacca ad una provetta tipo “Falcon” da 50 mL, facendo attenzione a farlo scorrere lungo le pareti della provetta, per fare in modo di non attivare le piastrine.

Occorreva anche prestare molta attenzione a riempire in modo omogeneo le provette (fino a 50 mL), per favorire poi un corretto bilanciamento all'interno della centrifuga stessa.

Una volta riempita ogni provetta con 50 mL di sangue (quattro provette per ogni animale), queste venivano poste all'interno della centrifuga, effettuando un eventuale bilanciamento. Veniva poi fatta partire la centrifuga per la prima centrifugazione a 600 x g (1690 RPM) per venti minuti.



Figura 7: Provette tipo "Falcon" contenenti 50 mL di sangue, all'interno della centrifuga.

Mentre veniva effettuata la prima centrifugazione, si procedeva effettuando la conta delle piastrine a vista, per mezzo della camera di Bürker. Venivano presi 20 μ L di sangue intero, precedentemente prelevati dalla sacca, posti all'interno di Eppendorf da 2 mL. Con una pipetta da 1000 μ L venivano prelevati 380 μ L di cloruro d'ammonio, il quale aveva il compito di distruggere i globuli rossi e quindi rendere visibili le piastrine al microscopio; inoltre 20 μ L di sangue intero erano riposti in una provetta Eppendorf da 1,5 mL. Dopodichè si attendeva qualche minuto per dare il tempo al cloruro d'ammonio di svolgere il proprio compito. Infatti, se inizialmente il contenuto della provetta Eppendorf da 1,5 mL appariva di un rosso intenso e torbido, dopo qualche minuto diveniva rosso brillante e limpido. Successivamente, con una pipetta da 100 μ L, venivano prelevati 10 μ del contenuto della provetta Eppendorf e venivano inseriti nella camera di Bürker, procedendo quindi con la conta a vista.

Una volta terminata la prima centrifugazione di venti minuti, venivano estratte le provette dalla centrifuga. Quello che si poteva osservare era sostanzialmente il sangue contenuto della provetta diviso in tre frazioni: il primo strato in alto era composto dal plasma, lo strato intermedio, anche detto “*buffy coat*” che solitamente è composto da globuli bianchi e fibrinogeno, ma nel caso della bovina è composto da piastrine e fibrinogeno, e nel terzo strato era possibile osservare i globuli rossi.



Figura 8: Provetta tipo “Falcon” contenente sangue dopo la prima centrifugazione.

Da questo momento in poi, le provette dovevano essere trattate con estrema delicatezza, per fare in modo che le varie componenti non venissero nuovamente mischiate.

Si sono portate quindi le provette sotto cappa, dove con una pipetta Pasteur veniva spostato il plasma dentro ad una nuova provetta tipo “Falcon” da 50 mL sterile. Una volta arrivati vicino al “*buffy coat*”, bisognava procedere con ancora più delicatezza, per fare in modo di raccogliere con la pipetta Pasteur solo il “*buffy coat*” senza andare a toccare o addirittura raccogliere i globuli rossi depositati sul fondo della provetta. Con questa fase, da 4 provette per animale, si passava a 3.

Dopo questa prima fase di separazione del plasma dalla parte corpuscolata depositata sul fondo della provetta, veniva effettuata una seconda centrifugazione, questa volta a 900 x g (2000 RPM) per quindici minuti.

Al termine di questa seconda centrifugazione, era possibile osservare all'interno delle provette il PPP (plasma povero di piastrine) e sul fondo, il pellet piastrinico.

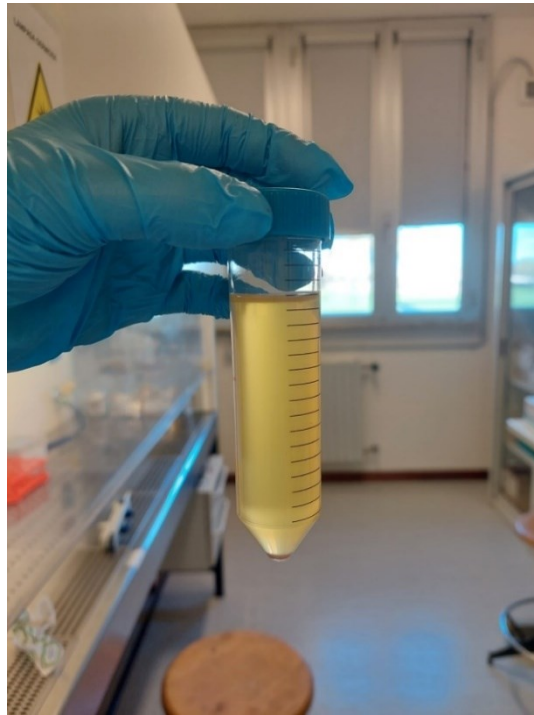


Figura 9: Provetta tipo "Falcon" contenente plasma povero di piastrine (PPP) e pellet piastrinico dopo la seconda centrifugazione.

A questo punto, sempre sotto cappa, con una pipetta Pasteur, si procedeva a spostare il PPP in un'altra provetta tipo "Falcon" da 50 mL, fino ad arrivare ad averne solamente 5 mL sopra al pellet piastrinico. Dopodichè, con una pipetta da 1000 μ L, si procedeva alla disintegrazione del pellet piastrinico. Una volta disintegrato completamente, veniva aspirato con la pipetta e aggiunto alla provetta contenente il PPP precedentemente spostato, ottenendo così il PRP. Questa operazione veniva ripetuta per le 3 provette di ogni animale, fino ad ottenere per gli animali con mastite clinica 100 mL di PPP e 50 di PRP; e per gli animali con mastite subclinica 50 mL di PPP e 50 mL di PRP.



Figura 10: Provette tipo "Falcon" contenenti plasma ricco di piastrine (PRP).

Una volta ottenuto il PRP, i 50 mL venivano divisi in cinque aliquote da 10 mL ciascuno, in modo da ottenere cinque trattamenti. Per preparare le aliquote, venivano prese delle siringhe monouso sterili da 12 mL e tramite un ago da 18G sterile, si procede prelevando il PRP dalla "Falcon" e si riempie la siringa fino a 10 mL. Dopodichè veniva rimosso l'ago e veniva applicato un tappo in plastica alla base di ciascuna siringa.



Figura 11: Siringhe pre – riempite di PRP.

3.3 SOMMINISTRAZIONE E FOLLOW UP

La somministrazione dei trattamenti di PRP alle cinque bovine del gruppo trattamento è avvenuta per quattro mungiture consecutive, quindi ogni 12 ore, partendo dalla mungitura della sera del 31 gennaio 2023, quindi il giorno successivo ai prelievi.

La somministrazione, veniva effettuata dopo la procedura di mungitura, quindi una volta che il gruppo della mungitrice si staccava, il capezzolo, soprattutto nell'area dell'orifizio, veniva passato con una salviettina imbevuta di disinfettante, per rendere l'area di somministrazione il più pulita e sterile possibile. Alla siringa pre – riempita con 8 mL di PRP veniva aggiunto un ago sterile per somministrazioni intramammarie e quindi veniva somministrato il PRP, 2 mL per capezzolo. Alla fine di questa operazione veniva effettuato il post – dipping di routine.

Per quanto riguarda, invece, la somministrazione alle bovine con mastite clinica, veniva effettuata in modo analogo a quello delle vacche con mastite subclinica, le uniche differenze consistevano nel fatto che la siringa veniva riempita con 10 mL anziché 8; il PRP veniva somministrato solo nel capezzolo corrispondente al quarto che mostrava segni di mastite, quindi, i 10 mL della siringa pre riempita andavano tutti ad un solo capezzolo; e invece di quattro somministrazioni, ne venivano effettuate cinque.

Ad una delle due vacche con mastite clinica, oltre alla somministrazione di PRP, è stato somministrato anche il PPP, prodotto ottenuto dalla preparazione del PRP. Questo perché a distanza di una settimana dal trattamento con PRP, le analisi effettuate sul latte evidenziavano ancora uno stato infiammatorio del quarto interessato, con una SCC/ mL di latte superiore a 20×10^5 .

I controlli sul latte delle bovine con mastite subclinica venivano effettuati al giorno 0 (30 gennaio 2023), al giorno 20 (20 febbraio 2023) e al giorno 40 (13 marzo 2023).

Per quanto riguarda invece le bovine con mastiti cliniche, i prelievi di latte venivano effettuati al giorno 0, al giorno 7, e al giorno 14.

4. RISULTATI

Le vacche oggetto di studio erano nove, in quanto una di quelle del gruppo “controllo” è stata trattata con antibiotico due giorni prima dell’inizio dello studio (ed è stata, opportunamente, esclusa dallo studio). Di queste nove, cinque facevano parte del gruppo trattamento e sono state denominate T1, T2, T3, T4 e T5.

Il latte della bovina T1 al controllo funzionale sul latte effettuato dall’Associazione Regionale Allevatori (A.R.A) il 23 gennaio 2023, aveva mostrato una SCC di 655×10^3 cellule per mL di latte. Al primo controllo per questo studio, presentava una SCC di 14.76×10^5 cellule per mL di latte. Al secondo controllo invece 26.74×10^5 cellule per mL di latte.

Il latte della bovina T2 al controllo funzionale dell’A.R.A. del 23 gennaio 2023 aveva mostrato una SCC di 820×10^3 cellule per mL di latte. Al primo controllo per questo studio, presentava una SCC di 96×10^3 cellule per mL di latte. Al secondo controllo la SCC era di 466×10^3 cellule per mL di latte. Al terzo controllo, invece la SCC era di 17.98×10^5 cellule per mL di latte.

Il latte della bovina T3 al controllo funzionale dell’A.R.A del 23 gennaio 2023 aveva mostrato una SCC di 207×10^3 cellule per mL di latte. Al primo controllo per questo studio, presentava una SCC di 52.000 cellule per mL di latte. Al secondo controllo la SCC era di 87×10^3 cellule per mL di latte. Infine, al terzo controllo la SCC era di 135×10^3 cellule per mL di latte.

Il latte della bovina T4 al controllo funzionale dell’A.R.A del 23 gennaio 2023 ha mostrato una SCC di 32.55×10^5 cellule per mL di latte. Al primo controllo per questo studio la SCC era di 31.28×10^5 cellule per mL di latte. Al secondo controllo, la SCC era di 738×10^3 cellule per mL di latte. E, infine, al terzo controllo la SCC era di 536×10^3 cellule per mL di latte.

Il latte della bovina T5 al controllo funzionale dell'A.R.A del 23 gennaio 2023 ha mostrato una SCC di 270×10^3 cellule per mL di latte. Al primo controllo per questo studio la SCC era di 72×10^3 cellule per mL di latte. Al secondo controllo la SCC era pari a 74×10^3 cellule per mL di latte. Infine, il terzo controllo ha evidenziato una SCC di 161×10^3 cellule per mL di latte.

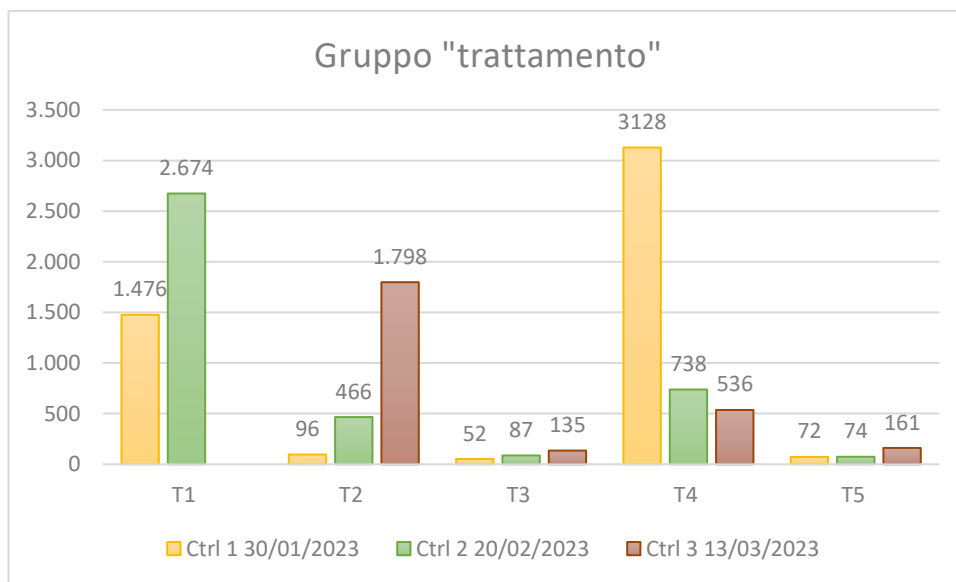


Grafico 1: Conta delle cellule somatiche (SCC) del gruppo "trattamento".

Per quanto riguarda le bovine del gruppo "controllo", come precedentemente indicato, erano quattro in quanto una è stata trattata con antibiotico due giorni prima dell'inizio dello studio, ed è quindi stata esclusa da esso. Le quattro bovine sono quindi state così denominate: C1, C2, C3 e C4.

Il latte della bovina C1 al controllo funzionale dell'A.R.A. effettuato il 23 gennaio 2023, ha mostrato una SCC di 325×10^3 cellule per mL di latte. Al primo controllo del presente studio, la SCC era di 10.37×10^5 cellule per mL di latte; al secondo controllo era di 102×10^3 cellule per mL di latte. Al terzo ed ultimo controllo la era di 24×10^3 cellule per mL di latte.

Il latte della bovina C2 al controllo funzionale dell'A.R.A. aveva una SCC di 14.24×10^5 cellule per mL di latte. Al primo controllo svolto per questo studio la SCC era di 17.70×10^5 cellule per mL di latte; al secondo controllo la era di 630×10^3 cellule per mL di latte, infine, al terzo controllo era di 724×10^3 cellule per mL di latte.

Il latte della bovina C3 al controllo funzionale effettuato dall'A.R.A. presentava una SCC di 567×10^3 cellule per mL di latte. Al primo controllo per questa tesi, la SCC corrispondeva a 18.48×10^5 cellule per mL di latte; al secondo controllo era di 324×10^3 cellule per mL di latte; e al terzo controllo 99×10^3 cellule per mL di latte.

Il latte della bovina C4 al controllo funzionale dell'A.R.A. presentava una SCC di 618×10^3 cellule per mL di latte. Al primo controllo effettuato per questo studio, la SCC era di 569×10^3 cellule per mL di latte; al secondo controllo era 46×10^3 cellule per mL di latte.

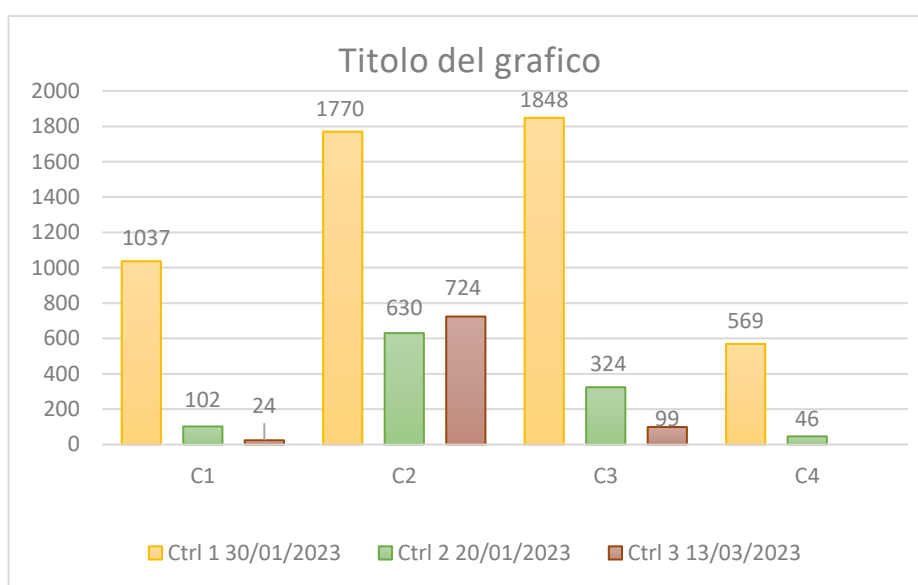


Grafico 2: Conta delle cellule somatiche (SCC) del gruppo "controllo".

Per quanto riguarda gli esami batteriologici sui campioni di latte, il latte della bovina T1 al primo controllo è risultato positivo a *S. aureus*, mentre al secondo controllo, è risultato sterile.

Il campione di latte della bovina T2, ai primi due controlli, è risultato positivo a colonie di flora polimicrobica, al terzo controllo, invece, il latte è risultato positivo a streptococchi coagulasi – positivi.

Il campione di latte della bovina T3 al primo controllo è risultato positivo a *S. capitis* e flora polimicrobica; al secondo controllo solo a flora polimicrobica; mentre gli esiti del terzo controllo, hanno segnalato la presenza di stafilococchi coagulasi – positivi.

Il campione di latte della bovina T4, in tutti e tre i controlli, è sempre risultato positivo a *Staphylococcus spp.*

Il campione di latte della bovina C1 è risultato positivo a flora polimicrobica, ai primi due controlli. Gli esiti del terzo controllo hanno evidenziato la positività a streptococchi coagulasi - positivi.

Il campione di latte della bovina C2 per i primi due controlli è risultato positivo a flora polimicrobica, mentre al terzo ed ultimo controllo il campione è risultato sterile.

Il campione di latte della bovina C3 è risultato positivo al primo controllo a flora polimicrobica, al secondo controllo a *S. capitis* e al terzo a *Staphylococcus spp.*

Il campione di latte della bovina C4 al primo controllo è risultato positivo a *Staphylococcus spp.*, al secondo controllo era positivo a flora polimicrobica. I risultati del terzo controllo hanno evidenziato la presenza di streptococchi coagulasi – positivi.

Per quanto riguarda il gruppo delle *mastiti cliniche*, sono state trattate due bovine denominate A1 e A2.

La bovina A1 ha iniziato a mostrare sintomi di mastite clinica al quarto posteriore sinistro il 26 gennaio 2023. I sintomi mostrati erano coaguli di latte, gonfiore, rossore, durezza del quarto e malessere generale. Si è quindi proceduto al prelievo di sangue per la preparazione del PRP e ai prelievi di latte per la SCC e l'esame batteriologico.

Nella mungitura della sera del 28 gennaio si è quindi iniziato con la somministrazione di PRP, 10 mL nel capezzolo posteriore sinistro, per cinque mungiture consecutive.

Al controllo funzionale dell'A.R.A. del 23 gennaio 2023, la SCC era di 126.71×10^5 cellule per mL di latte. Al primo controllo per questo studio, effettuato il 27 gennaio 2023, invece, la SCC era di 70.49×10^5 cellule per mL di latte; al secondo controllo, effettuato il 3 febbraio, era di $2.5.56 \times 10^5$ cellule per mL di latte; al terzo controllo, effettuato il 10 febbraio, era di 39.02×10^5 cellule per mL di latte; al quarto ed ultimo controllo, effettuato il 20 gennaio, la SCC era di 35.22×10^5 cellule per mL di latte.

Per quanto riguarda l'esame batteriologico, il campione di latte della bovina A1 è risultato sterile in tutti e quattro i controlli effettuati.

La bovina A2 ha iniziato a mostrare sintomi di mastite clinica al quarto posteriore sinistro nella mungitura della mattina del 7 marzo 2023. I sintomi riscontrati erano febbre, malessere

generale, coaguli di latte, gonfiore, rossore e durezza del quarto. Si è quindi proceduto al prelievo di sangue e di latte, per la preparazione del PRP, per effettuare la SCC e l'esame batteriologico.

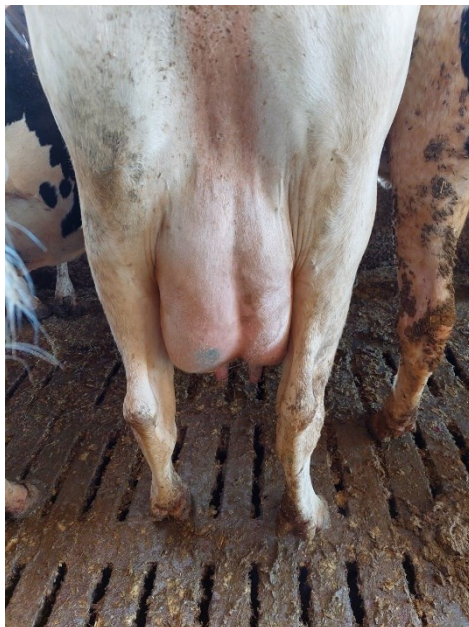


Figura 12: Mammella della bovina A2. È possibile notare il quarto posteriore sinistro gonfio.

Nella mungitura della sera del 7 marzo si è quindi iniziato con la somministrazione di PRP, 8-10 mL nel capezzolo posteriore sinistro, per cinque mungiture consecutive.

Al controllo funzionale dell'A.R.A. del 1° marzo 2023, la SCC era di 355×10^3 cellule per mL di latte. Al primo controllo per lo studio, effettuato in data 8 marzo 2023, la SCC era di 23.16×10^5 cellule per mL di latte; al secondo controllo, effettuato il 14 marzo 2023, la SCC era di 10.45×10^5 cellule per mL di latte; ed infine, al terzo controllo effettuato il 21 marzo, la SCC era 28.53×10^5 cellule per mL di latte.

Per quanto riguarda l'esame batteriologico, il latte di questa bovina è risultato positivo a stafilococchi di tipo coagulasi – positivi.

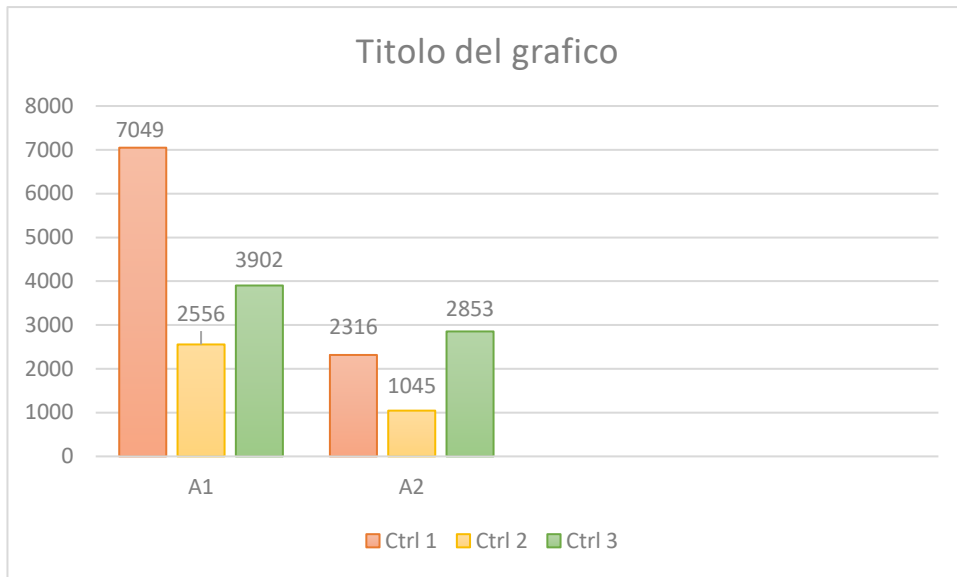


Grafico 3: Conta delle cellule somatiche (SCC) del gruppo di bovine con mastite clinica.

5. DISCUSSIONE

Nella parte di studio riguardante le bovine con mastite subclinica, in base ai risultati ottenuti dal gruppo “trattamento” è possibile evidenziare che, le bovine T1, T2, T3 e T5 hanno mostrato un aumento graduale della SCC tra il primo e il secondo e poi tra il secondo e il terzo controllo.

La bovina T1 ha mostrato un aumento significativo dal controllo funzionale svolto dall’A.R.A. Oltre al valore di SCC alto, al primo controllo, era al di sopra della soglia anche il valore delle DSCC, che era di 74.9, mentre al secondo controllo era 76.4. Questo valore, se al di sopra di 68.5 indica uno stato infiammatorio in atto. Tra il secondo e il terzo controllo, infatti, la bovina ha iniziato a mostrare sintomi di mastite clinica quali coaguli di latte, gonfiore, rossore e durezza del quarto posteriore destro. Per questo è stata rimossa dallo studio ed è stata trattata seguendo il protocollo dell’allevamento, con antibiotico per via intramammaria. In seguito a problemi riproduttivi, che non avevano niente a che fare con la mastite, in quanto il trattamento antibiotico ha avuto un esito positivo, la bovina T1 è stata riformata.

Al primo controllo, i valori di DSCC delle bovine T2 e T5 erano al di sotto di 68.5, mentre quello della bovina T3 era 71.8. Invece, quello della bovina T4 era abbondantemente al di sopra del valore – soglia (84.5). Al secondo controllo, i valori di tutte le bovine si sono abbassati, T3 e T5 erano abbondantemente sotto il valore – soglia; mentre T2 era leggermente aumentato; T4 era diminuito rispetto al controllo precedente, ma comunque oltre il 68.5. Al terzo controllo, T5 continuava ad essere al di sotto del valore – soglia; T4 continuava a mostrare una diminuzione del valore, scendendo addirittura al di sotto di 68.5; T3 e T2 avevano nuovamente valori più alti, T2 abbondantemente sopra il valore – soglia.

Questi risultati risultano abbastanza in linea con i risultati ottenuti attraverso la SCC, in quanto, l’unica bovina (T4) che ha mostrato una diminuzione della SCC, ha dimostrato anche una diminuzione del valore di DSCC, a segnalare una graduale guarigione.

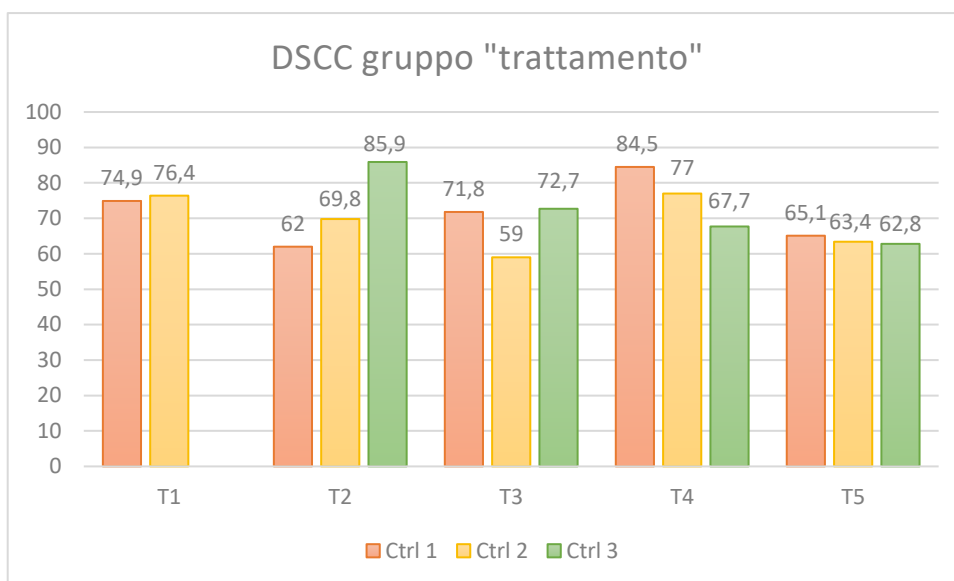


Grafico 4: Conta delle cellule somatiche differenziali del gruppo "trattamento".

Per quanto riguarda le bovine con mastite subclinica, del gruppo "controllo" si può notare una remissione spontanea della mastite in tre animali su quattro. Infatti, per quanto riguarda la SCC solo la bovina C2 ha mostrato un leggero aumento tra il secondo e il terzo controllo.

Relativamente ai valori di DSCC, invece, la bovina C1 è passata dal valore 86.3 del primo controllo, al 56.9 del terzo controllo; la bovina C2 è rimasta sempre sopra al valore – soglia passando dal 78.9 del primo controllo, al 71.1 del secondo controllo, per poi tornare a salire a 79.6 del terzo controllo; la bovina C3 è passata dal 86.2 del primo controllo al 75.6 del terzo controllo, è andata quindi diminuendo, ma è rimasta sempre sopra al valore – soglia; la bovina C4 invece, è passata dal 78.8 del primo controllo al 44.1 del secondo controllo.

La bovina C4, tra il secondo e il terzo controllo, ha iniziato a manifestare sintomi di mastite quali coaguli di latte, gonfiore, rossore, del quarto anteriore destro e posteriore destro, febbre e malessere generale. È quindi stata trattata con antibiotico per via intramammaria, come da protocollo aziendale. Il trattamento non ha, però, avuto esito positivo, e la bovina è stata mandata al macello.

Fatta eccezione per questo caso, i risultati delle bovine C1 e C3 del gruppo “controllo” hanno mostrato una tendenza alla diminuzione sia della SCC, sia della DSCC. La bovina C3 invece, ha dimostrato un primo miglioramento tra il primo e il secondo controllo sia per quanto riguarda la SCC che la DSCC, per poi peggiorare nuovamente tra il secondo e il terzo controllo.

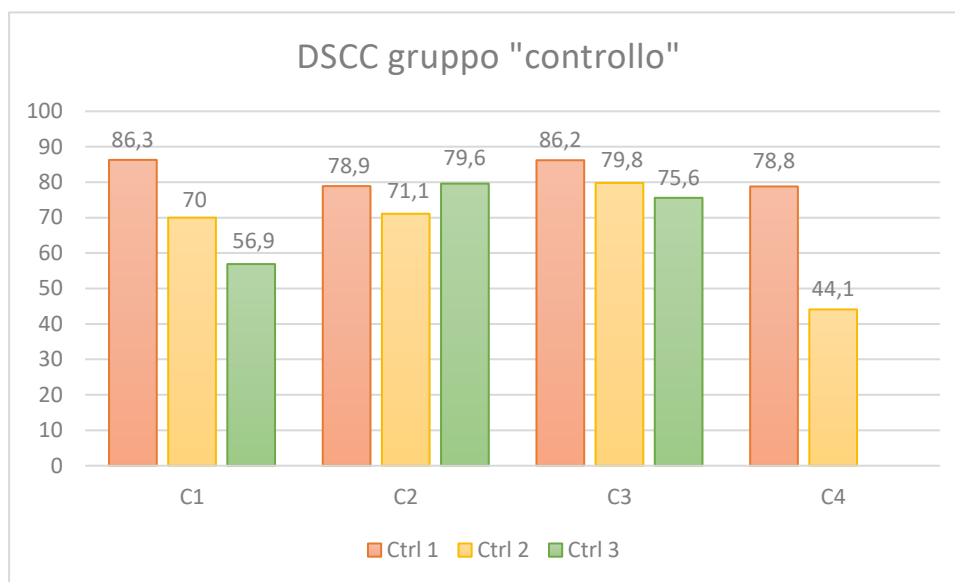


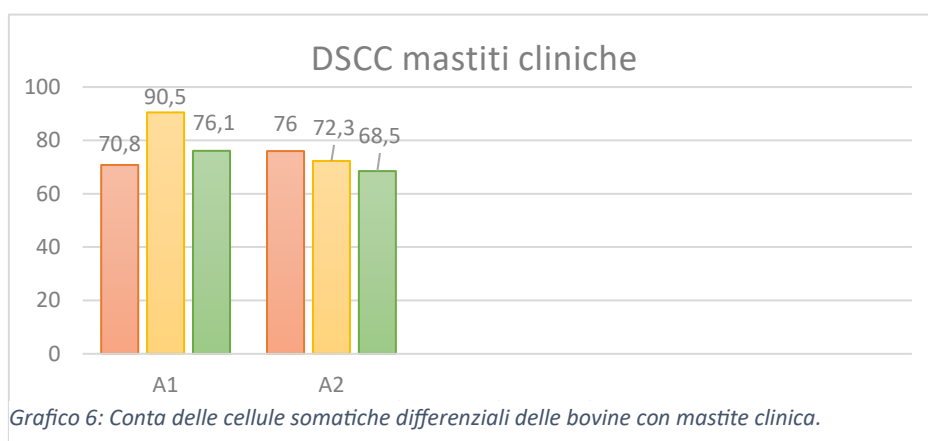
Grafico 5: Conta delle cellule somatiche differenziali del gruppo “controllo”

Analizzando il caso della bovina A1, è bene precisare inizialmente che la SCC determinata dal controllo funzionale dell’A.R.A. in data 23 gennaio 2023, è riferita al latte derivante da tutti e quattro i capezzoli della bovina. Mentre i risultati ottenuti dalla SCC effettuata per questo studio, si riferiscono al latte derivante solamente dal capezzolo posteriore sinistro, corrispondente al quarto interessato dalla mastite clinica.

Sempre in riferimento alla bovina A1, il valore della SCC al primo controllo è 7.049.000 cellule per mL di latte, probabilmente valore sottostimato. Al secondo controllo, il valore della SCC era diminuito a 2.556.000, ma al terzo controllo è aumentato di nuovo a 3.902.000. Proprio in seguito a questo aumento, si è deciso di provare a sottoporre la bovina ad un trattamento con 5 somministrazioni di PPP, anche se i sintomi visibili come gonfiore, rossore, durezza del quarto e febbre non erano più presenti. Dopo sette giorni dall’ultima somministrazione del PPP, è stato effettuato un quarto controllo che ha dimostrato una leggera diminuzione della SCC. Alla fine dei quattro controlli, nonostante i sintomi si fossero risolti e la SCC era in diminuzione, la DSCC rimaneva comunque elevata, con un valore di 76.1. Per circa due

settimane dopo la somministrazione di PPP, continuavano ad essere presenti coaguli di latte, ma nonostante questo, l'animale stava bene.

Considerando, invece i risultati ottenuti con la bovina A2, anche in questo caso, il valore della SCC determinato dal controllo funzionale dell'A.R.A. del 1° marzo 2023 si riferiscono al latte prelevato dai quattro capezzoli, mentre i valori ottenuti in questo lavoro, corrispondono al latte prelevato esclusivamente dal capezzolo posteriore sinistro, corrispondente al quarto interessato da mastite clinica. È possibile notare come la SCC in questa bovina, sia inizialmente diminuita tra il primo e il secondo controllo, per poi tornare a salire tra il secondo e il terzo. Se si valuta la DSCC invece, il latte di questa bovina è partito da 76.2, al di sopra del valore – soglia, quindi effettivamente era presente uno stato infiammatorio, per poi scendere a 68.5 all'ultimo controllo. Essendo questo il valore – soglia, si può definire questa bovina in uno stato *border line* per quanto riguarda uno stato infiammatorio. Ad un esame visivo, però non era più presente alcun sintomo riportabile a gonfiore, rossore o durezza del quarto, già dopo tre giorni dall'ultima somministrazione. Inoltre, questa bovina non è stata trattata nemmeno con antipiretico, in quanto il prelievo è stato fatto la mattina in cui è iniziata l'infiammazione, subito dopo la mungitura e il primo trattamento è stato effettuato la sera stessa durante la mungitura. La mattina seguente, dopo due trattamenti con PRP, anche la febbre non era più presente. L'unico sintomo persistente fino a due settimane post – trattamento era la presenza di coaguli nel latte. Per quanto riguarda le bovine con mastite subclinica che non sono state trattate, nella maggior parte dei casi si è ottenuta una remissione spontanea della mastite. Questo può indicare che, probabilmente al momento del prelievo, era presente uno stato infiammatorio, anche minimo dovuto alla presenza di qualche contaminazione, magari ambientale, che tra un controllo e l'altro è stata eliminata.



A proposito dei due animali che sono stati eliminati dallo studio, T1, è passata da una fase subclinica ad una fase clinica tra il secondo e il terzo controllo. Probabilmente, il processo infiammatorio acuto era già in atto al momento del primo controllo e il PRP somministrato da solo non è stato in grado di stimolare la risposta immunitaria dell'animale, per fare in modo di risolvere la mastite; infatti, si è resa necessaria la somministrazione dell'antibiotico, che ha avuto esito positivo. La bovina è stata poi riformata per problemi riproduttivi, non dovuti alla presenza di mastite.

Nel caso della bovina C4, anche se inizialmente sembrava che la mastite subclinica stesse per regredire in modo autonomo, alla fine, si è scatenato un processo infiammatorio che ha portato allo sviluppo di una mastite clinica molto importante, per la quale è stato necessario sottoporre la bovina a trattamento antibiotico sia per via intra – mammaria che intra – muscolare. Purtroppo, questo trattamento non ha avuto esito positivo e l'allevatore ha deciso di mandare l'animale al macello.

Esaminando i risultati ottenuti, è quindi possibile dedurre che nel caso delle bovine con mastite subclinica, il PRP si è dimostrato un aiuto per la risoluzione della cronicità della mastite, ma sarebbe bene affiancare alla somministrazione di PRP anche un antibiotico, per fare in modo che la risoluzione della mastite sia completa.

Invece, per quanto riguarda le bovine con mastite clinica, anche se sotto l'aspetto della SCC non si sono avuti grandi risultati, in quanto i valori sono sempre rimasti al di sopra del valore – soglia, per quanto riguarda la DSCC nell'animale A2 si sono riscontrati evidenti segni di miglioramento, a prova del fatto che il PRP ha indotto la corretta risposta immunitaria all'infiammazione creatasi.

Esaminando, infine, i risultati ottenuti a partire dai campioni di latte prelevati per gli esami batteriologici, è emerso che, per l'animale A1 che ai primi tre controlli è risultato sterile, al quarto controllo, dopo la somministrazione di PPP, è stata rilevata la presenza di *S. aureus*. Risultato interessante, in quanto, durante la fase acuta con sintomi, non è stato possibile identificare alcun patogeno. Non appena i sintomi sono scomparsi, è stato possibile identificare *S. aureus*, un patogeno estremamente contagioso.

Per quanto riguarda la bovina A2 è sempre risultata positiva a stafilococchi coagulasi – positivi, tra cui il più patogeno è *S. aureus*. Questi stafilococchi coagulasi – positivi sono in grado di produrre enterotossine che possono, potenzialmente, causare gravi intossicazioni alimentari.

Per quanto riguarda le bovine con mastite subclinica, la maggior parte è risultata positiva ad alcune specie di *Staphylococcus spp*, e a flora polimicrobica, ovvero diversi microrganismi non patogeni appartenenti a specie diverse, probabilmente sintomo di una contaminazione del campione da parte di batteri presenti sul capezzolo al momento del prelievo, in ragione di una non efficace disinfezione preliminare.

6. CONCLUSIONI

I dati raccolti in questo studio di tesi non possono considerarsi esaustivi e non possono essere tratte delle conclusioni definitive sull'utilizzo del PRP per il trattamento sia di mastiti cliniche che subcliniche.

È auspicabile, tuttavia, che vengano effettuati ulteriori studi a conferma degli ottimi e soddisfacenti risultati ottenuti.

Bibliografia

1. **BDN, anagrafe nazionale zootecnica.** *Dati forniti dalla BDN dell'Anagrafe Zootecnica istituita dal Ministero della Salute presso il CSN dell'Istituto "G. Caporale" di Teramo*. 2022.
2. *La biosicurezza in veterinaria.* **Capretti, S. e al, et.** s.l. : fondazione iniziative zooprofilattiche e zootecniche - brescia, 2009.
3. **Rinaldi, Elena.** *Benessere animale e sistema ClassyFarm nell'allevamento bovino da latte*. 2021.
4. *Il benessere animale nelle aziende bovine da latte.* **Corsi, I., et al.** 84, 2014, Sanità Pubblica Veterinaria, p. 7-20.
5. *Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows.* **Esposito, G., et al.** 2014, Animal Reproduction Science, Vol. 144, p. 60-71.
6. *Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing.* **Wathes, D.C. e al, et.** 2007, Theriogenology, p. S232-S241.
7. *The Relationship Between Milk Yield and the Incidence of Some Diseases in Dairy cows.* **Fleischer, P. e al, et.** 2001, Journal of Dairy Science, Vol. 84, p. 2025-2035.
8. *Scientific Opinion on the overall effects of farming systems on dairy cow welfare and disease.* **EFSA.** 2009, EFSA Journal, p. 1-38.
9. **Bittante, G. e Cecchinato, A.** *L'indice sanità della mammella (UHI - Udder health index) per la valutazione della sanità.* s.l. : Anarb, 2019.
10. *Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review.* **Halasa, T., et al.** 2007, Veterinary Quarterly, p. 18-31.
11. *Bovine Mastitis: An Evolving Disease.* **Bradley, A.J.** 2002, The Veterinary Journal, p. 116-128.
12. **Zecconi, A.** *Mastite Bovina* . s.l. : edagricole, 2010.
13. *Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments - a review.* **Cheng, W. N. e Han, S. G.** 2020, Asian - Australasian Journal of animal sciences, p. 1699-1713.
14. *Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches.* **Gomez, Fernanda e Herniques, Mariana.** 2016, current microbiology, p. 72-76.
15. *Therapy of Subclinical Mastitis During Lactation.* **S., McDougall, L. M., Clausen, H. M., Hussein e Compton, and C. W. R.** 2022, Antibiotics, p. 1-13.
16. *An update on environmental mastitis: challenging perceptions.* **Klaas, I.C. e Zadoks, R.N.** 2018, Transbound Emerg dis, p. 166-185.
17. *Risk factors for bovine mastitis with the isolation and identification of Str. agalactiae from farms in and around Haramaya district, eastern Ethiopia.* **Lakew, B.T., Fayera, T. e Ali, Y.M.** 2019, Trop Anim Health Prod, p. 1507-1513.
18. *Effects of tail docking on milk quality and cow cleanliness.* **Schreiner, D. e Ruegg, P.** 2002, Dairy Sci, p. 2503-2511.

19. *Bovine mastitis: a review of causes and epidemiological point of view*. **Kibebew, K.** 2017, Biol Agric Health, p. 1-14.
20. *Relationship of somatic cell count and mastitis: an overview*. **Sharma, N., Singh, N. e Bhadwal, M.** 2011, Asian - australas journal Animal sciences, p. 429-438.
21. *Environmental mastitis*. **Smith, K.L. e Hogan, J.S.** 1993, Vet clin North am food anim Pract, p. 489-498.
22. *Bovine mastitis: an evolving disease*. **Bradley, A.J.** 2002, Vet Journal, p. 116-128.
23. **Bogni, C., et al.** *War against mastitis: current concepts on controlling bovine mastitis pathogens*. Spain : Badajoz, 2011.
24. *Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of Staphylococcus aureus for biofilm formation*. **Vasudevan, P., et al.** 2003, Veterinary microbiology, p. 179-185.
25. *Knowledge gaps and research priorities in Staphylococcus aureus mastitis control*. **Rainard, P., et al.** 2018, Transbound and emerging diseases, p. 149-165.
26. *Differential response of bovine mammary epithelial cells to Staphylococcus aureus ore Escherichia coli agonists of the innate immune system*. **Gilbert, F.B., et al.** 2013, Veterinary Research, p. 40.
27. *Phenotypic and genotypic*. **Hamid, S., Bhat, M.A. e I.A. Mir, et al.** 2017, Vet World , p. 363-367.
28. *Invasive potential of biofilm-forming Staphylococci bovine subclinical mastitis*. **Oliveira, M., et al.** 2011, Journal of Veterinary Science , p. 95-97.
29. *Slime production and antibiotic susceptibility in Staphylococci isolated from clinical samples*. **Arslan, S. e Ozkardes, F.** 2007, Mem Inst Oswaldo Cruz, p. 29-33.
30. *Control of bovine mastitis: old and recent therapeutic approaches*. **Gomez, F. e Henriques, M.** 2016, Curr Microbiol, p. 377-382.
31. *Biofilm mediates Enterococcus faecalis adhesion, invasion and survival into bovine mammary epithelial cells*. **Elhadidy, M. e Zahran, E.** 2014, Letters in Applied Microbiology, p. 248-254.
32. *Occurrence of enterococci in mastitic cow's milk and their antimicrobial resistance*. **Róžańska, H., et al.** 2019, Journal of veterinary research, p. 93-97.
33. *Molecular epidemiology of recurrent clinical mastitis due to Streptococcus uberis: evidence of both an environmental source and recurring infection with the same strain*. **Abureema, S., et al.** 2014, Journal of Dairy Science, p. 285-290.
34. *Bovine Streptococcus uberis intramammary infections and mastitis*. **Krömker, V., et al.** 2014, Clinical Microbiology, p. 1-7.
35. **Zecconi, A. e Zanirato, G.** *Controllo delle mastiti per un allevamento sostenibile*. 2013.
36. *A treatise on bovine mastitis: disease and disease economics, etiological basis, risk factors, impact on human health, therapeutic management, prevention and control strategy*. **Shaheen, M., Tantary, H. e Nabi, S.** 2016, Advances in dairy science, p. 1-10.

37. *Reproduction, mastitis, and body condition of seasonally calved Holstein and Jersey cows in confinement or pasture systems.* **Washburn, S.P., et al.** 2002, Journal of Dairy Science, p. 105-111.
38. *Udder health in beef cows and its association with calf growth.* **Waller, K.P., et al.** 2014, Acta veterinaria scandinavica , p. 1-8.
39. *Effect of age and stage of lactation on whey protein content in milk of cows of different breeds.* **Król, J., et al.** 2013, Polish Journal of Veterinary Science , p. 395-397.
40. *Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier?* **Drackley, J.K.** 11, 1999, Journal of Dairy Science, Vol. 82, p. 2259-2273.
41. *Intramammary infection with coagulase-negative staphylococci at parturition: Species-specific prevalence, risk factors, and effect on udder health.* **Visscher, A. De, et al.** 2016, Journal of dairy sciences , p. 6457-6469.
42. *Bovine mastitis: prevalence, risk factors and isolation of Staphylococcus aureus in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia.* **Abebe, R., et al.** 2016, BMC Veterinary Research.
43. *A review of the factors affecting the costs of bovine mastitis.* **Petrovski, K.R., Trajcev, M. e Buneski, G.** 2, 2006, Journal of the South African Veterinary Association , Vol. 77, p. 52-60.
44. *Estimating the costs associated with endemic diseases of dairy cattle.* **Bennet, R. M., Christiansen, K. e Hadley, R. S. Clifton-** 1999, Journal of dairy research, p. 455-459.
45. *Relationship Between Lactation Measures of Somatic Cell Concentration and Milk Yield.* **Raubertas, R. F. e Shook, G. E.** 1982, Journal of Dairy Science, p. 419-425.
46. *Role of several Staphylococcus aureus virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland.* **Daprà, V., et al.** 2006, Microbial Pathogenesis, p. 177-183.
47. *I bassi contenuti di calcio e fosforo e le anomalie di coagulazione del latte: il ruolo delle cellule somatiche.* **Summer, A., et al.** 2013.
48. *Managing to lower cell counts in Switzerland.* **Schallibaum, M.** FIL-IDF Bulletin , p. 50-53.
49. *California mastitis test scores as indicators of subclinical intra-mammary infections at the end of lactation in dairy cows.* **Bhutto, A., Murray, R. e Woldehiwet, Z.** 2010, Research in Veterinary Science, Vol. 92, p. 13-17.
50. *Bovine mastitis and its therapeutic strategy doing antibiotic sensitivity test.* **Hossain, M., et al.** 2017, Austin Journal Veterinary Science & Animal Husbandry, Vol. 4, p. 1-12.
51. *Update on dry cow therapy 1. antibiotic v non-antibiotic approaches.* **Biggs, A.** 2017, In practice, p. 328-333.
52. *Risk for the development of Antimicrobial Resistance (AMR) due to feeding of calves with milk containing residues of antibiotics.* **Ricci, A., et al.** 2017, Efsa journal.
53. *Bovine mastitis therapy and why it fails: continuing education.* **Du Preez, J.** 2000, Journal of South Africa Veterinary Association, p. 201-208.
54. *Mammary tissue damage during bovine mastitis, causes and control.* **Zhao, X. e Lacasse, P.** 2008, Anim Sci, p. 57-65.

55. *Mastitis vaccines in dairy cows: Recent developments and recommendations of application.* **Ismail, Z.B.** 2017, Veterinary World, p. 1057-1062.
56. *Which are important targets in development of S. aureus mastitis vaccine?* **Scali, F., et al.** 2015, Research in Veterinary Science, p. 88-99.
57. *A 100-year review: Mastitis detection, management, and prevention.* **Ruegg, P.L.** 2017, Journal of dairy science , p. 10381-10397.
58. *Invited review: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control.* **Vlieghe, S. De, et al.** 2012, Journal of dairy science, p. 1025-1040.
59. *A Review on "Bovine Sub-Clinical Mastitis in Nepal: Sustainable Management Strategy.* **Bhattarai, A., Kaphle, K. e Adhikari, and P.** 2020, International Journal of Food Science and Agriculture, p. 80-89.
60. *Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century.* **Fair, R.J. e Tor, Y.** 2014, Perspectives in Medicinal Chemistry, p. 25-64.
61. *Effective treatment of bovine mastitis with intramammary infusion of Angelica dahurica and Rheum officinale extracts.* **Yang, W.T., et al.** 2019, Hindawi, p. 1-8.
62. *Effects of plants containing secondary compounds with palm oil on feed intake, digestibility, microbial protein synthesis and microbial population in dairy cows.* **Anantasook, N., et al.** 2013, Asian Australas. Journal Animal Science, p. 820-826.
63. *Medicinal plants based products tested on pathogens isolated from mastitis milk.* **Paşca, C., et al.** 2017, Molecules , p. 1473- 1488.
64. *Antibacterial activity of essential oils, their blends and mixtures of their main constituents against some strains supporting livestock mastitis.* **Fratini, F., et al.** 2014, Fitoterapia, p. 1-7.
65. *Therapeutic effect of oregano essential oil on subclinical bovine mastitis caused by Staphylococcus aureus and Escherichia coli.* **Cho, B.W., et al.** 2015, Korean Journal of Veterinary Research, p. 253-257.
66. *Effect of oregano and caraway essential oils on the production and flavor of cow milk.* **Lejonklev, J., et al.** 2016, Journal of Dairy Science, p. 7898-7903.
67. *Antimicrobial effect and mode of action of terpeneless cold-pressed Valencia orange essential oil on methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* **Muthaiyan, A., et al.** 2012, Journal Applic. Microb., p. 1020-1033.
68. *The effect of citrus-derived oil on bovine blood neutrophil function and gene expression in vitro.* **Garcia, M., et al.** 2015, Journal of Dairy Science, Vol. 98, p. 918-926.
69. *Development of new strategy for non-antibiotic therapy: bovine lactoferrin has a potent antimicrobial and immunomodulator effects.* **Hafez, S.M.A. El, et al.** 2013, Advances in Infectious Diseases, p. 185-192.
70. *Intramammary treatment using allogeneic pure platelet-rich plasma in cows with subclinical mastitis caused by Gram-positive bacteria.* **Duque-Madrid, P., et al.** 2021, Scientific Report, p. 1-14.

71. *Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments — A review*. **Cheng, W. N. e Han, S. G.** 2022, *Asian-Australas Journal Animal Science* , p. 1699-1713.
72. *Intramammary administration of platelet concentrate as an unconventional therapy in bovine mastitis: First clinical application*. **Lange-Consiglio, A., et al.** 2014, *Journal of Dairy Science*, p. 6223-6230.
73. *Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, platelet-rich fibrin-PRF) for topical*. **Dohan Ehrenfest, D. M., et al.** 2014, *Muscles, Ligaments and Tendons Journal*, p. 3-9.
74. *Effects of sodium citrate and acid citrate dextrose solutions on cell counts and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel*. **Giraldo, C.E., Álvarez, M.E. e Carmona, J. U.** 2015, *BMC Veterinary Research*, p. 1-7.
75. *Antimicrobial activity of platelet-leukocyte gel against staphylococcus aureus*. **Moojen, D.J.F. e al, et.** 2008, *JOURNAL OF ORTHOPAEDIC RESEARCH*, p. 404-410.
76. *Effect of equine leukocyte-reduced platelet concentrates on methicillin-resistant Staphylococcus aureus cultures and measurement of temporal growth factor degradation*. **López, C., Álvarez, M.E. e Carmona, & J.U.** 2015, *Journal of Equine Veterinary Science*, p. 219-224.
77. *Efficacy of leukocyte- and platelet-rich plasma gel (L-PRP gel) in treating osteomyelitis in a rabbit model*. **Li, G. Y., et al.** 2013, *Wiley Online Library*, p. 949-956.
78. *Unique antimicrobial effects of platelet-rich plasma and its efficacy as a prophylaxis to prevent implant-associated spinal infection*. **Li, H., et al.** 2013, *Advanced Healthcare Materials*, p. 1277-1284.
79. *Antimicrobial activity of platelet (PLT)-poor plasma, PLT-rich plasma, PLT gel, and solvent/detergent-treated PLT lysate biomaterials against wound bacteria*. **Burnouf, T., et al.** 1, 2014, *The journal of AABB*, Vol. 53, p. 138-146.
80. *Plasma components and platelet activation are essential for the antimicrobial properties of autologous platelet-rich plasma: An in vitro study*. **Drago, L., et al.** 2014, *Plos one*, Vol. 9.
81. *Modular determinants of antimicrobial activity in platelet factor-4 family kinocidins*. **Yeaman, M.R. e all, et.** 2007, *Biochimica et biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, p. 609-619.
82. *Temporal bacteriostatic effect and growth factor loss in equine platelet components and plasma cultured with methicillin-sensitive and methicillin-resistant staphylococcus aureus: A comparative in vitro study*. **López, C., Álvarez, M.E. e Carmona, & J.U.** 2014, *Veterinary Medicine International*, p. 1-8.
83. *Effects of platelet-rich plasma in a model of bovine endometrial inflammation in vitro*. **Marini, M. G., et al.** 2016, *Riprodutive Biology and Endocrinology* , p. 1-17.
84. *Platelet-Rich Plasma: Evidence to Support*. **Marx, R. E.** 2004.
85. *Molecular basis of anti-inflammatory action of platelet-rich plasma on human chondrocytes: mechanisms of NF- κ B inhibition via HGF*. **Bendinelli, P., et al.** 2010, *Journal of Cellular Physiology*, p. 757-766.

86. *Platelet rich plasma: evidence to support its use.* **Marx, R.E.** 2004, Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, p. 489-946.
87. *Physiological parameters to identify suitable blood donor cows for preparation of PRP.* **Lange-Consiglio, A., et al.** 2021, Animals, p. 1-13.
88. *PRP: growth factors and pro- and anti-inflammatory properties.* **El-Sharkawy, H., et al.** 2007, Journal of Periodontology, p. 661-669.
89. *Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration.* **Anitua, E., et al.** 2004, Thrombosis and Haemostasis, p. 4-15.
90. *Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel.* **Kevy S., Jacobson M.** 2001, The Journal of Extra - Corporal Technology, p. 28-35.
91. *Mitogenic stimulation of human mesenchymal stem cells by platelet release suggest a mechanism for enhancement of bone repair by platelet concentrates.* **Haynesworth, S., et al.** Boston : s.n., 2002, Semantic Scholar .
92. *Fibroblast proliferation due to exposure to a platelet concentrate in vitro is pH dependent.* **Lui, Y., et al.** 2002, Wound Repair and Regeneration , p. 336-340.
93. *Sample preparation technique and white cell content influence the detectable levels of growth factors in platelet concentrates.* **Zimmermann, R., et al.** 2003, Vox sanguinis, p. 283-289.
94. *Effects of platelet rich plasma on intestinal wound healing in pigs.* **Fresno, L., et al.** 2010, The Veterinary Journal, p. 322-327.
95. **Anitua, E., Cugat, R. e Sanchez, M.** *Platelet rich plasma in orthopaedics and sport medicine.* s.l. : Springer, 2018.
96. *The effects of human platelet lysate on dental pulp stem cells derived from impacted human third molars.* **Chen, B., et al.** 20, 2012, Biomaterials , Vol. 33, p. 5023-5035.
97. *Curative effect of autologous prp on a large cutaneous lesion in a dog.* **Kim, J.H., Park, C. e Park, H.M.** 2009, Veterinary Dermatology, p. 123-126.
98. *Autologous conditioned plasma as therapy of tendon and ligament lesions in seven horses.* **Rindermann, G., et al.** 2010, Journal of veterinary Sciences, p. 173-175.
99. *Platelet rich plasma for regenerative medicine treatment of bovine ovarian hypofunction.* **Cremonesi, F., et al.** 2020, Frontiers in veterinary medicine, Vol. 7.
100. *First data on in vitro fertilization and blastocyst formation after intraovarian injection of calcium gluconate activated autologous platelet rich plasma.* **Sills, E.S., Rickers, N.S. e Palermo, G.D.** 2018, Gynecological endocrinology , p. 756-760.
101. *Diagnosi di mastite ad hoc con le cellule differenziali.* **Zanini, L.** 2018, L'informatore agrario, p. 2-4.
102. **Poli, G., et al.** *Microbiologia e immunologia veterinaria.* Milano : Edra, 2017. ISBN 9788821442278.

103. *Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds.* **Seegers, H., Fourichon, C. e Beaudreau, F.** 2003, Veterinary research, p. 475-491.
104. *production disease reduce the efficiency of dairy production: a review of the results, methods, and approaches regarding the economics of mastitis.* **Hogeveen, H., Steeneveld, W. e Wolf, CA.** 2019, Annu rev resour economics, p. 289-312.
105. *The economic impact of mastitis-control procedures used in Scottish dairy herds with high bulk-tank somatic cell count .* **Yalcin, C., et al.** 1999, Preventive Veterinary Medicine.
106. *Partial budget of the discounted annual benefits of mastitis control strategies.* **lore, H.G., Erb, F. e al, et.** 1998, Journal of Dairy Science, p. 2280-2292.
107. *Biofilm formation by Streptococcus agalactiae: influence of environmental conditions and implicated virulence factors.* **Rosini, R. e Margarit, I.** 2015, Frontiers in cellular and infection micorbiology, p. 1-4.

*NOTA

Le immagini utilizzate nel capitolo “Materiali e Metodi” sono foto personali.

RINGRAZIAMENTI

Al termine di questo lavoro di tesi, vorrei ringraziare la mia relatrice, la Professoressa Maria Cristina Ossiprandi, per avermi accompagnata durante il percorso universitario, per l'incoraggiamento e il costante supporto dimostrati durante la preparazione di questo lavoro.

Un sincero ringraziamento anche al Professor Stefano Grolli per avermi supportata durante questi mesi di lavoro; e alla Dottoressa Valentina Andreoli per la pazienza infinita e gli indispensabili consigli dispensati durante la realizzazione della tesi.