



UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICO VETERINARIE

CORSO DI LAUREA IN PRODUZIONI ANIMALI INNOVATIVE E

SOSTENIBILI

Valutazioni preliminari sul potenziale profilattico dei concentrati piastrinici autologhi nella gestione selettiva dell'asciutta (SDCT) nella bovina da latte.

RELATORE:

Chiar.ma Prof.ssa Maria Cristina Ossiprandi

CORRELATORI:

Chiar.mo Prof. Stefano Grolli

Chiar.ma Dott.ssa Valentina Andreoli

LAUREANDA:

Irene Chiletti

ANNO ACCADEMICO 2025 – 2026

Sommario

RIASSUNTO	4
1. UTILIZZO DEGLI ANTIBIOTICI NEGLI ALLEVAMENTI DI BOVINE DA LATTE E ANTIBIOTICO-RESISTENZA	5
1.1 L'antibiotico-resistenza in zootecnia e il paradigma "One Health"	5
1.2 Impatto epidemiologico e sanitario della terapia dell'asciutta sulla selezione di ceppi resistenti	5
1.3 Quadro normativo europeo: il Regolamento (UE) 2019/6 e l'obbligo di antimicrobial stewardship	6
1.4 Strumenti di monitoraggio dei consumi in Italia: la piattaforma Classyfarm	7
1.5 Impatto economico dell'utilizzo estensivo degli antimicrobici e delle perdite associate alle mastiti	8
2. FISIOLOGIA DELL'ASCIUTTA NELLA BOVINA DA LATTE E TRANSIZIONE GESTIONALE	9
2.1 Fasi fisiologiche e biochimiche del periodo di asciutta (Involuzione rigenerativa)	9
2.1.1 Involuzione attiva: dinamiche di meccano-trasduzione, alterazione delle giunzioni serrate ed efferocitosi leucocitaria	9
2.1.2 Il crosstalk epitelio-stromale paracrino guidato dalla lattoferrina bovina (bLF)	11
2.1.3 Lo stato di quiescenza stabile: barriere fisiche (tappo di cheratina) e microambiente biochimico	12
2.1.4 Colostro-genesi e lattogenesi pre-parto: transitosi attiva delle immunoglobuline materne (IgG1)	13
2.2 Dalla Blanket Dry Cow Therapy (BDCT) alla Selective Dry Cow Therapy (SDCT)	13
2.2.1 Razionale biologico ed efficacia della terapia a tappeto	13
2.2.2 Implementazione clinica dell'asciutta selettiva e gestione delle bovine ad alto e basso rischio	14
2.2.3 Fattori di rischio gestionali al dry-off: livello produttivo, restrizione alimentare ed esposizione allo stress termico	15
2.3 Strategie biologiche e tecnologiche alternative all'impiego di antimicrobici	15
2.3.1 Sigillanti interni del capezzolo (ITS)	15
2.3.2 Approcci di avanguardia: nanotecnologie, batteriocine, terapia fagica, probiotici e immunomodulatori	16
3. BIOTECNOLOGIE APPLICATE NELLA MEDICINA RIGENERATIVA VETERINARIA: GLI EMOCOMPONENTI AUTOLOGHI	17

3.1 Definizione e caratteristiche biologiche del Plasma Ricco in Piastrine (PRP) e del Lisato Piastrinico (LP).....	17
3.2 Mediatori polipeptidici e fattori di crescita piastrinici (PDGF, TGF- β , VEGF, IGF-1, EGF, HGF)	17
3.3 Meccanismo d'azione del PRP nella ghiandola mammaria: ripristino della barriera emato-mammaria.....	18
3.4 La polarizzazione macrofagica (switch fenotipico M1 -> M2) mediata dai derivati piastrinici.	19
4. PARTE SPERIMENTALE	21
4.1 Scopo del lavoro e ipotesi sperimentale.....	21
4.2 Materiali e Metodi.....	22
4.2.1 Caratteristiche dell'allevamento, management zootecnico e nutrizionale della mandria	22
4.2.2 Criteri di selezione, arruolamento e stabulazione delle bovine destinate alla sperimentazione.....	22
4.2.3 Protocollo aziendale di asciutta selettiva: soglie della conta cellule somatiche (SCC) ...	23
4.2.4 Disegno sperimentale: arruolamento casuale delle bovine e suddivisione nei gruppi di trattamento.....	24
4.2.5 Protocollo biotecnologico di doppia centrifugazione per la preparazione del Platelet Rich Plasma (PRP) autologo	24
4.2.6 Metodica di scongelamento e protocollo igienico di somministrazione intramammaria del PRP	26
4.2.7 Modalità delle analisi statistiche.....	26
4.3 Risultati	27
4.3.1 Analisi del Somatic Cell Score.....	28
4.3.2 Valutazione delle mastiti postpartum.....	30
4.3.3 Analisi microbiologiche.....	32
4.4 Discussione	32
4.5 Limiti dello studio e prospettive future	37
4.6 Conclusioni	38
BIBLIOGRAFIA.....	40
SITOGRAFIA	48

RIASSUNTO

Il fenomeno della resistenza antimicrobica (AMR) rappresenta una criticità globale per la sanità pubblica e la sostenibilità delle produzioni animali. Nel settore lattiero-caseario, il Regolamento (UE) 2019/6 impone la transizione dalla terapia sistematica dell'asciutta (BDCT) alla terapia selettiva (SDCT), vincolando l'uso di antimicrobici a evidenze diagnostiche oggettive. In questo scenario, la ricerca di strategie immunomodulatrici alternative risulta essenziale per supportare i processi di involuzione rigenerativa e riparazione del parenchima mammario.

Il presente studio ha valutato l'efficacia del Plasma Ricco in Piastrine (PRP) autologo, somministrato per via intramammaria al momento della messa in asciutta (*dry-off*), come protocollo profilattico in sostituzione degli antimicrobici convenzionali. La sperimentazione è stata condotta su una coorte di 91 bovine, suddivise casualmente in due gruppi sperimentali: il gruppo di controllo (n=46), trattato con cefalonio diidrato e sigillante interno (ITS), e il gruppo sperimentale (n=45), trattato con una singola infusione di PRP (10 ml per quarto alla concentrazione di 1×10^9 piastrine/ml) associato a ITS.

L'andamento della salute mammaria è stato monitorato longitudinalmente attraverso il Somatic Cell Score (SCS) a -7 giorni dal momento dell'asciutta, +7, +40, +80 e +130 giorni dal parto, unitamente alla registrazione dell'incidenza di mastiti cliniche postpartum. I risultati indicano una non inferiorità clinica del PRP rispetto alla terapia antibiotica.

L'incidenza delle mastiti cliniche è risultata del 33,3% nel gruppo PRP rispetto al 43,5% nel gruppo AB, senza differenze statisticamente significative ($p = 0,391$).

In conclusione, l'impiego del PRP autologo si configura come una valida alternativa biologica nella gestione della SDCT, favorendo l'*antimicrobial stewardship*, riducendo la pressione selettiva per l'AMR e migliorando gli indici di biosicurezza aziendale (Classyfarm). L'assenza di residui farmacologici postpartum garantisce inoltre la commercializzazione immediata del secreto latteo, ovviando alle perdite economiche derivanti dai tempi di sospensione.

1. UTILIZZO DEGLI ANTIBIOTICI NEGLI ALLEVAMENTI DI BOVINE DA LATTE E ANTIBIOTICO-RESISTENZA

1.1 L'antibiotico-resistenza in zootecnia e il paradigma "One Health"

La riduzione dell'impiego di molecole antimicrobiche, sia in medicina veterinaria sia in medicina umana, costituisce una priorità strategica fondamentale per contrastare la resistenza antimicrobica (AMR), oggi riconosciuta come una delle principali minacce per la salute globale. L'antibiotico-resistenza consiste nella capacità di batteri patogeni di resistere e contrastare l'attività degli antimicrobici attualmente disponibili sul mercato, con la conseguenza che patologie che sembravano sconfitte tornano a essere pericolose e talvolta letali (Valsson et al., 2026). L'uso estensivo e, in molti casi, inappropriato di antimicrobici è alla base dell'antibiotico-resistenza. In ambito zootecnico, la pressione selettiva esercitata dai trattamenti sistemici ha favorito nel tempo l'insorgenza di ceppi resistenti tra i patogeni della mammella e il mantenimento e trasferimento orizzontale di geni di resistenza all'interno del microbioma animale. È quindi necessario migliorare l'appropriatezza d'uso degli antimicrobici e individuare strategie alternative per il controllo delle malattie batteriche (Oliver et al., 2011; Nóbrega et al., 2021). L'approccio integrato "One Health", di cui i settori della medicina umana e veterinaria stanno acquisendo sempre maggiore consapevolezza, riconosce la stretta interconnessione tra la salute umana, quella animale e quella ambientale. In quest'ottica, la riduzione dell'uso di antibiotici negli allevamenti può contribuire a ridurre o stabilizzare la prevalenza di batteri resistenti lungo la filiera agroalimentare, riducendo l'insorgenza di infezioni complesse da trattare.

1.2 Impatto epidemiologico e sanitario della terapia dell'asciutta sulla selezione di ceppi resistenti

L'utilizzo estensivo di molecole antimicrobiche negli allevamenti di bovine da latte è strettamente legato alla prevenzione e al trattamento delle infezioni intramammarie (IMI), che rappresentano quantitativamente la principale causa di consumo di antibiotici in zootecnia, costituendo circa il 60–70% del totale degli antimicrobici impiegati negli

allevamenti (Stevens et al., 2016). In questo contesto, la terapia dell'asciutta rappresenta storicamente la seconda determinante di consumo di antimicrobici dopo i trattamenti erogati durante la lattazione per il trattamento delle mastiti (McCubbin et al., 2022). La pratica tradizionale della Blanket Dry Cow Therapy (BDCT), basata sulla somministrazione sistematica e indifferenziata di antibiotici intramammary a tutti i quarti di tutte le bovine alla messa in asciutta, ha esercitato per decenni una massiccia pressione selettiva. Tale esposizione ha favorito l'emergenza di geni di resistenza (AMR) sia nei patogeni mammari che nella flora commensale residente. Ad esempio, l'impiego di cefalosporine per via intramammary al dry-off è stato direttamente associato a una ridotta suscettibilità dei coliformi fecali a cefalotina e streptomina (Mollenkopf et al., 2010). Inoltre, è stato documentato che i vitelli nati da bovine sottoposte a BDCT presentano nelle feci cariche significativamente superiori di *Escherichia coli* produttori di beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL) rispetto ai vitelli nati da madri gestite con protocolli selettivi (Tetens et al., 2019; McCubbin et al., 2022), evidenziando l'impatto ambientale e sistemico della pressione selettiva applicata alla mammella.

1.3 Quadro normativo europeo: il Regolamento (UE) 2019/6 e l'obbligo di antimicrobial stewardship

Di fronte a questo scenario, le istituzioni internazionali hanno promosso l'adozione di protocolli di *antimicrobial stewardship* volti a razionalizzare l'uso degli antimicrobici, massimizzandone l'efficacia terapeutica e minimizzando lo sviluppo dell'AMR. Il cardine di questa transizione è rappresentato dal Regolamento (UE) 2019/6 del Parlamento europeo e del Consiglio, entrato pienamente in vigore a gennaio 2022, che vieta l'uso profilattico sistematico degli antibiotici in zootecnia, imponendo l'adozione della terapia selettiva dell'asciutta (*selective dry cow therapy*, SDCT). Con il termine di "antimicrobial stewardship" (gestione prudente e consapevole degli antimicrobici) si definisce l'insieme delle strategie cliniche, gestionali e normative adottate per razionalizzare l'uso degli agenti antimicrobici, massimizzandone l'efficacia clinica e minimizzando lo sviluppo e la diffusione dell'AMR. In ambito buiatico, la transizione obbligata dalla BDCT alla SDCT rappresenta l'applicazione pratica più rilevante di tale principio. Qualsiasi trattamento

profilattico di massa deve essere interrotto, e l'uso di antimicrobici deve essere giustificato esclusivamente da parametri diagnostici oggettivi che evidenzino una reale infezione in atto (McCubbin et al., 2022). L'applicazione di algoritmi decisionali basati sullo stato immunitario del singolo animale o del quarto consente di indirizzare il trattamento antibiotico esclusivamente ai soggetti infetti, riducendo l'uso complessivo di antimicrobici al dry-off del 60% circa (Kabera et al., 2021). L'efficacia epidemiologica di questo approccio è dimostrata dal modello olandese: l'introduzione di un divieto nazionale della profilassi sistematica nel 2013 ha determinato, tra il 2013 e il 2017, una contrazione del 36% del consumo di antibiotici per l'asciutta e una riduzione del 15% del consumo intramammario complessivo, senza evidenziare ripercussioni negative significative sullo stato sanitario generale della mandria (Santman-Berends et al., 2021).

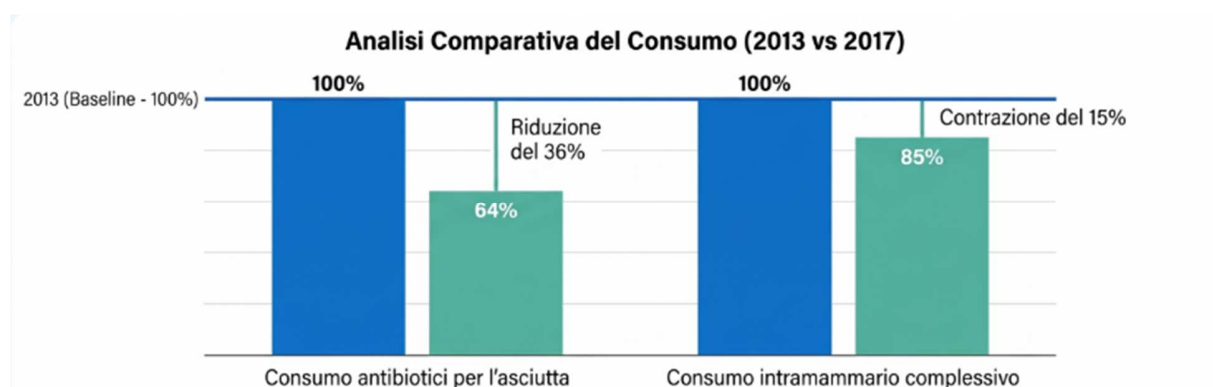


Figura 1. Riduzione dell'utilizzo di antimicrobici registrato dal 2013 al 2017 con l'adozione della SDCT in Olanda (adattato da Santman-Berends et al., 2021).

1.4 Strumenti di monitoraggio dei consumi in Italia: la piattaforma Classyfarm

In Italia, il Ministero della Salute, per ridurre l'impatto del settore agroalimentare sui fenomeni di antibiotico-resistenza, ha sviluppato un sofisticato sistema informatizzato di rilevazione e tracciamento dei consumi di farmaci veterinari (ricetta elettronica). I dati confluiscono all'interno della piattaforma informatica denominata Classyfarm (<https://www.classyfarm.it>), la quale consente di categorizzare gli allevamenti in funzione del rischio di sviluppare AMR in base ai consumi di antibiotici calcolati in DDDA (Defined Daily Dose Animal). Il sistema monitora con estrema attenzione l'uso degli antimicrobici di importanza critica per l'uomo (Critically Important Antimicrobials, CIA), come le

cefalosporine di 3^a e 4^a generazione, raccomandandone il drastico contenimento in ambito veterinario al fine di preservarne l'efficacia nel trattamento delle infezioni umane severe e invasive.

1.5 Impatto economico dell'utilizzo estensivo degli antimicrobici e delle perdite associate alle mastiti

La terapia dell'asciutta ha storicamente rappresentato una delle principali determinanti del consumo e della spesa per gli antimicrobici nel settore lattiero-caseario. L'impatto economico di tale gestione deve essere valutato nel contesto delle perdite globali causate dalle mastiti bovine, stimate in circa 35 miliardi di dollari all'anno a livello mondiale (Sathiyabarathi et al., 2016). Oltre ai costi diretti dei farmaci e della manodopera legati alla BDCT (Scherpenzeel et al., 2016b), l'uso estensivo di antibiotici genera costi indiretti legati alla perdita di efficacia terapeutica e alla salute pubblica: l'Unione Europea perde circa 1,5 miliardi di euro all'anno a causa dell'emergere di ceppi resistenti (McCubbin et al., 2022). L'adozione della SDCT consente una riduzione dell'utilizzo di antibiotici intramammary tra il 55% e il 65%, traducendosi in un risparmio immediato sull'acquisto dei farmaci (Rajala-Schultz et al., 2021). Inoltre, l'auspicabile eliminazione di molecole a lunga azione ridurrebbe il rischio di milk leakage postpartum e di contaminazione delle produzioni. Ad esempio, il cefalonium diidrato, uno dei farmaci maggiormente utilizzato nella SDCT è stato rilevato nel colostro e nel latte fino a 96 ore postpartum in bovine con parti regolari, imponendo lo smaltimento forzato della produzione con pesanti perdite finanziarie per l'allevatore (Bradley et al., 2010).

2. FISIOLOGIA DELL'ASCIUTTA NELLA BOVINA DA LATTE E TRANSIZIONE GESTIONALE

2.1 Fasi fisiologiche e biochimiche del periodo di asciutta (Involuzione rigenerativa)

Il periodo di asciutta (dry-off) rappresenta una fase di transizione critica e biochimicamente attiva nel ciclo produttivo della bovina ad alta produzione, configurandosi come un processo di involuzione rigenerativa (Cattaneo et al., 2023). Questa fase non costituisce una semplice sospensione della lattazione, ma un intervallo programmato in cui la ghiandola mammaria subisce un profondo rimodellamento cellulare, strutturale e metabolico per prepararsi alla lattazione successiva. L'obiettivo biologico consiste nel consentire il ripristino dell'omeostasi sistemica, la clearance delle infezioni intramammarie (IMI) subcliniche contratte durante la lattazione precedente e il turnover delle cellule epiteliali mammarie (MEC). Dal punto di vista istologico, la sostituzione delle MEC senescenti con una popolazione cellulare nuova e funzionalmente attiva richiede un intervallo temporale minimo di 25 giorni, rendendo necessaria una durata complessiva dell'asciutta di almeno 40 giorni (ottimizzata tra i 50 e i 70 giorni nelle pluripare, e incrementata a circa 65 giorni nelle primipare per assecondare l'accrescimento somatico ancora in corso) (Lacasse, 2025; Zobel et al., 2015; Capuco et al., 1997). Il processo si articola negli stadi sequenziali di involuzione attiva, stato di quiescenza stabile (o steady state) e colostrogenes/lattogenesi (Zhao et al., 2019).

2.1.1 Involuzione attiva: dinamiche di meccanotrasduzione, alterazione delle giunzioni serrate ed efferocitosi leucocitaria

Questo stadio ha inizio immediatamente dopo la cessazione della mungitura e si protrae per circa due settimane (Zobel et al., 2015). L'interruzione dell'estrazione del secreto provoca l'accumulo di latte endogeno che genera l'ingorgo dei dotti cisternali e degli alveoli, traducendosi in un repentino incremento della pressione idrostatica intramammaria. Questo stimolo meccanico avvia una cascata di meccanotrasduzione accoppiata a un feedback inibitorio locale regolato da fattori autocrini, tra cui la β -caseina (β -CN) e la serotonina (5-HT), che arrestano la galattogenesi (Zobel et al., 2015). A livello genomico si osserva un'immediata riduzione trascrizionale dei geni deputati alla sintesi dei costituenti

del latte, come i trasportatori del glucosio GLUT1 e GLUT8, e i geni codificanti per le proteine zootecniche maggiori (β -caseina, κ -caseina e α -lattoalbumina). Parallelamente, l'aumento della pressione idrostatica compromette l'integrità delle giunzioni serrate (tight junctions) dell'epitelio mammario, aumentando la permeabilità paracellulare. Questo fenomeno genera un passaggio bidirezionale di componenti: il lattosio diffonde verso il compartimento vascolare sistemico; le proteine immunitarie e di origine ematica (albumina, immunoglobuline, lattoferrina) penetrano nel lume alveolare, mentre il calcio luminale passa nel sangue, determinando un incremento transitorio della calcemia sistemica (Zobel et al., 2015). La regressione del tessuto epiteliale senescente è governata dal disaccoppiamento dell'asse somatotropo sistemico, con un drastico calo di GH e del fattore di crescita IGF-1, che rappresenta il principale segnale di sopravvivenza per le MEC. A livello cellulare, la scomparsa di questi stimoli induce le MEC a intraprendere due percorsi coordinati di morte cellulare programmata:

- **L'apoptosi (morte di tipo I):** permette la rimozione ordinata delle cellule secernenti ormai senescenti. Questo meccanismo preserva l'integrità della membrana cellulare, evitando la lisi e la fuoriuscita del contenuto intracellulare nello spazio circostante, scongiurando reazioni infiammatorie deleterie per il parenchima sano (Zobel et al., 2015).
- **L'autofagia (morte di tipo II):** le cellule epiteliali, sottoposte allo stress da ingorgo luminale, digeriscono i propri organelli danneggiati per sopravvivere; se lo stress persiste, l'autofagia accompagna la cellula verso l'autolisi.

La rimozione delle cellule apoptotiche e dei residui lipidici segue una precisa cinetica cellulare: nelle prime 24-48 ore le MEC vitali agiscono come fagociti non professionali. Successivamente, la barriera epiteliale viene attraversata da una massiva infiltrazione di neutrofili polimorfonucleati (PMN), seguiti da macrofagi e linfociti (Cattaneo et al., 2023). Al venir meno della mungitura, le stesse cellule epiteliali secernono enzimi proteolitici (le metalloproteinasi MMP-2 e MMP-9) deputati alla degradazione della membrana basale (Parés et al., 2021), causando il collasso degli alveoli. Il rimodellamento della matrice

extracellulare e l'apertura delle giunzioni cellulari facilitano la diapedesi e la migrazione dei leucociti dal torrente circolatorio direttamente all'interno del lume alveolare (Zhao et al., 2019). Sebbene i PMN inizino la clearance fagocitando micelle caseiniche, globuli di grasso e detriti cellulari, la saturazione della loro capacità fagocitaria innalza temporaneamente la vulnerabilità della mammella alle infezioni. Col progredire dell'involutione, i macrofagi sostituiscono i PMN diventando la popolazione predominante; il loro compito essenziale è l'efferocitosi (rimozione dei PMN apoptotici), che previene il rilascio di enzimi litici dannosi e induce la polarizzazione macrofagica verso il fenotipo riparativo M2 (Gao et al., 2025; Capuco et al., 2020).

2.1.2 Il crosstalk epitelio-stromale paracrino guidato dalla lattoferrina bovina (bLF)

Durante l'involutione attiva si instaura un fine sistema di comunicazione paracrina tra il compartimento epiteliale e il compartimento connettivale della ghiandola. Il coordinatore locale di questo crosstalk è la lattoferrina bovina (bLF), una glicoproteina a forte azione sequestratrice di ferro escretta dalle MEC e dai neutrofili durante questa transizione (Superchi et al., 2014; Riley et al., 2008; Trajkovska et al., 2013). La lattoferrina svolge un ruolo dicotomo ed estremamente specializzato, inviando segnali opposti a seconda del target cellulare:

- **Sui fibroblasti stromali (bMSF):** la lattoferrina agisce come un potente stimolo mitogenico, ordinando a queste cellule connettivali di moltiplicarsi attivamente. Ciò si traduce in un progressivo incremento del tessuto stromale di sostegno, che si espande per occupare lo spazio lasciato libero dal collasso degli alveoli epiteliali, preservando la compattezza anatomica della mammella (Superchi et al., 2014).
- **Sulle cellule epiteliali (MEC):** al contrario, la lattoferrina agisce come un freno omeostatico, arrestandone la proliferazione e favorendo il turnover e la transizione verso lo stato di riposo (Riley et al., 2008).

Questo bilancio cellulare assicura la conservazione dell'architettura della ghiandola. Nelle prime fasi, l'eliminazione dei corpi apoptotici è operata dalle MEC vitali tramite efferocitosi aspecifica (Atabai et al., 2007). Successivamente, l'infiltrazione massiva dei fagociti

professionali stimola il rilascio di citochine pro-infiammatorie (IL-1, TNF- α , IL-6), inducendo le MEC ad amplificare il reclutamento dei PMN tramite la secrezione di chemochine CXCL1 e CXCL8 (Wellnitz & Bruckmaier, 2012).

2.1.3 Lo stato di quiescenza stabile: barriere fisiche (tappo di cheratina) e microambiente biochimico

Lo stato di quiescenza stabile rappresenta il periodo intermedio in cui la ghiandola mammaria cessa la propria attività secretoria ed entra in una fase di riposo funzionale (Zhao et al., 2019). Dal punto di vista istologico si rileva una netta modificazione spaziale, con una marcata riduzione dell'area luminale alveolare e la concomitante espansione dello stroma. La maggior parte delle MEC assume uno stato quiescente e non secretorio, ma l'attività mitotica non si azzerà: la proliferazione cellulare prosegue a bassi livelli per garantire il rimpiazzo cellulare pre-parto. In assenza del lavaggio meccanico fornito dal flusso latteo, l'epitelio squamoso del dotto papillare intensifica l'attività di cheratinizzazione, formando il tappo cheratinico che occlude fisicamente il canale e funge da barriera primaria (Verdier-Metz et al., 2022).

La protezione della ghiandola dalle infezioni ascendenti si affida principalmente a due pilastri:

- **Il tappo di cheratina:** lo sfintere del capezzolo viene idealmente sigillato da un tappo naturale di cheratina. Nelle bovine ad alta produzione (>15-20 kg/die), l'eccessiva pressione intramammaria accumulata può ritardare o impedire la formazione di questa barriera, provocando perdite di colostro o latte (milk leakage), che costituiscono una via d'accesso preferenziale per i patogeni ambientali (Vilar & Rajala-Schultz, 2020; De Prado-Taranilla et al., 2020).
- **Il microambiente biochimico:** il secreto mammario residuo accumulato nei dotti presenta un pH alterato ed elevate concentrazioni di lattoferrina (che sequestra il ferro libero), lisozima, complemento e immunoglobuline (IgG), creando un ambiente altamente ostile allo sviluppo batterico (Bushe & Oliver, 1987; Bradley & Green, 2004; Sordillo et al., 1997).

2.1.4 Colostrogenesi e lattogenesi pre-parto: transitosi attiva delle immunoglobuline materne (IgG1)

Le ultime settimane di gestazione segnano la riattivazione del tessuto mammario attraverso i processi di colostrogenesi e lattogenesi (Zhao et al., 2019). Le MEC riprendono attivamente la loro differenziazione morfologica sotto l'influenza coordinata di cortisolo, prolattina ed estrogeni (Lacasse, 2025). Il cortisolo induce l'ipertrofia del reticolo endoplasmatico rugoso e dell'apparato di Golgi, ripristinando il macchinario biosintetico intracellulare delle MEC. Un evento cellulare critico in questa fase è la sigillatura delle giunzioni occludenti, che ristabilisce l'integrità strutturale isolando il comparto luminale da quello sistemico.

Il processo secretorio distintivo di questo stadio è la transitosi attiva e selettiva delle immunoglobuline materne dal circolo ematico al secreto pre-alveolare. Questo trasporto vettoriale avviene attraverso il monostrato epiteliale delle MEC ed è mediato dall'espressione di recettori specifici sulla membrana plasmatica basolaterale, in particolare il recettore Fc neonatale (FcRn) e il recettore inibitorio (FcγRIIB). Le molecole di immunoglobulina (prevalentemente IgG1) vengono internalizzate mediante endocitosi, protette dal catabolismo all'interno di endosomi, e infine secrete per esocitosi sulla membrana apicale verso il lume alveolare, determinando l'arricchimento immunitario del colostro (Ahmann et al., 2021; Hurley & Theil, 2011).

2.2 Dalla Blanket Dry Cow Therapy (BDCT) alla Selective Dry Cow Therapy (SDCT)

2.2.1 Razionale biologico ed efficacia della terapia a tappeto

Nel settore bovino la cura delle infezioni mammarie preesistenti al momento dell'asciutta e la prevenzione di eventuali infezioni al parto successivo sono state rese possibili in passato grazie alla Blanket Dry Cow Therapy (BDCT), o terapia antibiotica a tappeto. Questa pratica consisteva nella somministrazione sistematica di preparati antimicrobici per via intramammaria in tutti i quarti di tutte le bovine appartenenti a una mandria, eseguita contestualmente all'ultima mungitura (fase di dry-off), indipendentemente dallo stato sanitario della mammella. L'impiego storico della BDCT, affermatosi a partire dagli anni

Sessanta, si fonda su un duplice razionale clinico e biologico (De Prado-Taranilla et al., 2020; Bradley & Green, 2004):

- **Funzione terapeutica (Clearance delle infezioni esistenti):** il trattamento mira a eradicare le IMI croniche o subcliniche contratte in lattazione. L'interruzione della mungitura impedisce il dilavamento meccanico del farmaco, consentendo al principio attivo di permanere all'interno della cisterna a concentrazioni terapeutiche per un tempo prolungato (fino a diverse settimane), facilitando l'eliminazione dei patogeni profondi.
- **Funzione profilattica (Prevenzione di nuove IMI):** il trattamento fornisce una prolungata copertura farmacologica per prevenire nuove infezioni in un momento di massima suscettibilità della mammella, caratterizzato da forte pressione idrostatica, ritardo nella cheratinizzazione e temporanea compromissione dei neutrofili.

2.2.2 Implementazione clinica dell'asciutta selettiva e gestione delle bovine ad alto e basso rischio

L'implementazione della Terapia Selettiva dell'Asciutta (SDCT) rappresenta oggi una strategia cardine per la corretta antimicrobial stewardship, applicabile principalmente in allevamenti a basso rischio con una conta di cellule somatiche di massa (BTSCC) stabilmente inferiore a 250.000 cellule/mL (McCubbin et al., 2022). L'eleggibilità del singolo animale viene stabilita sulla base dell'analisi dei dati individuali di SCC degli ultimi tre controlli funzionali e dell'anamnesi clinica. Se la bovina presenta un valore di SCC superiore a 200.000 cellule/mL in almeno uno di tali controlli o ha manifestato episodi di mastite clinica nell'ultima lattazione, viene classificata ad alto rischio e candidata al trattamento antibiotico intramammario combinato con l'infusione di un sigillante interno del capezzolo (ITS). Al contrario, i soggetti sani che mantengono valori di SCC costantemente inferiori alla soglia critica devono essere protetti esclusivamente mediante l'infusione dell'ITS, che funge da barriera fisica inerte in sostituzione della profilassi farmacologica (McCubbin et al., 2022; Kabera et al., 2021).

2.2.3 Fattori di rischio gestionali al dry-off: livello produttivo, restrizione alimentare ed esposizione allo stress termico

Il livello produttivo al dry-off rappresenta un fattore di rischio critico per le nuove IMI (Cattaneo et al., 2023). Produzioni superiori a 20-21 kg/die generano una forte pressione idrostatica endo-alveolare che tende a dilatare meccanicamente lo sfintere papillare, ritardando il tappo di cheratina e provocando milk leakage, ossia fuoriuscita spontanea di latte (Vilar & Rajala-Schultz, 2020; De Prado-Taranilla et al., 2020). La letteratura suggerisce di ridurre la produzione a un target di circa 15 kg/die o inferiore tramite una cessazione graduale della mungitura associata a una restrizione alimentare quantitativa e qualitativa, incrementando la fibra neutro-detergente (NDF) e riducendo l'apporto energetico (Cattaneo et al., 2023). Sotto il profilo metabolico, la nutrizione deve bilanciare la discesa produttiva con l'accrescimento fetale. Inoltre, lo stress termico (Heat Stress) durante il periodo di asciutta altera profondamente l'architettura istologica mammaria, inibendo la normale proliferazione cellulare pre-parto a favore di un incremento del tessuto connettivo stromale, traducendosi in perdite produttive tra il 10% e il 25% nella lattazione successiva (Fabris et al., 2019; Tao & Dahl, 2013). Lo stress termico induce anche stress ossidativo e, tramite l'iperattivazione dell'asse HPA, provoca una disregolazione immunitaria, rendendo la bovina intrinsecamente vulnerabile nel postpartum (Dahl et al., 2017).

2.3 Strategie biologiche e tecnologiche alternative all'impiego di antimicrobici

2.3.1 Sigillanti interni del capezzolo (ITS)

La principale strategia non antibiotica applicata al dry-off per prevenire le nuove IMI si basa sull'uso di sigillanti interni del capezzolo (ITS) (Dufour et al., 2019). Questi dispositivi inerti sono costituiti da una pasta densa a base di bismuto sottonitrato (65%) in un veicolo paraffinico. Infusi nel canale del capezzolo al momento dell'ultima mungitura, si depositano nel dotto e nella cisterna del capezzolo mimando la barriera meccanica del tappo di cheratina. Gli ITS non esercitano alcuna attività farmacologica o pressione selettiva sui patogeni, ma impediscono fisicamente la colonizzazione ascendente dei batteri ambientali

durante l'intero periodo di asciutta, mostrando una riduzione drastica delle infezioni postpartum (Pearce et al., 2023).

2.3.2 Approcci di avanguardia: nanotecnologie, batteriocine, terapia fagica, probiotici e immunomodulatori

Terapia fagica ed endolisine: L'utilizzo di batteriofagi e dei relativi enzimi litici (endolisine) rappresenta una strategia altamente specifica contro i patogeni mammari, inclusi i fenotipi antibiotico-resistenti. Sfruttando la degradazione mirata del peptidoglicano batterico, questi agenti inducono la lisi osmotica selettiva della cellula bersaglio, senza perturbare l'omeostasi del microbiota residente nella ghiandola mammaria (Angelopoulou et al., 2019).

Probiotici: La somministrazione di batteri lattici (quali *Lactobacillus* spp. e *Lactococcus* spp.) per via orale o intramammaria promuove il ripristino dell'omeostasi del microbiota locale. Oltre a esplicare un'importante azione immunomodulante, questi ceppi probiotici agiscono per esclusione competitiva, inibendo fisicamente l'adesione e la successiva internalizzazione dei batteri patogeni all'interno delle cellule epiteliali mammarie (El-Sayed e Kamel, 2021).

Nanotecnologie e Batteriocine: L'impiego di nanoparticelle metalliche (es. argento, zinco) o polimeriche (chitosano) inibisce la proliferazione batterica alterando la membrana plasmatica (El-Sayed e Kamel, 2021). Tra le batteriocine, spicca la lacticin 3147, peptide antimicrobico prodotto da *Lactococcus lactis* DPC3147, incorporata nei sigillanti a base di bismuto; legandosi al lipide II della parete cellulare dei Gram-positivi, inibisce la sintesi del peptidoglicano e crea pori stabili inducendo la lisi batterica (El-Sayed e Kamel, 2021).

Nel campo della medicina rigenerativa, l'uso di cellule staminali mesenchimali (MSC) rappresenta un'opzione d'avanguardia per favorire la riparazione del tessuto ghiandolare danneggiato da infezioni croniche (Lange-Consiglio et al., 2019). Infine, l'uso dei derivati emocomponenti autologhi (PRP e Lisato Piastrinico) rappresenta la frontiera più promettente come terapia immunomodulatrice e preventiva al dry-off (Lange-Consiglio et al., 2014b).

3. BIOTECNOLOGIE APPLICATE NELLA MEDICINA RIGENERATIVA VETERINARIA: GLI EMOCOMPONENTI AUTOLOGHI

3.1 Definizione e caratteristiche biologiche del Plasma Ricco in Piastrine (PRP) e del Lisato Piastrinico (LP)

Nell'ambito della medicina rigenerativa applicata alla sanità mammaria, il Plasma Ricco in Piastrine (PRP) e il suo derivato acellulare, il Lisato Piastrinico (LP), rappresentano promettenti alternative biologiche agli antimicrobici tradizionali. Trattandosi di preparati ematici autologhi a elevata concentrazione di trombociti ottenuti tramite centrifugazione differenziale, essi agiscono come bioregolatori del parenchima mammario (López et al., 2024). Le piastrine (trombociti), frammenti cellulari anucleati derivanti dalla frammentazione dei megacariociti midollari, contengono α -granuli ricchi di fattori di crescita polipeptidici, citochine e molecole bioattive. In seguito ad attivazione o degranulazione, queste molecole vengono rilasciate nel microambiente leso, esercitando un'azione modulatrice nelle flogosi croniche o recidivanti quali le mastiti bovine (Lange-Consiglio et al., 2014b; López et al., 2024).

3.2 Mediatori polipeptidici e fattori di crescita piastrinici (PDGF, TGF- β , VEGF, IGF-1, EGF, HGF)

L'efficacia terapeutica e profilattica del PRP/LP deriva dall'azione sinergica e coordinata di diverse classi molecolari rilasciate dagli α -granuli piastrinici (López et al., 2024):

- **Platelet-Derived Growth Factor (PDGF):** promuove il reclutamento e la proliferazione di fibroblasti e cellule immunitarie, stimola la differenziazione delle cellule staminali e manifesta un'attività batteriostatica intrinseca.
- **Transforming Growth Factor- β (TGF- β):** regola la sintesi del collagene e della matrice extracellulare, modulando i processi infiammatori eccessivi, l'apoptosi e la differenziazione cellulare.
- **Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF):** mediatore chiave dell'angiogenesi, essenziale per il ripristino della vascolarizzazione e dell'apporto nutrizionale nel parenchima danneggiato.

- **Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1):** supporta la sopravvivenza cellulare, la sintesi proteica e il mantenimento dell'attività secretoria delle cellule epiteliali mammarie (MEC).
- **Epidermal Growth Factor (EGF) e Hepatocyte Growth Factor (HGF):** il primo accelera la riepitelizzazione dell'epitelio alveolare e duttale; il secondo esplica un'importante attività antinfiammatoria e antifibrotica.

Oltre ai fattori di crescita, le piastrine secernono peptidi microbici diretti (es. trombocidine, defensine), capaci di inibire la replicazione di patogeni Gram-positivi e Gram-negativi (tra cui *Staphylococcus aureus* ed *Escherichia coli*) (Daneshi et al., 2023; Huang et al., 2014). La presenza di matrice fibrinica, fibronectina e vitronectina fornisce inoltre uno scaffold tridimensionale che favorisce l'adesione cellulare e il ripristino strutturale del tessuto, mentre citochine e chemochine coordinano il reclutamento selettivo dei leucociti nel sito d'infezione (Brouillette et al., 2003; Jawor et al., 2020).

3.3 Meccanismo d'azione del PRP nella ghiandola mammaria: ripristino della barriera emato-mammaria

Il razionale della somministrazione intramammaria di PRP, vista la complessità dell'azione biologica dei derivati piastrinici, non è finalizzato a ottenere un effetto citotossico diretto sul batterio, bensì all'attivazione di complessi pathway biologici endogeni (Rainard & Foucras, 2018; Zandonai, 2022) che questo preparato è in grado di modulare. I derivati piastrinici sono potenzialmente in grado di promuovere il restauro della barriera emato-mammaria tramite la riparazione delle giunzioni strette (tight junctions) compromesse dai mediatori della flogosi, un meccanismo supportato dalla regolazione genica delle proteine occludenti (Wellnitz & Bruckmaier, 2012; Zhao et al., 2024). Inoltre, potrebbero favorire il ritorno all'omeostasi attraverso la stimolazione dell'efferocitosi (fagocitosi dei neutrofili apoptotici da parte dei macrofagi), normalizzando la composizione biochimica della secrezione mammaria (Rainard & Foucras, 2018; McCubbin et al., 2022).

3.4 La polarizzazione macrofagica (switch fenotipico M1 -> M2) mediata dai derivati piastrinici

Un cardine fondamentale dell'azione terapeutica del PRP è rappresentato dalla polarizzazione macrofagica, ossia la transizione fenotipica dei macrofagi dal fenotipo M1 (pro-infiammatorio) al fenotipo M2 (riparativo/risolutivo) (López et al., 2024; Rainard & Foucras, 2018):

- **Fenotipo M1:** prevale nelle fasi acute dell'infezione. I macrofagi M1 esprimono molecole co-stimolatorie per l'attivazione dei linfociti T, secernono citochine pro-infiammatorie (TNF- α , IL-1 β , IL-6) e si affidano prevalentemente alla glicolisi aerobica (effetto Warburg) per generare rapida energia a sostegno della fagocitosi e della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Sordillo, 2016; Rainard & Foucras, 2018).
- **Switch Fenotipico M1 -> M2:** non avviene in modo passivo, ma risponde a precisi segnali microambientali. L'efferocitosi dei neutrofili apoptotici e l'accumulo di lattato derivante dalla glicolisi M1 fungono da segnali molecolari che attivano i promotori dei geni M2 (Cole et al., 2020).
- **Fenotipo M2:** i macrofagi M2 riprogrammano il proprio metabolismo verso la fosforilazione ossidativa e la β -ossidazione degli acidi grassi. A livello enzimatico, si osserva l'upregulation dell'arginasi-1 (ARG1), che devia il metabolismo dell'L-arginina verso la produzione di ornitina e urea, precursori essenziali per la sintesi delle poliamine e del collagene necessari al rimodellamento della matrice extracellulare (ECM) (Rainard & Foucras, 2018; Zandonai, 2022).

Nelle infezioni croniche, si verifica frequentemente un blocco della polarizzazione macrofagica nello stato M1 (López et al., 2024; Rainard & Foucras, 2018). Patogeni ad alto adattamento endocellulare come *Staphylococcus aureus* possono sopprimere l'apoptosi dei neutrofili o indurre una "falsa risoluzione" infiammatoria, creando un ambiente immunosoppresso che favorisce la persistenza batterica intracellulare e la formazione di biofilm (Rainard & Foucras, 2018; McCubbin et al., 2022).

PARTE SPERIMENTALE

4. PARTE SPERIMENTALE

4.1 Scopo del lavoro e ipotesi sperimentale

L'impiego estensivo e prolungato di molecole antimicrobiche nel settore zootecnico ha esercitato, nel lungo periodo, una marcata pressione selettiva sulle popolazioni batteriche, favorendo l'insorgenza e la diffusione del fenomeno dell'antibiotico-resistenza (AMR) e ponendo una grave minaccia per la salute pubblica globale (European Commission, 2015). In risposta a tale emergenza e in conformità con i quadri normativi europei basati sull'approccio integrato "One Health" (Reg. UE 2019/6), il settore lattiero-caseario ha intrapreso una transizione fondamentale dalla Blanket Dry Cow Therapy (BDCT) alla Selective Dry Cow Therapy (SDCT) (McCubbin et al., 2022). La strategia selettiva vieta l'impiego profilattico degli antibiotici alla messa in asciutta, vincolandone l'uso esclusivamente ai soggetti o ai quarti che presentano un'evidenza diagnostica di infezione intramammaria (IMI), valutata mediante la conta delle cellule somatiche (SCC) o l'anamnesi delle mastiti cliniche (Kabera et al., 2021; McCubbin et al., 2022). Sebbene l'applicazione di un sigillante interno (ITS) costituisca l'attuale gold standard non antibiotico per prevenire le infezioni ascendenti nelle bovine sane (Pearce et al., 2023), la ricerca è rivolta all'individuazione di strategie immunomodulatrici alternative capaci di supportare attivamente i complessi processi di involuzione cellulare e rigenerazione del parenchima (Gao et al., 2025).

In questo scenario si inseriscono le biotecnologie della medicina rigenerativa basate sull'impiego di emoderivati autologhi, tra cui il Plasma Ricco in Piastrine (PRP) (Zandonai, 2022; Delmonte, 2025). Il presente lavoro di tesi si propone di valutare preliminarmente l'efficacia della sostituzione del trattamento antibiotico preventivo al dry-off con un protocollo biologico basato sulla somministrazione di PRP autologo. In particolare, la sperimentazione mirava a determinare e comparare lo stato di salute intramammaria nel postpartum e l'incidenza di nuove infezioni e mastiti cliniche nella fase iniziale della lattazione successiva rispetto a un gruppo di controllo trattato con antibiotico convenzionale (cefalonio diidrato).

4.2 Materiali e Metodi

4.2.1 Caratteristiche dell'allevamento, management zootecnico e nutrizionale della mandria

La sperimentazione è stata condotta presso un'azienda zootecnica commerciale situata nel comune di Modena, la cui produzione è destinata primariamente (96-97%) al circuito del Parmigiano Reggiano DOP e, per la restante quota, alla trasformazione interna in latticini freschi. L'allevamento presenta una consistenza totale di circa 700 capi, equamente ripartiti tra 350 bovine in lattazione e 350 capi destinati alla rimonta, con una produzione media annua di circa 30.000 quintali di latte. Il management nutrizionale prevede la somministrazione di una razione a piatto unico (tecnica Unifeed). La base foraggera, prevalentemente autoprodotta, è costituita da erba medica, fieno di primo taglio e fieno di erbai, integrata con concentrati a base di farina di mais e frumento, fonti proteiche (farina di estrazione di soia o girasole) e nucleo proteico. La mungitura viene effettuata in due sessioni giornaliere all'interno di una sala a spina di pesce con configurazione 13+13. Al fine di ottimizzare il benessere animale, mitigare lo stress sociale e limitare la competizione alimentare, la gestione della mandria in lattazione prevede la suddivisione degli animali in gruppi omogenei basati sull'ordine di parto (un gruppo per le primipare, uno per le secondipare e uno di maggiori dimensioni riservato alle pluripare).

4.2.2 Criteri di selezione, arruolamento e stabulazione delle bovine destinate alla sperimentazione

La popolazione oggetto di studio è composta da bovine di razza Frisona, Bruna Alpina e incroci tra Frisona e Montbéliarde. L'azienda prevede la stabulazione su lettiera permanente per tutti gli animali. La gestione della lettiera avviene con l'aggiunta di paglia e calce idrata a giorni alterni, elemento fondamentale per disinfettare l'ambiente e limitare lo sviluppo di patogeni ambientali. La lettiera viene svuotata completamente tre volte all'anno. Le bovine in asciutta sono stabulate in un box separato, sempre su lettiera permanente. A questi animali è riservata una razione specifica (fieno di primo taglio, fieno di erbai, farina di mais e soia, minerali e vitamine) con completa eliminazione del fieno di medica e drastica

riduzione dei concentrati per arrestare la stimolazione galattopoietica, stimolare l'attività ruminale e agevolare lo sviluppo fetale preparando la bovina al parto.

4.2.3 Protocollo aziendale di asciutta selettiva: soglie della conta cellule somatiche (SCC)

L'azienda ha sviluppato il proprio protocollo di asciutta selettiva in accordo con il veterinario aziendale. Per stabilire l'eleggibilità all'uso esclusivo del sigillante rispetto al trattamento antibiotico associato, vengono considerati tre parametri: 1) la SCC degli ultimi tre controlli funzionali periodici (eseguiti ogni 30-40 giorni); 2) la SCC registrata 10-15 giorni prima della data prevista di asciutta; 3) l'anamnesi clinica per mastite durante l'intera lattazione. Viene applicato un protocollo differenziato per parità:

- **Bovine Primipare:** se le conte cellulari sono costantemente inferiori a 200.000 cellule/mL negli ultimi controlli e non vi sono stati casi di mastite clinica, l'animale riceve esclusivamente il sigillante interno (bismuto nitrato basico, ShutOut®, commercializzato da MSD). Se anche solo uno dei controlli supera le 200.000 cellule/mL o vi è anamnesi positiva per mastite, si applica la terapia antibiotica intramammaria.
- **Bovine Pluripare:** la soglia di tolleranza cellulare è stabilita a 300.000 cellule/mL. Sotto tale limite, in assenza di mastiti pregresse, si infonde solo il sigillante. Al di sopra della soglia o in presenza di mastiti cliniche in lattazione, viene associato l'antibiotico intramammario (cefalonio diidrato, Cepravin Asciutta commercializzato da MSD).

È stata fondamentale la collaborazione con i seguenti laboratori di analisi che hanno fornito i dati all'azienda:

- -Artest - Laboratorio E Servizi - S.R.L. situato a Modena. Il laboratorio si occupa della conta delle cellule somatiche nei controlli funzionali;
- -Salchim S.c.r.l. di Parma, il quale analizza i campioni di latte vaccino nel pre e postpartum, fornendo informazioni sull' SCS, ma anche su acidità, pH e LDG;
- -Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, sede territoriale di Reggio Emilia. Ha fornito informazioni riguardo agli esami batteriologici delle mastiti cliniche insorte nel postpartum.

4.2.4 Disegno sperimentale: arruolamento casuale delle bovine e suddivisione nei gruppi di trattamento

A partire da maggio 2025, le bovine che soddisfacevano i requisiti clinici ed epidemiologici per essere sottoposte al trattamento antibiotico più sigillante (ossia i soggetti classificati ad alto rischio) sono state suddivise in due gruppi sperimentali mediante selezione casuale (randomizzazione online, <https://randraw.it/>). Il 50% degli animali ha costituito il Gruppo Sperimentale PRP, sottoposto alla somministrazione di tubetti intramammary di PRP autologo (10 ml per quarto alla concentrazione di 1×10^9 piastrine/mL) seguito dall'infusione del sigillante interno. Il restante 50% ha costituito il Gruppo Controllo, gestito secondo il protocollo aziendale standard mediante l'infusione di cefalonio diidrato e sigillante interno.

4.2.5 Protocollo biotecnologico di doppia centrifugazione per la preparazione del Platelet Rich Plasma (PRP) autologo

Per la preparazione del PRP sono prelevati dal veterinario aziendale da ciascun animale del gruppo sperimentale 250 mL di sangue venoso periferico intero dalla vena giugulare, previa immobilizzazione. Sono state impiegate sacche sterili contenenti come anticoagulante e stabilizzante CPDA-1 (citrato-fosfato-destrosio-adenina) con ago 18G. Il sangue è stato trasportato al laboratorio di Biochimica e Fisiologia del Dipartimento di Scienze Medico Veterinarie dell'Università di Parma in condizioni di refrigerazione (4-8 °C) entro 3 ore dal prelievo e processato entro 6 ore. La preparazione si è basata su un protocollo di doppia centrifugazione (double spin):

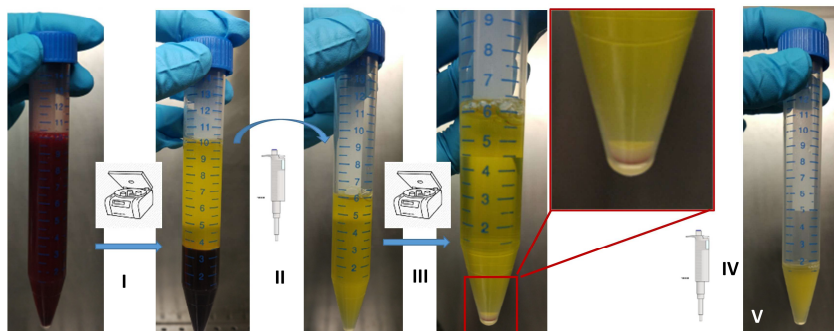


Figura 2. Rappresentazione del processo di produzione del PRP mediante doppia centrifugazione

- **Omogeneizzazione e Prima Centrifugazione (Soft Spin):** il sangue è mantenuto in agitazione a velocità media per 10-15 minuti per evitare sedimentazioni. Successivamente, sotto cappa sterile, viene aliquotato in provette Falcon sterili da 50 mL e centrifugato a 500x g per 18 minuti. Questo passaggio separa la frazione plasmatica superiore (contenente le piastrine, dall'aspetto torbido) dal sedimento cellulare inferiore (eritrociti e leucociti).
- **Raccolta, Conta e Seconda Centrifugazione (Hard Spin):** il plasma contenente piastrine viene raccolto con pipette Pasteur sterili e trasferito in nuove Falcon. Un'aliquota viene diluita 1:20 con cloruro di ammonio 0,17 M e analizzata in camera di Bürker per la conta piastrinica. La frazione rimanente viene centrifugata a 3200x g per 12 minuti. Al termine, il sovrantante (Platelet Poor Plasma, PPP) viene rimosso, e il pellet piastrinico risospeso nel volume di PPP necessario a garantire la concentrazione standardizzata di 1×10^9 piastrine/mL.

Il PRP ottenuto viene suddiviso in 4 aliquote da 10 mL ciascuna in siringhe monouso Luer Lock da 12 mL, opportunamente etichettate. Le siringhe sono refrigerate e consegnate all'azienda entro 3 ore, dove vengono poste a -20 °C fino al momento della somministrazione.

4.2.6 Metodica di scongelamento e protocollo igienico di somministrazione intramammaria del PRP

Al momento dell'utilizzo (coincidente con l'ultima mungitura della bovina), le 4 siringhe destinate al singolo capo vengono scongelate a bagnomaria a 37 °C per un massimo di un'ora prima dell'infusione. Al termine dell'ultima mungitura, l'operatore esegue un'accurata disinfezione degli apici dei capezzoli con alcool al 90%. Viene eseguita un'unica infusione intramammaria per quarto di un volume di 10 mL di PRP (1×10^9 piastrine/mL) mediante inserimento parziale della cannula nel canale del capezzolo per preservare l'integrità del dotto. Dopo l'infusione, la mammella viene massaggiata con movimenti ascendenti per favorire la diffusione omogenea del preparato nel parenchima. I capezzoli vengono disinfettati nuovamente con alcool al 90% prima di procedere con la somministrazione del sigillante interno inerte a base di bismuto, creando la barriera fisica protettiva.

4.2.7 Modalità delle analisi statistiche

Le analisi statistiche sono state eseguite mediante RStudio, utilizzando i pacchetti lme4, emmeans e tidyverse. Le rappresentazioni grafiche sono state realizzate con il pacchetto ggplot2.

L'andamento dell'SCS è stato analizzato mediante un modello lineare misto (LMM), implementato con la funzione lmer del pacchetto lme4, secondo la seguente formula:

$$\text{SCS} \sim \text{trattamento} \times \text{tempo} + \text{classe di parto} + (1|\text{bovina}) + (1|\text{data del controllo})$$

Il modello comprendeva come effetti fissi il trattamento, il tempo di campionamento, la loro interazione e la classe di parto. L'identità della bovina e la data del controllo sono state incluse come effetti casuali, al fine di tenere conto, rispettivamente, delle misurazioni ripetute sullo stesso animale e della variabilità associata alle diverse giornate di campionamento. Le medie marginali stimate (estimated marginal means, EMM) e i confronti tra i gruppi AB e PRP a ciascun tempo sono stati ottenuti mediante il pacchetto emmeans.

L'incidenza della mastite è stata calcolata sulle 91 bovine incluse nell'analisi e confrontata tra i due gruppi mediante il test esatto di Fisher. Limitatamente alle 35 bovine che hanno sviluppato mastite, il giorno di insorgenza dell'evento è stato confrontato tra i trattamenti mediante il test non parametrico di Wilcoxon–Mann–Whitney, scelto in considerazione della ridotta numerosità campionaria e per non richiedere l'assunzione di normalità della distribuzione.

4.3 Risultati

La sperimentazione ha interessato un campione di 91 bovine da latte, corrispondente alla totalità dei soggetti risultati idonei e arruolati secondo i parametri del protocollo di asciutta selettiva (SDCT) aziendale, nel periodo compreso tra maggio 2025 e gennaio 2026. Il campione è stato suddiviso in un gruppo di controllo (46 bovine), sottoposto a terapia antibiotica intramammaria standard (GRUPPO AB) al dry-off con Cepravin, e in un gruppo di trattamento (45 bovine), sottoposto a terapia preventiva tramite singola infusione intramammaria di concentrato piastrinico autologo (GRUPPO PRP).

L'azienda in cui è stata svolta la sperimentazione dispone di un software aziendale in cui vengono raccolti tutti gli eventi che riguardano i capi presenti. Pertanto, è stato possibile risalire per ogni bovina a:

- -conta delle cellule somatiche (SCC) degli ultimi tre controlli funzionali interni all'azienda;
- -SCC e analisi del latte della singola bovina 7 giorni prima del giorno dell'asciutta;
- -SCC a 7- 40 – 80 – 130 giorni di lattazione;
- -eventuale comparsa di mastite nel corso della lattazione (sino a 130 giorni) ed esame batteriologico.

Nell'analisi statistica, l'SCC è stato convertito in SCS ovvero, somatic cell score. L'SCS rappresenta una trasformazione logaritmica della conta delle cellule somatiche, utilizzata per normalizzare la distribuzione dei valori cellulari delle bovine. La trasformazione da SCC a SCS avviene applicando la seguente formula: $SCS = 3 + (\log_2(SCC/100))$.

Dataset	Valore
Osservazioni longitudinali	455
Bovine	91
Trattamenti	AB: 46 bovine; PRP: 45 bovine
Tempi	-7 giorni; +7, +40, +80 e +130 giorni dal parto
Mastiti postpartum	35 casi (AB: 20; PRP: 15)

Tabella 1. Popolazioni dello studio.

Lo studio ha confrontato due strategie diverse applicate al momento dell'asciutta. L'obiettivo era valutare l'andamento della salute mammaria dopo il parto attraverso il SCS (somatic cell score) e la comparsa di mastite clinica durante la lattazione, al fine di esaminare un eventuale ruolo profilattico-terapeutico del PRP e la sua efficacia rispetto alla terapia antibiotica tradizionale.

La struttura dello studio è longitudinale: ogni bovina ha contribuito alla raccolta dei dati mediante misurazioni ripetute nel tempo di alcuni parametri, in particolare di SCS. Le analisi hanno distinto gli esiti ripetuti nel tempo (SCS), dagli esiti definiti una sola volta per bovina, come la presenza o assenza di mastite postpartum.

4.3.1 Analisi del Somatic Cell Score

L'SCS è stato analizzato mediante un modello lineare misto: $SCS \sim \text{trattamento} \times \text{tempo} + \text{classe di parto} + (1|\text{bovina}) + (1|\text{data del controllo})$. Il modello include effetti fissi per trattamento, tempo, loro interazione e classe di parto. Le medie marginali stimate (EMM) e i confronti AB-PRP a ciascun tempo sono stati ottenuti con *emmeans*, con gradi di libertà Kenward-Roger.

L'incidenza è stata calcolata sulle 91 bovine e confrontata con il test esatto di Fisher. Nei 35 animali con mastite, il giorno di insorgenza è stato confrontato tra i due trattamenti con il test di Wilcoxon-Mann-Whitney, coerente con il campione ridotto e senza assumere normalità.

Effetto	F	df num.	df den.	p-value	Interpretazione
Trattamento	3,649	1	86,36	0,059	Non significativo
Tempo	31,191	4	146,14	<0,001	Significativo
Classe di parto	2,392	4	286,57	0,051	Non significativo
Trattamento × tempo	5,892	4	340,92	<0,001	Significativo

Tabella 2. ANOVA di tipo III del modello lineare misto per SCS.

L'analisi del SCS al controllo basale (effettuato 7 giorni prima della messa in asciutta) dimostra che i due gruppi mostravano valori medi di SCS sovrapponibili ($5,40 \pm 0,32$ per il gruppo AB e $5,03 \pm 0,32$ per il gruppo PRP; $p = 0,380$), confermando l'omogeneità clinica e tecnologica degli animali arruolati nello studio. Estendendo l'analisi del SCS all'intero intervallo di tempo, quindi sino al tempo 130 giorni postpartum, i risultati evidenziano che non esistono differenze statisticamente significative per quanto riguarda il trattamento, supportando l'ipotesi sperimentale che il PRP può essere considerato un trattamento sostitutivo agli antibiotici nella SDCT. L'interazione trattamento × tempo è tuttavia risultata significativa ($p < 0,001$) indicando che l'andamento della cellularità nel secreto mammario differisce tra i due gruppi nelle diverse fasi del postpartum. Per questo motivo, il confronto medio complessivo tra i trattamenti ($p = 0,059$) non va interpretato isolatamente e i confronti entro ciascun tempo sono da considerarsi informativi.

Tempo	AB EMM ± SE	PRP EMM ± SE	PRP – AB	p-value
-7 giorni	$5,40 \pm 0,32$	$5,03 \pm 0,32$	-0,37	0,380
+7 giorni	$2,89 \pm 0,31$	$4,34 \pm 0,31$	+1,45	0,0007
+40 giorni	$1,59 \pm 0,31$	$2,96 \pm 0,31$	+1,37	0,0013
+80 giorni	$2,41 \pm 0,32$	$2,61 \pm 0,31$	+0,20	0,638
+130 giorni	$3,02 \pm 0,32$	$3,26 \pm 0,31$	+0,24	0,577

Tabella 3. Medie marginali stimate dell'SCS e confronti tra trattamenti in funzione del tempo.

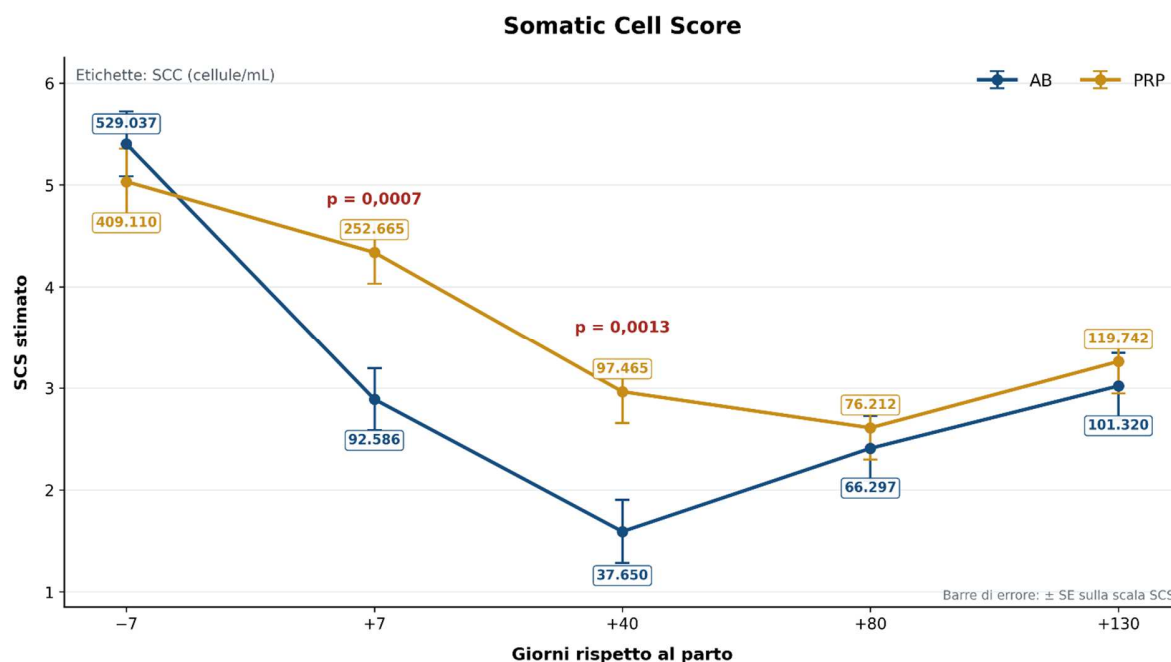


Figura 3. SCS stimato rispetto ai giorni dal parto per i due gruppi.

I dati raccolti e descritti in Tabella III e Figura 3, evidenziano che al giorno -7 dal momento dell'asciutta, considerato il punto basale dello studio, i gruppi sono comparabili per quanto riguarda il SCS. A 7 e 40 giorni postpartum l'SCS stimato è maggiore nel gruppo PRP, rispettivamente con una media di 252.000 per il PRP e 92.000 per il trattamento antibiotico a 7 giorni ($p < 0,001$) e 97000 per il PRP e 38000 per l'antibiotico a 40 giorni dal parto ($p < 0,01$). Le differenze non sono più evidenti a 80 e 130 giorni. In termini biologici, i risultati indicano una più lenta riduzione iniziale dell'SCS nel gruppo PRP, seguita da convergenza dei due gruppi nella fase successiva della lattazione.

4.3.2 Valutazione delle mastiti postpartum

Trattamento	Mastite	Nessuna mastite	Totale	Incidenza
AB	20	26	46	43,5%
PRP	15	30	45	33,3%

Tabella 4. Incidenza di mastite calcolata a livello di bovina.

Per quanto riguarda l'incidenza delle mastiti postpartum, questa è risultata percentualmente inferiore nel gruppo PRP (33,3%) rispetto al gruppo AB (43,5%), ma la differenza non è statisticamente significativa (Fisher $p = 0,391$; odds ratio AB/PRP = 1,54). Il campione non fornisce quindi evidenze sufficienti per concludere che i trattamenti differiscano riguardo rischio di mastite postpartum.

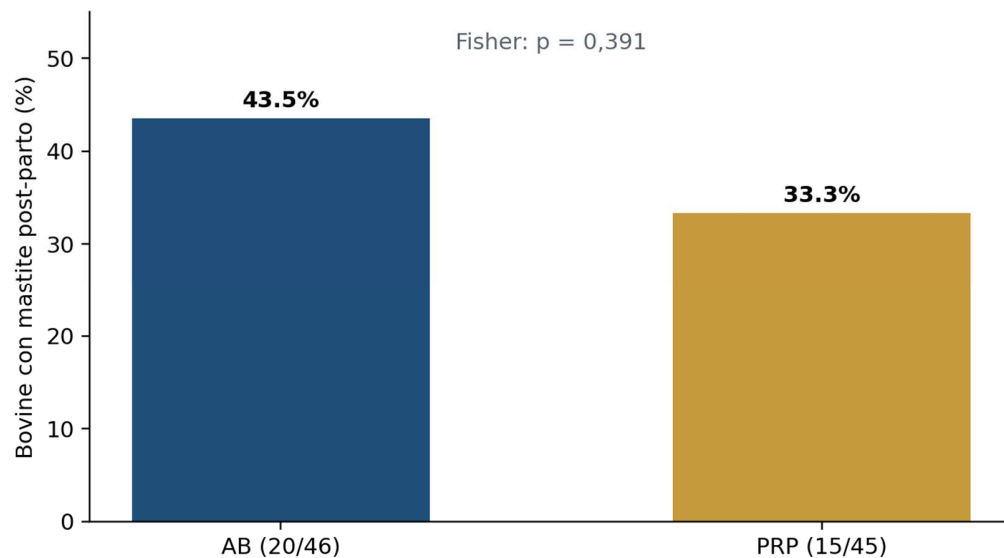


Figura 4. Percentuale di bovine con almeno un episodio di mastite postpartum.

Trattamento	n	Media $\pm$ SD	Mediana	Q1–Q3	Min–Max
AB	20	92,0 $\pm$ 45,7	92	54,3–126,0	19–169
PRP	15	67,5 $\pm$ 49,3	59	30,5–94,5	10–159

Tabella 5. Giorni postpartum alla diagnosi nei 35 casi di mastite.

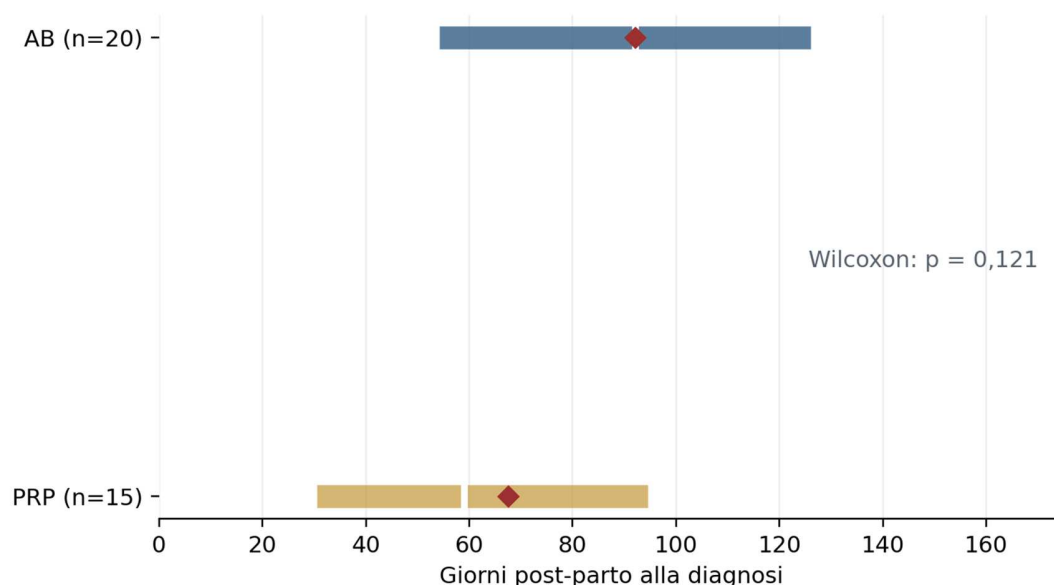


Figura 5. Intervallo interquartile, mediana (barra bianca) e media (rombo rosso).

Per quanto riguarda la tempistica di insorgenza delle mastiti, queste compaiono tendenzialmente prima nel gruppo PRP, con una mediana di 59 giorni, rispetto a 92 nel gruppo AB. Tuttavia, la differenza non raggiunge la significatività statistica ($p = 0,121$). Si tratta pertanto di un segnale descrittivo, non di una dimostrazione di diversa tempistica nella insorgenza della patologia.

4.3.3 Analisi microbiologiche

Tra le colture positive documentate, i riscontri più frequenti sono stati *Str. uberis* (7), *E. coli* (6), *Str. dysgalactiae* (2), *Serratia spp* (1) e *Str. canis* (1). I numeri, soprattutto nel gruppo PRP, sono troppo piccoli per confronti eziologici affidabili.

4.4 Discussione

L'analisi dei dati sperimentali ottenuti dal confronto tra il gruppo PRP autologo e il gruppo AB al momento della messa in asciutta permette di valutare, seppure in modo preliminare, l'efficacia del protocollo biologico in sostituzione al trattamento convenzionale. In

particolare, l'analisi suggerisce alcune dinamiche immunologiche e cliniche della ghiandola mammaria nel periodo postpartum.

Come si può osservare nella Tabella 3, al controllo basale (effettuato 7 giorni prima della messa in asicutta), i gruppi risultano comparabili, confermando l'omogeneità della popolazione selezionata. L'analisi longitudinale della conta delle cellule somatiche evidenzia, in seguito alla terapia, un'interazione significativa tra il trattamento applicato e il tempo di rilevazione ($p < 0,001$), indicando che l'andamento della salute mammaria differisce tra i due gruppi nelle diverse fasi della lattazione analizzate. In particolare, nelle fasi precoci del postpartum, si osserva una differenza significativa: a 7 e 40 giorni dal parto, il gruppo trattato con PRP presenta valori di SCS stimati superiori rispetto al gruppo AB, con una differenza rispettivamente di 1,45 ($p = 0,0007$) e 1,37 unità ($p = 0,0013$).

Sotto il profilo immunobiologico, il transitorio incremento delle cellule nei soggetti trattati con PRP potrebbe essere indicativo del meccanismo d'azione biochimico del preparato autologo. Il PRP, in seguito alla degranulazione degli alpha-granuli piastrinici, rilascia nel microambiente intramammario citochine, chemochine e fattori di crescita polipeptidici (tra cui PDGF e TGF-beta) e altre componenti (come microRNA regolatori) in grado di stimolare attivamente la chemiotassi e la diapedesi dei leucociti polimorfonucleati (PMN) e dei macrofagi residenti (Lange Consiglio 2014; Lange Consiglio 2014b). Questo afflusso cellulare controllato favorisce la clearance dei detriti cellulari derivanti dall'involutione attiva e accelera i processi di efferocitosi ovvero la rimozione dei neutrofili apoptotici da parte dei macrofagi residenti (Sordillo et al., 1997; Sordillo et. Al., 2002). Come evidenziato in letteratura, l'efferocitosi è un potente stimolatore del network pro-risolutivo, in quanto induce la riprogrammazione metabolica dei macrofagi dal fenotipo pro-infiammatorio M1 al fenotipo riparativo M2, modulando la sintesi di citochine infiammatorie e stimolando la rigenerazione del tessuto epiteliale ghiandolare (Danev et al., 2025). Negli animali trattati con PRP, il numero più elevato di cellule nel periodo postpartum potrebbe quindi essere diretta conseguenza di una diversa condizione immunobiologica della mammella. La DSCC costituisce, infatti, un indicatore più accurato per definire la reale prevalenza delle diverse sottopopolazioni leucocitarie (neutrofili, linfociti e macrofagi) nel secreto mammario,

superando i limiti della sola conta delle cellule somatiche totali (Damm et al., 2017). Al contrario, nel gruppo AB si osserva una riduzione precoce e marcata del SCS postpartum ($2,89 \pm 0,31$ a 7 giorni), legata all'azione battericida diretta e immediata del cefalonium diidrato, che arresta la replicazione batterica ma non esplica alcuna attività modulatrice sulla componente cellulare o di stimolo alla riparazione stromale (Bradley et al., 2010). L'assenza di differenze significative nel SCS a 80 e 130 giorni postpartum (con valori che convergono sotto la soglia di significatività clinica) dimostra comunque che la temporanea stimolazione immunitaria indotta dal PRP evolve verso una stabilizzazione della salute della mammella a lungo termine, del tutto sovrapponibile a quella ottenuta tramite la profilassi antibiotica convenzionale.

In Figura 3 si osserva l'incremento dell'SCS all'aumentare dei giorni di lattazione sia nel gruppo AB che nel gruppo PRP a partire dal giorno 40. Si tratta di un fenomeno fisiologico ampiamente documentato, riconducibile ad una combinazione di dinamiche di concentrazione, rimodellamento cellulare e attivazione di meccanismi di sorveglianza locale (Capuco et al., 2020). Nel complesso è possibile osservare che le bovine del gruppo PRP presentano SCS leggermente superiore rispetto alle bovine del gruppo AB per tutti i controlli effettuati. Tuttavia, non si tratta di un dato preoccupante poiché si tratta di bovine ugualmente sane, che presentano valori accettabili di sanità della mammella e comunque dal controllo effettuato a 40 giorni sino al termine del follow up le differenze non sono statisticamente significative

La letteratura scientifica riporta diversi lavori che hanno analizzato l'andamento cellulare in bovine da latte sottoposte a SDCT (D'Amico et al., 2024; Mondini et al., 2023; Niemi et al., 2022; Cameron et al., 2015). L'andamento temporale dei profili di cellularità (SCS/SCC) registrati nel follow-up del presente lavoro di tesi trova riscontro nella suddetta letteratura. La dinamica, caratterizzata da un incremento transitorio delle cellule somatiche nel postpartum precoce seguito da una progressiva stabilizzazione e da una convergenza statistica a lungo termine con il controllo antibiotico convenzionale, dimostra che anche i valori citologici delle bovine trattate con PRP rientrano pienamente nella finestra dei dati fisiologici attesi (D'Amico et al., 2024; Mondini et al., 2023; Niemi et al., 2022; Cameron et

al., 2015). Inoltre, la finestra temporale indagata nel lavoro di tesi, compresa tra 7 e 130 giorni postpartum, è pienamente sovrapponibile e coerente con gli intervalli di monitoraggio impiegati negli studi citati, i quali valutano la salute della ghiandola mammaria nella successiva lattazione in un arco temporale che spazia dal periparto precoce fino al consolidamento della produzione a medio termine.

Per quanto riguarda un ulteriore parametro analizzato, l'ordine di parto è infine possibile osservare come questo non influisca sui risultati del trattamento (Tabella 1), presentando un $p = 0.051$.

La determinazione delle infiammazioni intramammarie (IMI) postpartum costituisce il *gold standard* sperimentale per confermare che l'azione terapeutica dei due trattamenti abbia effettivamente un'azione preventiva e protettiva nei confronti dell'insorgenza di mastiti nel periodo postpartum. Per quanto concerne questo aspetto, ossia l'efficacia clinica nella prevenzione delle infezioni intramammarie (IMI), i risultati non mostrano differenze statisticamente significative nell'incidenza di mastite postpartum tra i due protocolli ($p = 0,391$). Il gruppo PRP ha registrato un'incidenza di mastiti del 33,3% (15/45 bovine), a fronte del 43,5% osservato nel gruppo AB (20/46 bovine). Sebbene il dato descrittivo indichi una riduzione numerica dei casi nel gruppo trattato con biotecnologie rigenerative, l'assenza di significatività statistica evidenzia una sostanziale equivalenza dei due trattamenti nella protezione della ghiandola mammaria nelle prime fasi della lattazione.

La tempistica di insorgenza della mastite clinica, pur non risultando significativamente differente dal punto di vista statistico ($p = 0,121$), ha mostrato un segnale descrittivo di rilevante interesse: i casi clinici sono comparsi tendenzialmente prima nel gruppo PRP (mediana 59 giorni, intervallo interquartile 30,5–94,5 giorni) rispetto al gruppo AB (mediana 92 giorni, intervallo interquartile 54,3–126,0 giorni). Questa dinamica temporale potrebbe essere riconducibile ai diversi profili di rilascio e decadimento d'azione dei due trattamenti. Il cefalonium diidrato in particolare è formulato come preparazione intramammaria a lunga durata d'azione, concepita per garantire una barriera fisica sterile che permane nella ghiandola per l'intera durata del dry period (Bradley et al., 2010). Tuttavia, dopo il parto, il

decadimento del principio attivo nel secreto latteo postpartum espone l'animale a infezioni ambientali tardive. Al contrario, il PRP concentra la propria azione immunomodulatoria e barriera nelle prime fasi della transizione e del postpartum coerentemente con il valore più alto di SCS osservato a 7 e 40 giorni. Di conseguenza, sarebbe necessaria una precisa valutazione degli effetti biologici nella finestra temporale osservata per poter comprendere il differente comportamento osservato. E' comunque da sottolineare che il numero limitato di casi, non permette di trarre conclusioni certe su eventuali differenze tra i due trattamenti riguardo a questo aspetto.

Nel complesso, l'insieme dei dati osservati sull'andamento del valore SCS e delle IMI suggerisce una non-inferiorità clinica a lungo termine del trattamento biologico con PRP rispetto alla profilassi antibiotica convenzionale, pur considerando i limiti dello studio preliminare.

Dal punto di vista eziologico, i microrganismi isolati includono prevalentemente *Streptococcus uberis* ed *Escherichia coli*, patogeni ambientali la cui gestione è strettamente legata alla qualità delle barriere fisiche, dell'igiene della lettiera dell'allevamento e della fase di mungitura, oltre che alla risposta immunitaria dell'ospite. *Streptococcus uberis* è attualmente riconosciuto come uno dei patogeni mastitogeni più rilevanti e diffusi a livello globale nel settore lattiero-caseario. Delle recenti ricerche hanno documentato la capacità di numerosi ceppi di comportarsi non più come agenti ambientali, ma come agenti infettivi a trasmissione orizzontale (Davies et al., 2016).

L'utilizzo di PRP nei protocolli di gestione dell'asciutta, si allinea alle direttive di *antimicrobial stewardship* finalizzate alla riduzione della resistenza antimicrobica. L'impiego di questo preparato piastrinico riduce la pressione selettiva sulle popolazioni batteriche residenti, contrastando l'emergenza di fenotipi resistenti. La riduzione dell'uso di molecole antimicrobiche, in particolare di quelle a lunga azione come il cefalonium diidrato all'interno dell'allevamento, determina un netto miglioramento degli indici di consumo rilevati sulla piattaforma Classyfarm. Tale riduzione dell'esposizione totale della mandria agli antibiotici in classi di rischio critiche per lo sviluppo di resistenze, favorisce l'adesione ai parametri di

biosicurezza e sanità animale previsti dal regolamento (UE) 2019/6 (Lange-Consiglio et al., 2014).

Infine, per quanto riguarda l'impatto economico, l'utilizzo di PRP offre vantaggi certi derivanti dall'assenza di giorni di sospensione per il latte postpartum a differenza di protocolli di asciutta convenzionali i cui residui possono imporre lo scarto del latte fino a 96 ore postpartum. Tuttavia, nonostante i benefici derivanti dalla mancata eliminazione del latte e dal risparmio sull'acquisto dei farmaci, mancano in letteratura analisi approfondite che quantificano i costi variabili associati alla preparazione del PRP. La diffusione ancora limitata di questa biotecnologia nel settore bovino rende necessaria la conduzione di studi su larga scala per stabilire la sostenibilità finanziaria dell'approccio rigenerativo rispetto ai modelli convenzionali.

4.5 Limiti dello studio e prospettive future

Nonostante i promettenti risultati preliminari ottenuti, l'interpretazione dell'efficacia clinica e immunomodulante del Plasma Ricco in Piastrine (PRP) autologo alla messa in asciutta risente di alcuni limiti metodologici del presente modello sperimentale che richiedono cautela nella generalizzazione delle conclusioni.

In primo luogo, lo studio ha coinvolto un numero limitato di animali trattati (91 bovine totali, suddivise in 45 soggetti nel gruppo PRP e 46 nel gruppo di controllo AB) appartenenti a un'unica azienda zootecnica. Tale dimensione riduce la potenza statistica delle analisi, in particolare per quanto concerne la valutazione dell'incidenza cumulativa e della tempistica di insorgenza delle mastiti cliniche postpartum, dove i trend favorevoli al trattamento biologico sono emersi unicamente a livello descrittivo.

In secondo luogo, l'assenza della determinazione della conta cellulare differenziale (DSCC) nel periodo postpartum impedisce di caratterizzare l'esatta dinamica delle sottopopolazioni leucocitarie (neutrofili polimorfonucleati, linfociti e macrofagi) nel secreto mammario. La disponibilità di questo parametro citometrico postpartum avrebbe permesso di ottenere informazioni più precise sull'ipotesi biologica secondo cui l'elevato Somatic Cell Score

(SCS) riscontrato a 7 e 40 giorni postpartum nel gruppo PRP riflette un processo attivo di chemiotassi, clearance cellulare ed efferocitosi stimolato dai fattori di crescita piastrinici, piuttosto che uno stato flogistico subclinico.

Un ulteriore limite è rappresentato dalla mancata analisi quantitativa e qualitativa delle produzioni postpartum. Sebbene la letteratura internazionale attesti che l'omissione della terapia antibiotica al dry-off nei soggetti sani non influenzi negativamente la resa produttiva nella lattazione successiva, la misurazione della produzione giornaliera di latte (kg/capo) e la determinazione analitica delle frazioni macronutrizionali (grasso, proteine, lattosio) e delle attitudini lattodinamografiche postpartum avrebbero fornito una valutazione esaustiva dell'impatto del PRP sull'attività secretoria e sintetica della mammella.

Infine, un ulteriore punto debole è rappresentato dai limitati dati microbiologici ed eziologici postpartum raccolti. Il numero estremamente ridotto di campioni risultati positivi all'esame colturale (tra cui si segnalano principalmente isolati di *Streptococcus uberis* ed *Escherichia coli*) non consente di eseguire modelli di confronti epidemiologici affidabili sul tasso di guarigione microbiologica in asciutta e sulla prevenzione di nuove infezioni intramammarie (IMI) postpartum nei due gruppi.

Sarà necessario quindi condurre ulteriori indagini cliniche controllate e multicentriche su più ampia scala, che integrino analisi citometriche differenziali sistematiche postpartum e il monitoraggio continuo delle performance produttive e tecnologiche del latte, al fine di confermare definitivamente la sostenibilità biologica ed economica di questa biotecnologia rigenerativa su scala commerciale.

4.6 Conclusioni

L'impiego del PRP si inserisce come valida alternativa biologica al trattamento antibiotico preventivo al momento dell'asciutta, rispondendo alle esigenze di riduzione dell'utilizzo di antimicrobici dettate dal Regolamento (UE) 2019/6. Mentre l'antibiotico (es. cefalonium diidrato) agisce tramite un effetto battericida diretto ma con il rischio di persistenza di residui postpartum e selezione di geni AMR, il PRP agisce stimolando il rimodellamento del

tessuto ghiandolare mammario e l'immunità endogena, inclusa la polarizzazione dei macrofagi verso il fenotipo riparativo M2 e il restauro delle giunzioni serrate (*tight junctions*) dell'epitelio mammario.

Le analisi preliminari condotte nel presente lavoro di tesi suggeriscono un'efficacia clinica comparabile del PRP rispetto alla terapia antibiotica convenzionale. Sebbene si osservi un incremento dell'SCS a 7 e 40 giorni dal parto nel gruppo PRP, ciò riflette probabilmente l'attivazione della sorveglianza immunitaria locale e dei processi di clearance tissutale, stimolati dai fattori di crescita piastrinici, evolvendo verso una stabilizzazione della salute mammaria a lungo termine, sovrapponibile al protocollo antibiotico.

L'evidenza sperimentale non evidenzia differenze clinicamente rilevanti rispetto al protocollo AB anche per quanto riguarda la prevenzione delle mastiti postpartum. L'integrazione del PRP nei protocolli aziendali favorisce *l'antimicrobial stewardship*, mitigando la pressione selettiva per la resistenza antimicrobica e migliorando gli indici di biosicurezza della piattaforma Classyfarm.

In conclusione, non sono da dimenticare anche i vantaggi economici del trattamento, ovvero commercializzazione quasi immediata del latte postpartum, eliminando le perdite derivate dai tempi di sospensione, e minore spesa per l'acquisto di antimicrobici.

BIBLIOGRAFIA

- Ahmann, J., Steinhoff-Wagner, J., & Büscher, W. (2021).** Determining Immunoglobulin Content of Bovine Colostrum and Factors Affecting the Outcome: A Review. *Animals*, 11(12), Article 3587. <https://doi.org/10.3390/ani11123587>
- Angelopoulou, A., Warda, A. K., Hill, C., & Ross, R. P. (2019).** Non-antibiotic microbial solutions for bovine mastitis – live biotherapeutics, bacteriophage, and phage lysins. *Critical Reviews in Microbiology*, 45(1), 1–17. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2018.1560641>
- Atabai, K., Sheppard, D., & Werb, Z. (2007).** Roles of the Innate Immune System in Mammary Gland Remodeling During Involution. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 12(1), 37–45. <https://doi.org/10.1007/s10911-007-9036-6>
- Bradley, A. J., Breen, J. E., Payne, B., Williams, P., & Green, M. J. (2010).** The use of a cephalonium containing dry cow therapy and an internal teat sealant, both alone and in combination. *Journal of Dairy Science*, 93(4), 1566–1577. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2465>
- Bradley, A. J., & Green, M. J. (2004).** The importance of the nonlactating period in the epidemiology of intramammary infection and strategies for prevention. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 20(3), 547–568. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2004.06.001>
- Brouillette, E., Talbot, B. G., & Malouin, F. (2003).** The Fibronectin-Binding Proteins of *Staphylococcus aureus* May Promote Mammary Gland Colonization in a Lactating Mouse Model of Mastitis. *Infection and Immunity*, 71(4), 2292–2295. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.4.2292-2295.2003>
- Bushe, T., & Oliver, S. P. (1987).** Natural protective factors in bovine mammary secretions following different methods of milk cessation. *Journal of Dairy Science*, 70(4), 696–704. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(87\)80088-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(87)80088-2)

- Capuco, A. V., Akers, R. M., & Smith, J. J. (1997).** Mammary growth in Holstein cows during the dry period: Quantification of nucleic acids and histology. *Journal of Dairy Science*, 80(3), 477–487. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)75960-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)75960-5)
- Capuco, A. V., & Choudhary, R. K. (2020).** Symposium review: Determinants of milk production: Understanding population dynamics in the bovine mammary epithelium. *Journal of Dairy Science*, 103(3), 2928–2940. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17241>
- Cattaneo, L., Minuti, A., Dahl, G. E., & Trevisi, E. (2023).** Graduate Student Literature Review: The challenge of drying-off high-yielding dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 106(9), 6416–6426. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-23113>
- Cole, A. L., et al. (2020).** Macrophage metabolic reprogramming during the resolution of inflammation in ruminants. *Developmental & Comparative Immunology*, 110, Article 103714. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103714>
- Dahl, G. E., Tao, S., & Laporta, J. (2017).** Triennial Lactation Symposium/BOLFA: Late gestation heat stress of dairy cattle programs dam and daughter milk production. *Journal of Animal Science*, 95(12), 5701–5710. <https://doi.org/10.2527/jas2017.1812>
- Damm, M., Holm, C., Blaabjerg, M., Bro, M. N., & Schwarz, D. (2017).** *Differential Somatic Cell Count—A Novel Method for Routine Mastitis Screening in the Frame of Dairy Herd Improvement Testing Programs*. *Journal of Dairy Science*, 100(6), 4926–40. (Fonte primaria che definisce il metodo e la formula della DSCC).
- Daneshi, M., Caton, J. S., Caixeta, L. S., Eftekhari, Z., & Ward, A. K. (2023).** Expression, Regulation, and Function of β -Defensins in the Bovine Mammary Glands: Current Knowledge and Future Perspectives. *Animals*, 13(21), Article 3372. <https://doi.org/10.3390/ani13213372>
- Danev, N., Harman, R. M., Sipka, A. S., Oliveira, L., Huntimer, L., & Van de Walle, G. R. (2025).** The secretomes of bovine mammary epithelial cell subpopulations

differentially modulate macrophage function. *Veterinary Quarterly*, 45(1), 1–14.
<https://doi.org/10.1080/01652176.2025.2463338>

Davies, P. L., Leigh, J. A., Bradley, A. J., Archer, S. C., Emes, R. D., & Green, M. J. (2016). *Molecular Epidemiology of Streptococcus uberis Clinical Mastitis in Dairy Herds: Strain Heterogeneity and Transmission*. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(1), 68–74. [Fonte primaria che documenta PTE nel 63% degli allevamenti e la predominanza del complesso CC5].

De Prado-Taranilla, A. I., Holstege, M. M. C., Bertocchi, L., Appiani, A., Becvar, O., Davidek, J., Bay, D., Jimenez, L. M., Roger, N., Krömker, V., Paduch, J. H., Piepers, S., Wuytack, A., Veenkamp, A., van Werven, T., Dalez, B., Le Page, P., Schukken, Y. H., & Velthuis, A. G. J. (2020). Incidence of milk leakage after dry-off in European dairy herds, related risk factors, and its role in new intramammary infections. *Journal of Dairy Science*, 103(10), 9224–9237. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-18082>

Delmonte, A. (2025). Efficacia del Plasma Ricco in Piastrine (PRP) nel trattamento della mastite bovina: un approccio innovativo per ridurre l'uso di antibiotici in allevamento e diminuire l'antibiotico-resistenza [Tesi di laurea magistrale, Università degli Studi di Parma].

Dufour, S., Wellemans, V., Roy, J.-P., Lacasse, P., Ordoñez-Iturriaga, A., & Francoz, D. (2019). Non-antimicrobial approaches at drying-off for treating and preventing intramammary infections in dairy cows. Part 1. Meta-analyses of efficacy of using an internal teat sealant without a concomitant antimicrobial treatment. *Animal Health Research Reviews*, 20(1), 86–97. <https://doi.org/10.1017/S1466252319000070>

Duque-Madrid, P. C., Velasco-Bolaños, J., Ceballos-Márquez, A., López, C., & Carmona, J. U. (2021). Intramammary treatment using allogeneic pure platelet-rich plasma in cows with subclinical mastitis caused by Gram-positive bacteria. *Scientific Reports*, 11(1), Article 23737. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03067-4>

- El-Sayed, A., & Kamel, M. (2021).** Bovine mastitis prevention and control in the post-antibiotic era. *Tropical Animal Health and Production*, 53(2), Article 236. <https://doi.org/10.1007/s11250-021-02668-3>
- European Commission. (2015).** Commission Notice — Guidelines for the prudent use of antimicrobials in veterinary medicine (2015/C 299/04). *Official Journal of the European Union*, C 299, 7–26. [https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:52015XC0911\(01\)](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:52015XC0911(01))
- Fabris, T. F., Laporta, J., Skibieli, A. L., Corra, F. N., Senn, B. D., Wohlgemuth, S. E., & Dahl, G. E. (2019).** Effect of heat stress during early, late, and entire dry period on dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 102(6), 5647–5656. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15711>
- Gao, Y., Orellana Rivas, R. M., Marins, T. N., Bernard, J. K., Melendez, P., & Tao, S. (2025).** Systemic and mammary inflammation and mammary gland development of Holstein dairy cows around dry-off and calving. *Journal of Dairy Science*, 108(2), 2090–2110. <https://doi.org/10.3168/jds.2024-25279>
- Huang, J., Luo, G., Zhang, Z., et al. (2014).** iTRAQ-proteomics and bioinformatics analyses of mammary tissue from cows with clinical mastitis due to natural infection with *Staphylococcus aureus*. *BMC Genomics*, 15(1), Article 839. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-839>
- Hurley, W. L., & Theil, P. K. (2011).** Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk. *Nutrients*, 3(4), 442–474. <https://doi.org/10.3390/nu3040442>
- Jawor, P., Krzyżanowska-Gołąb, D., Bajzert, J., Stefaniak, T., & Kątnik-Prastowska, I. (2020).** Changes of plasma fibronectin and fibronectin-fibrin complexes in dams of stillborn dairy calves. *Irish Veterinary Journal*, 73(1), Article 16. <https://doi.org/10.1186/s13620-020-00171-1>
- Kabera, F., Roy, J. P., Afifi, M., Godden, S., Stryhn, H., Sanchez, J., & Dufour, S. (2021).** Comparing Blanket vs. Selective Dry Cow Treatment Approaches for Elimination and

- Prevention of Intramammary Infections During the Dry Period: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, Article 688450. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.688450>
- Lacasse, P. (2025).** Invited review: Interactions between prolactin and local regulation of the mammary gland. *Journal of Dairy Science*, 108(7), 6587–6600. <https://doi.org/10.3168/jds.2025-26358>
- Lange-Consiglio, A., Spelta, C., Perego, R., Delaney, C., Guaitamacchi, A., Luini, M., & Cremonesi, F. (2014a).** Effects of platelet-rich plasma and platelet concentrate on bovine clinical mastitis: A clinical trial. *Journal of Dairy Science*, 97(11), 7504–7518. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8227>
- Lange-Consiglio, A., Spelta, C., Garlappi, R., Luini, M., & Cremonesi, F. (2014b).** Intramammary administration of platelet concentrate as an unconventional therapy in bovine mastitis: First clinical application. *Journal of Dairy Science*, 97(10), 6223–6230. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-7999>
- Lange-Consiglio, A., Gusmara, C., Manfredi, E., Idda, A., Soggiu, A., Greco, V., Bonizzi, L., Cremonesi, F., & Zecconi, A. (2019).** Antimicrobial effects of conditioned medium from amniotic progenitor cells in vitro and in vivo: toward tissue regenerative therapies for bovine mastitis. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, Article 240. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00240>
- Laven, R. A., et al. (2014).** Effect of dry period length on the effect of an intramammary teat sealant on the risk of mastitis in cattle treated with antibiotics at drying off. *New Zealand Veterinary Journal*, 62(4), 231–238. <https://doi.org/10.1080/00480169.2013.879689>
- López, C., et al. (2024a).** Platelet derivatives in veterinary regenerative medicine: Mechanisms of action and clinical applications in bovine mastitis. *Research in Veterinary Science*, 168, Article 105120. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2024.105120>

- López, C., Duque-Madrid, P. C., Ceballos-Márquez, A., & Carmona, J. U. (2024b).** Evaluation of pure platelet-rich plasma, cloxacillin, and their combination for treating subclinical mastitis in dairy cows. *Scientific Reports*, 14(1), Article 23737. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-48120-1>
- López, C., Duque-Madrid, P. C., Ceballos-Márquez, A., & Carmona, J. U. (2024c).** Effect of allogeneic pure platelet-rich plasma, sodium cloxacillin, and their combination for the treatment of subclinical mastitis in crossbred cows. *Frontiers in Veterinary Science*, 11, Article 1432354. <https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1432354>
- McCubbin, K. D., de Jong, E., Lam, T. J. G. M., Kelton, D. F., Middleton, J. R., McDougall, S., De Vliegher, S., Godden, S., Rajala-Schultz, P. J., Rowe, S., Speksnijder, D. C., Kastelic, J. P., & Barkema, H. W. (2022).** Invited review: Selective use of antimicrobials in dairy cattle at drying-off. *Journal of Dairy Science*, 105(9), 7161–7189. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21455>
- Mollenkopf, D. F., Glendening, C., Wittum, T. E., Funk, J. A., Tragesser, L. A., & Morley, P. S. (2010).** Association of dry cow therapy with the antimicrobial susceptibility of fecal coliform bacteria in dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*, 96(1-2), 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.05.011>
- Nóbrega, D. B., et al. (2021).** Prevalence of antimicrobial resistance genes and its association with restricted antimicrobial use in food-producing animals: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 76(3), 561–575. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa472>
- Parlamento europeo e Consiglio dell'Unione europea. (2018).** Regolamento (UE) 2019/6 del Parlamento europeo e del Consiglio dell'11 dicembre 2018 relativo ai medicinali veterinari e che abroga la direttiva 2001/82/CE. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2019/6/oj>
- Oliver, S. P., Murinda, S. E., & Jayarao, B. M. (2011).** Impact of antibiotic use in adult dairy cows on antimicrobial resistance of veterinary and human pathogens. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(3), 337–355. <https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0765>

- Parés, S., Cano-Garrido, O., Bach, A., Ferrer-Miralles, N., Villaverde, A., Garcia-Fruitós, E., & Arís, A. (2021).** The Potential of Metalloproteinase-9 Administration to Accelerate Mammary Involution and Boost the Immune System at Dry-Off. *Animals*, 11(12), Article 3415. <https://doi.org/10.3390/ani11123415>
- Pearce, S. D., Parmley, E. J., Winder, C. B., Sargeant, J. M., Prashad, M., Ringelberg, M., Felker, M., & Kelton, D. F. (2023).** Evaluating the efficacy of internal teat sealants at dry-off for the prevention of new intra-mammary infections during the dry-period or clinical mastitis during early lactation in dairy cows: A systematic review update and sequential meta-analysis. *Preventive Veterinary Medicine*, 212, Article 105841. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2023.105841>
- Rainard, P., & Foucras, G. (2018).** A Comprehensive Review of the Bovine Immune Response to Mammalian Pathogens. *Frontiers in Immunology*, 9, Article 3020. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03020>
- Riley, L. G., Williamson, P., Wynn, P. C., & Sheehy, P. A. (2008).** Lactoferrin decreases primary bovine mammary epithelial cell viability and casein expression. *Journal of Dairy Research*, 75(2), 135–141. <https://doi.org/10.1017/S0022029907002920>
- Santman-Berends, I. M. G. A., van den Heuvel, K. W. H., Lam, T. J. G. M., Scherpenzeel, C. G. M., & van Schaik, G. (2021).** Monitoring udder health on routinely collected census data: Evaluating the short- to mid-term consequences of implementing selective dry cow treatment. *Journal of Dairy Science*, 104(2), 2280–2289. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18973>
- Sordillo, L. M. (2016).** Nutritional impacts on dairy cow immunity and health. *Animal Production Science*, 56(8), 1251–1258. <https://doi.org/10.1071/AN15830>
- Sordillo, L. M., Shafer-Weaver, K., & DeRosa, D. (1997).** Immunobiology of the mammary gland. *Journal of Dairy Science*, 80(8), 1851–1865. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76121-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76121-6)

- Sordillo, L. M., & Streicher, K. L. (2002).** Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 7(2), 135–146. <https://doi.org/10.1023/A:1020347818725>
- Stevens, M., Piepers, S., & De Vlieghe, S. (2016a).** Mastitis prevention and control practices and mastitis treatment strategies associated with the consumption of (critically important) antimicrobials on dairy herds in Flanders, Belgium. *Journal of Dairy Science*, 99(4), 2896–2903. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10496>
- Stevens, M., Piepers, S., Supré, K., Dewulf, J., & De Vlieghe, S. (2016b).** Quantification of antimicrobial consumption in adult cattle on dairy herds in Flanders, Belgium, and associations with udder health, milk quality, and production performance. *Journal of Dairy Science*, 99(3), 2118–2130. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10199>
- Superchi, P., et al. (2014).** Opposing effects of lactoferrin on the proliferation of fibroblasts and epithelial cells from bovine mammary gland via MAPK signaling pathway and TGF- β expression. *Journal of Dairy Research*, 81(4), 489–499. <https://doi.org/10.1017/S002202991400045X>
- Tao, S., & Dahl, G. E. (2013).** Invited review: Heat stress effects during late gestation on dry cows and their calves. *Journal of Dairy Science*, 96(7), 4079–4093. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6278>
- Tetens, J. L., Billerbeck, S., Schwenker, J. A., & Hölzel, C. S. (2019).** Short communication: Selection of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in dairy calves associated with antibiotic dry cow therapy—A cohort study. *Journal of Dairy Science*, 102(12), 11449–11452. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16659>
- Trajkovska, B., Kochoski, L., Dimitrovska, G., Hajrulai-Musliu, Z., Uzunov, R., Petkov, V., & Davkov, F. (2013).** Changes in the lactoferrin concentration at drying off period. *Horizons B*, 9(2), Article P09. <https://doi.org/10.20544/HORIZONS.B.09.2.P09>
- Valsson, O., Tayler, E., Kitutu, F. E., Bonnah, J., Cornejo, J., Dorado Garcia, A., Dreser, A., Echeverria, A., Essack, S. Y., Fenwick, S., Fuller, W., Hanna, N., Hegewisch-**

- Taylor, J., Holloway, B., Jeannin, M., Joshi, J., Kainga, H., Khurana, A., Koya, S. F., . . . Chandler, C. I. R. (2026).** Antibiotic surveillance: an action-oriented integrated approach. Wellcome Open Research, 11, Article 55. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.24568.1>
- Verdier-Metz, I., Delbès, C., Bouchon, M., Pradel, P., Theil, S., Rifa, E., Corbin, A., & Chassard, C. (2022).** Influence of Post-Milking Treatment on Microbial Diversity on the Cow Teat Skin and in Milk. Dairy, 3(2), 262–276. <https://doi.org/10.3390/dairy3020021>
- Vilar, M. J., & Rajala-Schultz, P. J. (2020).** Dry-off and dairy cow udder health and welfare: Effects of different milk cessation methods. The Veterinary Journal, 262, Article 105503. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2020.105503>
- Wellnitz, O., & Bruckmaier, R. M. (2012).** The venereal and intramammary innate immune response and its modulation in the bovine gland. Journal of Animal Science, 90(11), 3748–3755. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5323>
- Zandonai, G. (2022).** Derivati piastrinici: un futuro in buiatria? [Tesi di laurea magistrale, Università degli Studi di Padova].
- Zhao, X., et al. (2024).** Platelet-rich plasma protects the integrity of the blood-milk barrier by regulating tight junction proteins in bovine mammary epithelial cells. Veterinary Research, 55(1), Article 14. <https://doi.org/10.1186/s13567-024-01271-x>
- Zobel, G., Weary, D. M., Leslie, K. E., & von Keyserlingk, M. A. G. (2015).** Invited review: Cessation of lactation: Effects on animal welfare. Journal of Dairy Science, 98(12), 8263–8277. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9617>

SITOGRAFIA

Ministero della Salute. (s.d.). *ClassyFarm: Sistema informativo nazionale per la sanità animale, l'antimicrobico-resistenza e il benessere animale*. Ministero della Salute;

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER). <https://www.classifyfarm.it>, ultimo accesso 28 luglio 2026

RanDraw. (s.d.). *Online random generator tool for scientific randomization.* <https://randraw.it/>, ultimo accesso Maggio 2026.