

Relazione finale:

Progetto di ricerca e studio di fattibilità relativo all'impiego del lisato piastrinico come strumento di riduzione dell'uso di antibiotico nella prevenzione e cura della mastite negli allevamenti di bovine da latte del Veneto (DGR n. 548 del 05/05/2020).

A cura di:

- Prof.ssa Flaviana Gottardo, Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute
- Dott. Antonio Barberio, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

Introduzione

L'utilizzo non corretto degli agenti antimicrobici in medicina veterinaria, oltre a comportare un aumento del potenziale rischio sanitario per gli allevatori, può essere responsabile della riduzione sia dell'efficienza degli allevamenti sia delle produzioni. Se da un lato, infatti, sono già noti il rischio di contaminazione ambientale, dovuto alla presenza di microrganismi resistenti nelle deiezioni degli animali trattati, e il rischio diretto per veterinari, allevatori e addetti ai lavori di acquisire resistenza agli antibiotici attraverso l'esposizione protratta o ripetuta a essi (ad esempio, attraverso la preparazione di mangimi medicati), dall'altro, l'impatto che l'impiego di antimicrobici nel settore zootecnico ha sul rischio di trasmissione di batteri resistenti all'uomo, in particolare attraverso il consumo di alimenti di origine animale, necessita di ulteriori approfondimenti. L'utilizzo non razionale della terapia antibiotica, oltre a non essere sempre supportato da dati di efficacia in termini di costo-beneficio, ha creato indubbi problemi sia all'industria di trasformazione che al consumatore, con il rischio di presenza di residui nel latte e nelle carni e quello di sviluppo e diffusione dell'antibiotico-resistenza negli agenti patogeni animali e zoonosici.

In particolare, nell'allevamento della vacca da latte la mastite è la prima causa di utilizzo di antibiotico sia per la prevenzione che per la cura. Al momento attuale un efficace programma di controllo delle mastiti si basa infatti sul contenimento delle nuove infezioni e di quelle già esistenti, e ad oggi, questo contenimento è espletato con la terapia antibiotica in lattazione, con la terapia in asciutta e tramite l'eliminazione dei soggetti con mastite cronica.

Relativamente agli animali in asciutta, la terapia antibiotica è eseguita sistematicamente con l'obiettivo di eliminare le infezioni presenti e di impedirne di nuove. La letteratura scientifica riporta che una parte significativa delle mastiti deriva da infezioni contratte durante l'asciutta e si manifesta entro i primi mesi dopo il parto, e che la profilassi antibiotica all'asciutta riduce del 40% questo problema.

La normativa comunitaria e nazionale ha, nel corso dell'ultimo decennio, imposto una serie di limiti all'impiego degli antimicrobici nel settore zootecnico per limitare l'incremento dei fenomeni di antibiotico resistenza (AMR) nei batteri, problematica ampiamente riconosciuta come un pericolo globale sia in medicina umana che veterinaria. In particolare, il nuovo regolamento UE 2019/6 relativo ai medicinali veterinari, ha fissato una serie di restrizioni all'impiego degli antimicrobici con finalità di metafilassi e profilassi negli animali da reddito, che non autorizzano più l'impiego della profilassi in asciutta, ma consentono solo l'impiego del trattamento antibiotico nelle bovine con infezioni batteriche in corso o ad alto rischio d'infezione, la cosiddetta "asciutta selettiva".

Da queste limitazioni è nato l'interesse per lo studio e l'applicazione in campo di metodiche alternative all'impiego degli antimicrobici per il trattamento delle mastiti cliniche lievi e delle bovine da mettere in asciutta, e in particolare sull'impiego di un derivato ematico costituito da piastrine lisate. Le piastrine, o trombociti, sono frammenti cellulari presenti in circolo nell'ordine di $2,5-5 \times 10^5$, a seconda della specie. Non presentano nucleo e la loro struttura nel complesso può essere divisa in una zona periferica, in una zona sol-gen ed una zona contenente gli organelli. Queste componenti ematiche hanno rivelato un enorme potenziale non solo nell'emostasi, ma anche in numerosi altri processi fisiopatologici quali infiammazione, crescita tissutale e tumorale, aterosclerosi, angiogenesi, e difesa antimicrobica dell'ospite. Queste azioni sono legate ai numerosi fattori contenuti nelle piastrine, rilasciati in seguito alla loro attivazione. Visto il loro potenziale, negli anni si sono quindi cercati metodi per sfruttarli nella medicina rigenerativa, sia umana che veterinaria.

Gli emoderivati possono essere divisi a seconda del loro contenuto di piastrine in prodotti ricchi di piastrine PRP (platelet-rich plasma) o PPP (platelet-poor plasma). Il processo di produttivo è unico, difatti il PPP si ottiene dalla produzione di PRP. Per essere considerato un concentrato piastrinico (PC) il contenuto delle piastrine deve essere di almeno 2×10^{11} in Europa (European Directorate for the quality of Medicines & Healthcare., 2020) e di 3×10^{11} negli Stati Uniti (Blood & Blood ProductsFDA, n.d.).

Il lisato piastrinico (LP) è un emoderivato ad alto contenuto di piastrine (platelet-rich plasma, PRP) e acellulare. Studiato inizialmente come sostituto al siero fetale bovino per la crescita cellulare di cellule mesenchimali (Burnouf et al., 2016), ha rapidamente acquisito interesse grazie all'evidenza di un importante rilascio di fattori. Il lisato si produce a partire da un concentrato di piastrine trattato per lisare le cellule.

I derivati piastrinici sono stati testati ed utilizzati per le loro caratteristiche rigenerative, antiinfiammatorie ed antimicrobiche su numerosi tessuti, specialmente ad uso ortopedico (riparazione tendine di Achille o menisco, ricostruzioni dei legamenti, patologie muscolari...), ma anche a livello odontostomatologico, oftalmologico, neurologico, come mezzo colturale per la proliferazione cellulare, sull'apparato riproduttore e sui tessuti molli (Meftahpour et al., 2021).

Tra i vari test effettuati, sicuramente di particolare interesse è l'attività antimicrobica che questi derivati sembrano avere. La sua azione antimicrobica è stata testata nei confronti di vari batteri, fra cui *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (MRSA), *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* (Farghali et al., 2019; Gordon et al., 2021).

Nell'ambito della patologia bovina l'efficacia dell'impiego di derivati piastrinici è stata valutata per il trattamento delle endometriti (Marini et al., 2016), dell'ipofunzionalità ovarica (Cremonesi et al., 2020) e dei disordini riproduttivi (Lange Consiglio et al., 2015).

Per quanto riguarda il trattamento della mastite bovina è stato effettuato uno studio sul trattamento endomammario delle mastiti cliniche di con LP per favorire, grazie ai fattori di crescita liberati dalle piastrine, un effetto sul ripristino della *functio laesa* della ghiandola mammaria e sul recupero qualitativo della produzione di latte riducendo al minimo, o sostituendo completamente, l'utilizzo di antibiotici (Lange Consiglio et al., 2014). In questo studio anche gli animali affetti da mastiti croniche, che generalmente non sono trattati, ma al contrario se ne consiglia l'eliminazione dalla mandria, sono stati recuperati alla produzione.

Obiettivi del progetto:

Scopo generale del progetto era riconfermare la validità del LP come strumento di cura della mastite, testare la sua efficacia nella fase di messa in asciutta della bovine e da ultimo, ma non meno importante, mettere a punto la procedura operativa in campo e in laboratorio per trasformare il progetto pilota in un servizio pubblico e strutturato per gli allevatori.

Nello specifico gli obiettivi del progetto erano:

- Mettere a punto la tecnica di preparazione del lisato piastrinico per la produzione di dosi singole di materiale somministrabili per via endomammaria.
- Valutare l'impiego del LP alla messa in asciutta delle vacche ai fini dell'adozione di protocolli di "asciutta selettiva" su capi che normalmente non richiedono il trattamento con antibiotico (cellule somatiche sotto soglia di attenzione) per migliorare il processo rigenerativo del tessuto mammario e su di vacche problema, ossia quelle che sarebbero comunque trattate con antibiotico.
- Valutare non solo l'efficacia terapeutica del lisato ma anche quella "protettiva" legata alla sua proprietà rigenerativa (non presente in un convenzionale trattamento con antibiotico) registrando la tempistica con la quale si presenterà il primo caso di mastite dal momento di inizio della lattazione.
- Comprovare l'efficacia del LP nel trattamento delle mastiti cliniche e croniche applicando il protocollo proposto da Lange Consiglio e coll. (2014).
- Raccogliere informazioni sulle relazioni fra trattamento con LP e comportamento delle cellule somatiche differenziali (parametro oggetto di monitoraggio da parte di ARAV nelle aziende del Veneto) marker di potenziali processi infiammatori in atto nella mammella.
- Individuare i punti critici e in parallelo le modalità di superamento di tali criticità per la diffusione del sistema di cura con LP a larga parte degli allevamenti del Veneto.

Descrizione delle attività svolte e dei risultati ottenuti:

a) Le aziende inserite nel progetto

Il progetto pilota eseguito in Veneto ha visto la partecipazione di 15 allevamenti e i relativi veterinari aziendali. La presenza di questi ultimi ha consentito di effettuare una valutazione sanitaria e manageriale preliminare della stalla. Le aziende sono collocate in tutto il territorio regionale nello specifico: 7 in provincia di Vicenza, 1 provincia di Padova, 2 provincia Treviso, 2 provincia di Belluno, 1 provincia Venezia e 2 in provincia di Verona. Le dimensioni aziendali vanno da un minimo di 30 capi ad un massimo di 150 capi in mungitura. Le aziende con un numero di capi elevato (più di 200 capi in lattazione) il più delle volte vedono alternarsi il personale che effettua la mungitura e questo può rappresentare un problema al fine della raccolta dei campioni di latte e della registrazione dei dati; per questo motivo sono state selezionati allevamenti medio piccoli. Il pool di aziende inserite nel progetto è comunque rappresentativo della realtà zootecnica Veneta e permette di valutare il grado di applicabilità del protocollo e del prodotto nella realtà operativa delle stalle di vacche da latte del Veneto.

b) Selezione delle bovine sulle quali effettuare il prelievo di sangue per produrre il lisato

La normativa vigente sul farmaco “decreto legislativo del 6 aprile 2006, n 193” considera i prodotti derivati dal sangue al pari di farmaci veterinari; quindi, come spiegato precedentemente, il trattamento sperimentale è stato eseguito in maniera autologa (il lisato ricavato del sangue di una certa bovina poteva essere utilizzato per la cura dei casi di mastite clinica o per il trattamento alla messa in asciutta della stessa bovina). Ciò ha chiaramente creato diverse difficoltà nella scelta degli animali da inserire nella prova dato che era impensabile prelevare tutti gli animali nella speranza che andassero incontro a patologia oppure da trattare alla messa in asciutta. Per ottimizzare il lavoro e rendere efficiente la produzione di lisato piastrinico sono stati selezionati gli animali che potevano essere maggiormente a rischio mastite senza essere necessariamente considerati animali cronici.

Le sacche indirizzate prioritariamente al trattamento clinico sono state quindi prelevate da animali che nella lattazione precedente avevano presentato almeno dei rialzi delle cellule somatiche ai controlli funzionali e che fossero animali nei primi 50 giorni di lattazione. Questo ha permesso di scegliere animali maggiormente a rischio di andare in contro a mastite dato che nei primi 100-120 giorni di lattazione c'è una maggior incidenza di questa patologia. Inoltre, sono stati esclusi gli animali che al primo controllo post parto avessero un rialzo cellulare in quanto potevano essere animali che non erano stati asciugati correttamente.

Per le sacche prelevate al fine di usare il lisato in asciutta sono stati selezionati animali con rialzi cellulari in lattazione e che però non avessero una storia di mastite cronica o ripetute mastiti cliniche in lattazione.

c) Prelievi di sangue in allevamento

Il prelievo è stato effettuato catturando le bovine selezionate in mangiatoia e contenendole ulteriormente con una capezza che aveva la funzione di tenere piegata la testa di lato per permettere il prelievo giugulare. La strumentazione utilizzata era composta da una apposita pinza per la compressione giugulare, betadine, rasoio monolama monouso, alcool, garze, sacche per la raccolta del sangue (massimo 450 ml; con anticoagulante citrato-fosfato- destrosio-adenina 1, CPDA1), bilancia portatile e capezza.

Dopo un'attenta rasatura del pelo e un'accurata disinfezione chirurgica con garze sterili imbevute nel betadine, veniva effettuato un prelievo sterile con una sacca apposita di circa 400 mL di sangue. La sacca veniva inoltre miscelata e pesata continuamente durante il prelievo per prevenire la formazione di coaguli di sangue per scarso contatto con l'anticoagulante e non compromettere le successive fasi

di produzione del lisato in laboratorio. Le sacche venivano chiuse ermeticamente tramite un doppio clampaggio, refrigerate ad una temperatura di +4°C e trasportate in laboratorio entro 24 ore per la lavorazione.

d) Dati sulla produzione di Lisato a partire dalle sacche di sangue

In totale sono state raccolte 251 sacche di sangue, di queste 26 sono state scartate dalla produzione perché risultate inidonee. In particolare 8 per la presenza di coaguli pre-processazione e 18 perché positive all'esame batteriologico.

Dalla lavorazione delle sacche idonee si sono ottenute complessivamente 1472 dosi (siringhe) di lisato. Tuttavia per rispettare il vicolo dell'uso autologo del lisato solo 1284 erano effettivamente utilizzabili dato che per trattare un quarto (sia in caso di mastite clinica che alla messa in asciutta) servono tre dosi/siringhe. Tutto ciò ha portato quindi ad uno "sfrido" di circa il 13% del lisato prodotto.

Il parametro di maggior interesse per la valutazione dell'efficienza del processo produttivo è la resa che si calcola facendo il rapporto tra il volume di concentrato piastrinico (PC) ed il volume di sangue (ml) prelevato all'animale. Massimizzare la resa è stato quindi un obiettivo importante del progetto e per questo sono stati effettuati degli approfondimenti per individuare le caratteristiche delle donatrici ideali.

La concentrazione piastrinica nel sangue intero rilevata dalle analisi effettuate sulle sacche raccolte è stata in media di 350.000 u/μl, con un minimo di 110.000 u/μl fino ad un massimo di 682.000 u/μl.

Dall'analisi statistica è emerso che la resa piastrinica è correlata positivamente concentrazione di piastrine nel sangue intero (Figura 1). All'aumentare quindi nel numero di piastrine nel sangue intero, ho una maggiore una resa piastrinica. Il parametro giorni in lattazione è invece correlato negativamente con la resa (Figura 2) e questo potrebbe dipendere dal fatto che la concentrazione di piastrine diminuisce con l'avanzare della lattazione (Figura 3). Complessivamente, la quantità di lisato piastrinico ottenuto in animali avanti con la lattazione risulta quindi minore rispetto alle bovine "fresche".

Per altri parametri zootecnici (ordine di parto, produzione di latte, stadio riproduttivo) ed ematici (concentrazione di globuli rossi e bianchi) dell'animale ed inclusi nella elaborazione, non sono state evidenziate correlazioni significative con la resa in lisato.

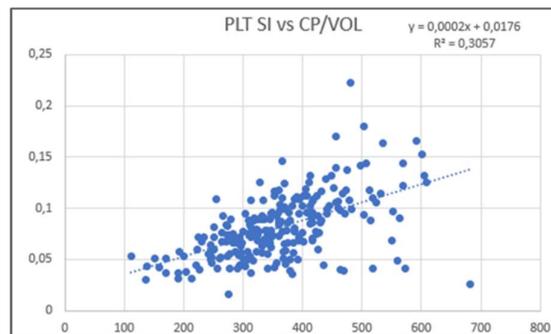


Figura 1. Correlazione tra la concentrazione di piastrine nel sangue intero e la resa in concentrato piastrinico.

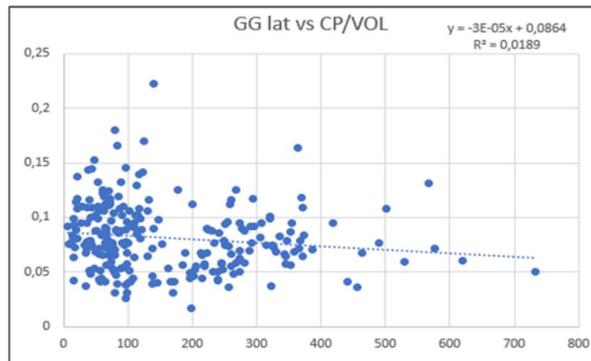


Figura 2. Correlazione tra la concentrazione di piastrine nel sangue intero e la resa in concentrato piastrinico

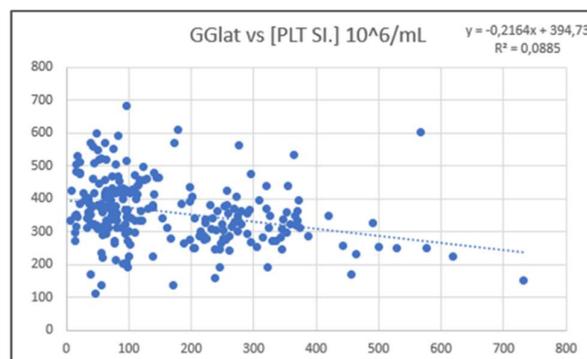


Figura 3. Correlazione tra giorni di lattazione della bovina e concentrazione di piastrine nel sangue intero.

e) Preparazione del lisato piastrinico in laboratorio.

La lavorazione di ogni sacca è stata eseguita presso il laboratorio dell'Istituto Zooprofilattico delle Venezie. Tale procedura, poiché non prevede un circuito chiuso, richiede l'utilizzo di una cappa a flusso laminare per garantire il più possibile l'ambiente sterile.

Prima di essere manipolate ciascuna sacca di sangue è stata sottoposta ad accurata pulizia e disinfezione esterna con soluzione Virkon per almeno 5 minuti.

La sacca veniva quindi appesa all'esterno della cappa e il tubino posizionato all'interno della cappa stessa, come illustrato in Figura 4.



Figura 4. Preparazione lisato piastrinico: fase di svuotamento della sacca di sangue intero in provette.

Il sangue intero è stato raccolto per gravità in provette sterili da 50 mL: ciascuna provetta è stata riempita per non più di 45 ml, per permettere un'adeguata separazione del plasma anche a bassa velocità (Figura 5).



Figura 5. Preparazione lisato piastrinico: fase di smistamento del sangue intero in provette

Una piccola aliquota di sangue intero è stata utilizzata per l'esecuzione dell'esame emocromocitometrico per determinare la conta piastrinica iniziale. L'analisi è stata eseguita con lo strumento automatizzato Sysmex XN 100 Vet.

Il sangue nelle provette è stato quindi sottoposto alla prima centrifugazione a bassa velocità per 10 min a 200 xg a 4 °C (con disattivazione della funzione del freno motore della centrifuga, per evitare la risospensione degli eritrociti durante la fase di frenata).

Al termine della prima centrifugazione si ottengono tre diverse frazioni (Figura 6): globuli rossi (ultimo strato, nel fondo), buffy coat (leucociti, nello strato intermedio) e PRP o plasma ricco di piastrine (strato più superficiale o surnatante).



Figura 6. Preparazione lisato piastrinico: prima centrifugazione lenta e separazione del sangue intero in tre frazioni, con ottenimento del PRP

Il surnatante, corrispondente al plasma ricco di piastrine o PRP, è stato quindi aspirato e trasferito mediante pipettatore automatico in provette sterili secondarie da 50 mL (Figura 7).

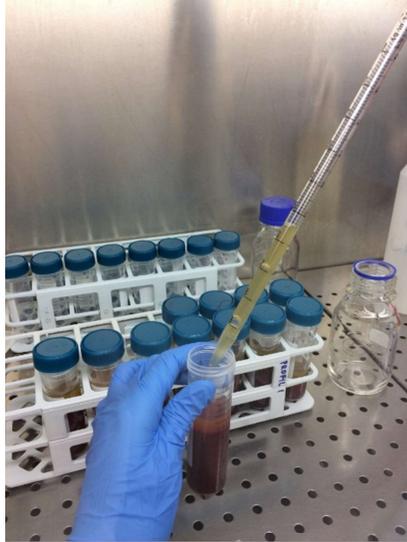


Figura 7. Preparazione lisato piastrinico: aspirazione del PRP

Un'aliquota di PRP è stata utilizzata per la conta piastrinica per una prima valutazione del processo di produzione.

Veniva poi eseguita la seconda centrifugazione, veloce, per 10 min a 1500 xg a 4 °C (con attivazione del freno motore). Al termine della seconda centrifugazione si ottiene un pellet di piastrine, o concentrato piastrinico (CP), e un sovrantante, che corrisponde nel plasma povero di piastrine o PPP (Figura 8).

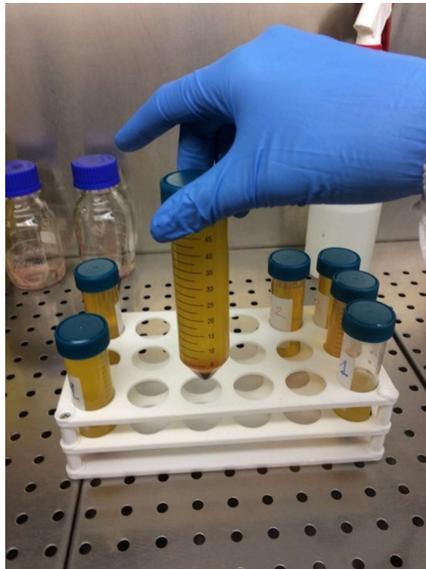


Figura 8. Preparazione lisato piastrinico: seconda centrifugazione per ottenere del concentrato piastrinico e del plasma povero di piastrine

Il PPP è stato aspirato, per circa 2/3 del volume, e raccolto in una bottiglia sterile. Il pellet (CP) è stato risospeso e, quello corrispondente alle provette derivanti dalla stessa sacca, è stato riunito in un'unica soluzione. È stata determinata la concentrazione piastrinica di ciascun CP e, riutilizzando

come medium il PPP stesso, la soluzione finale è stata diluita ad una concentrazione pari a $1,5 \times 10^9$ piastrine/ml.

Il CP è stato quindi aspirato in siringhe sterili da 5 mL, in modo da standardizzare il quantitativo di lisato per ogni dose (candeletta). L'ago è stato poi sostituito con beccuccio sterile per favorire la successiva somministrazione intramammaria (Figura 9).

Ciascuna siringa è stata identificata con numero di matricola dell'animale corrispondente e sottoposta a tre cicli di congelamento a -80°C e scongelamento a 37°C (2h) in modo da "rompere" le piastrine e favorire il rilascio dei loro fattori ottenendo così il lisato piastrinico.

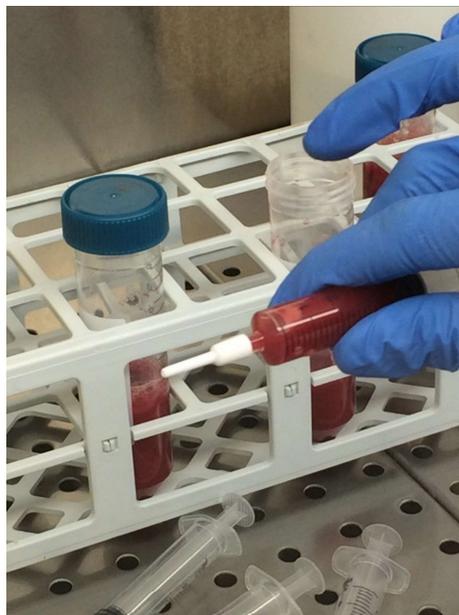


Figura 9. Preparazione lisato piastrinico: creazione di aliquote di CP in siringa con beccuccio.

A fine produzione, prima della consegna, è stata effettuata una prova di sterilità (Figura 10); le siringhe provenienti da sacche che sono risultate positive alla prova microbiologica sono state eliminate.

Le siringhe sono state infine conservate -20°C fino al loro utilizzo.

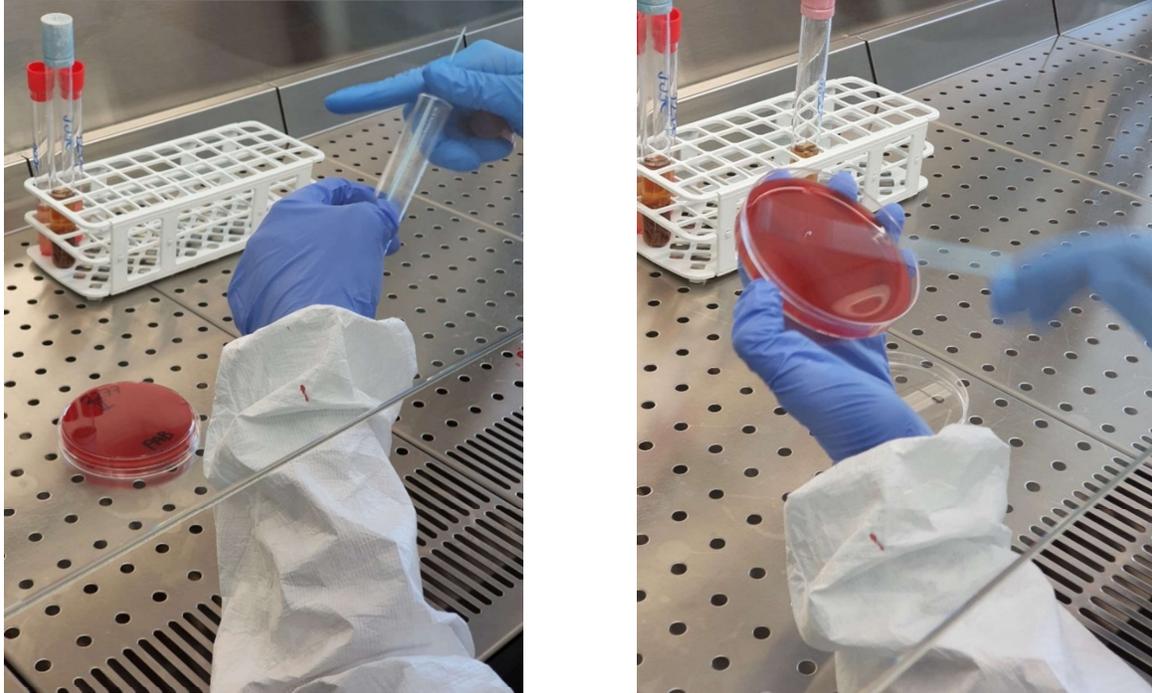


Figura 10. Preparazione lisato piastrinico: prova di sterilità microbiologica con semina del CP prodotto

Le siringhe di lisato non utilizzate in allevamento per il trattamento sono state utilizzate per la valutazione della conservabilità dei fattori piastrinici in esse contenute, comparandole a delle siringhe campione stoccate in laboratorio dopo la produzione. In particolare, sono stati valutati alcuni fattori di crescita e alcune citochine: EGF (epidermal growth factor), VEGF (vascular endothelium growth factor), PDGF-B (platelet-derived growth factor) e FGF (fibroblast growth factors) considerati i principali fattori, insieme a citochine e chemochine, responsabili degli effetti biologici del lisato piastrinico, come il TGF beta e l'interleuchina 6. Questi fattori sono stati misurati tramite kit ELISA, in particolare VEGF con RayBio®Bovine VEGF ELISA kit, EGF con MyBioSource EGF ELISA kit, bFGF con RayBio®Bovine bFGF ELISA kit, PDGF-B con NordicBioSite Bovine PDGF ELISA kit, TGF beta con Antibodies-online TGF-beta ELISA kit e Interleuchina6 con R&D System Bovine Il6 DUO set.

f) Conservabilità dei fattori di crescita del lisato piastrinico

Per la valutazione della conservabilità, le concentrazioni dei principali fattori di crescita (bFGF, VEGF, PDGF-B, EGF) sono state classificate secondo tre categorie, divise in base al tempo e alla temperatura di stoccaggio:

- A tempo 0: in candelette subito dopo la produzione stoccate a -80°C in laboratorio.
- Candelette raccolte dagli allevamenti stoccate a -20°C entro 79 giorni dalla consegna;
- Candelette raccolte dagli allevamenti stoccate a -20°C dopo gli 80 giorni dalla consegna.

Il risultato sulle concentrazioni dei fattori sono riportati nelle Tabelle 1, 2, 3 e 4. Relativamente al TGF beta e all'interleuchina 6, sono stati ottenuti dati al di sotto del valore di sensibilità analitica dei kit e i dati sono pertanto non valutabili.

bFGF (pg/ml)			
	Media	Min	Max
T0 -80°C	20.3	4.43	64.21
<80 GIORNI -20°C	19	6.98	69.81
≥80 GIORNI -20 °C	56.2	4.1	233.79

Tabella 1. Concentrazioni di bFGF al variare di tempo e temperatura.

VEGF (pg/ml)			
	Media	Min	Max
T0 -80°C	1.05	0.1	8.2
<80 GIORNI -20°C	0.39	0.1	1.4
≥80 GIORNI -20 °C	4.57	0.1	26

Tabella 2. Concentrazioni di VEGF al variare di tempo e temperatura.

PDGFB (ng/ml)			
	Media	Min	Max
T0 -80°C	1.43	0.855	2.5
<80 GIORNI -20°C	0.94	0.67	1.68
≥80 GIORNI -20 °C	1.32	0.9	3.22

Tabella 3. Concentrazioni di PDGF-B al variare di tempo e temperatura.

EGF (pg/ml)			
	Media	Min	Max
T0 -80°C	356	305.4	479

<80 GIORNI -20°C	364.6	332.6	509.9
≥80 GIORNI -20 °C	428	329	1000

Tabella 4. Concentrazioni di EGF al variare di tempo e temperatura.

L'analisi dei principali fattori nelle sacche ha mostrato una certa variabilità nelle concentrazioni sia per quanto riguarda i tempi di conservazione, sia per le temperature di stoccaggio. In generale, si osservano ampi intervalli di valori tra i minimi ed i massimi nei fattori analizzati ma con valori medi che, salvo nel caso di *outlier* sono tendenzialmente comparabili tra loro. Da questa prima valutazione, non sembrano esserci differenze riguardanti lo stoccaggio nel tempo tra le condizioni di campo (-20°C) e quelle ideali di laboratorio (-80°C), indicando che i fattori piastrinici non si degradano maggiormente se stoccati a -20°C, rispetto a -80°C.

g) somministrazione del lisato nei casi di mastite clinica

Il protocollo di trattamento per la mastite clinica prevedeva la somministrazione di 1 candeletta da 5 ml di lisato ogni 24 ore per tre giorni consecutivi.

Le mastiti venivano catalogate come mastiti cliniche di grado 1 o 2 a seconda della gravità. Grado 1 le mastiti che presentano alterazioni del latte come coaguli, alterazione del colore e della consistenza, grado 2 quando vi era anche risentimento della mammella come edema, dolore o aumento della temperatura. Le mastiti cliniche più gravi (grado 3), che presentavano sintomi generalizzati come febbre, calo ingestione, calo ruminazione e depressione dello stato del sensorio sono state escluse dal trattamento sperimentale e hanno seguito una terapia antimicrobica standard secondo la prassi aziendale e il consiglio del veterinario di riferimento.

La somministrazione veniva eseguita alla fine della mungitura dopo avere svuotato bene e a mano il quarto senza effettuare la trazione con la mungitrice. Successivamente veniva eseguita una attenta disinfezione con alcol dell'apice e dello sfintere del capezzolo e dopo avere eseguito le procedure igienica veniva inserita nello sfintere del capezzolo l'ago intramammario per un terzo della sua lunghezza così da evitare eccessive contaminazioni. Una volta somministrato il lisato è stato spinto dal capezzolo alla cisterna della mammella e poi massaggiato il quarto per favorire la distribuzione. La procedura descritta per la corretta applicazione del lisato non è esclusiva di questo prodotto ma è fondamentale per tutti i prodotti da somministrare per via intracanalicolare. Quindi non ci sono complicazioni operative rispetto all'antibiotico.

La conservazione delle siringhe è avvenuta in congelatore a -18°C e chiaramente prima della somministrazione andavano scongelate senza però eccessivi sbalzi termici o immergendole in acqua. Per quanto riguarda i casi controllo, ossia trattati con antibiotico la scelta del farmaco è stata fatta in base alle indicazioni del veterinario aziendale.

Una volta identificato il problema l'allevatore provvedeva, prima del trattamento, ad eseguire un campione di latte sul quarto colpito per l'esecuzione dell'esame batteriologico (conservato a -18°C) e uno destinato alla determinazione delle cellule somatiche totali. Successivamente veniva effettuato un doppio campione di latte a 7, 14 e 30 giorni post trattamento, di cui uno destinato all'esame microbiologico, e un secondo campione all'analisi delle cellule somatiche totali e differenziali (conservato a +4°C). L'andamento clinico del quarto mastitico veniva monitorato con la stessa cadenza dei prelievi.

In base al decorso clinico post trattamento i casi sono stati distinti in:

- migliorati: remissione dei sintomi iniziali tipici della mastite,
- non migliorati: mantenimento del quadro clinico-sintomatologico iniziale o peggioramento,

- recidivi: dopo un iniziale miglioramento il quarto trattato sviluppava nuovamente sintomatologia entro i 30 giorni di monitoraggio.

Durante il corso della prova sperimentale sono stati trattati 81 casi di mastite clinica di cui 35 con lisato piastrinico e 46 con antibiotico intramammario.

In base al decorso clinico post trattamento i casi con remissione dei sintomi sono stati 38 fra i casi trattati con antibiotico e 25 fra i casi trattati con LP, i casi con mantenimento del quadro clinico iniziale erano 4 fra i casi trattati con antibiotico e 8 fra i casi trattati con LP, quelli recidivati 4 fra i casi trattati con antibiotico e 2 fra quelli trattati con LP (tabella 5).

Andamento clinico:	Trattamento con antibiotico		Trattamento con lisato piastrinico	
	n. casi	%	n. casi	%
Migliorato	38	82,6%	25	71,4%
Non migliorato	4	8,7%	8	22,9%
Recidiva	4	8,7%	2	5,7%

Tabella 5. Andamento clinico dei casi trattati: comparazione fra antibiotico e lisato piastrinico

Considerando le ultime due categorie di casi (non migliorata e recidiva) come i “fallimenti” del trattamento si è potuto constatare come il tasso di insuccesso terapeutico sia del 17% per quanto riguarda il caso controllo (Antibiotico) e del 29% per quanto riguarda il caso studio (Lisato). Pur essendo più elevata la percentuale nel trattamento con lisato piastrinico, all’analisi statistica non vi è una differenza significativa tra i due gruppi (*p-value* 0,35). Va ricordato come nella maggior parte dei quarti trattati che non sono migliorati o hanno recidivato, per entrambe le tipologie di trattamento, avevano un’infezione causata da patogeni primari: come *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* e *Enterococcus spp.* (Figura 11) Questi microbi sono storicamente spesso difficili da combattere anche con la terapia standard a base di antimicrobico e probabilmente questo tipo di positività batteriologica ha complicato l’esito del trattamento con il lisato.

Figura 11. Risultati esami microbiologici effettuati sui casi di mastite clinica: suddivisione degli agenti eziologici in funzione del gruppo sperimentale di appartenenza degli animali: antibiotico (A) o lisato piastrinico, (LP).



Figura 11. Risultati esami microbiologici effettuati sui casi di mastite clinica: suddivisione degli agenti eziologici in funzione del gruppo sperimentale di appartenenza degli animali: antibiotico (A) o lisato piastrinico, (LP).

La stessa situazione si è evidenziata in generale nei trattamenti clinici (grafico 1). Più della metà dei casi positivi a patogeni Gram + (tra cui quelli citati in precedenza) appartenevano a bovine trattate con lisato piastrinico. All'opposto invece molti dei casi poi risultati negativi all'esame batteriologico appartenevano a casi di mastite gestiti con l'antimicrobico. Questo è dovuto dal fatto che il trattamento veniva eseguito alla cieca senza conoscere la natura dell'infezione. Ciò avviene a discapito di una scelta oggettiva e mirata del tipo di trattamento che offre le maggiori possibilità di successo contro una determinata infezione, dato che l'esito dell'analisi microbiologica sul latte è disponibile solitamente 3-4 giorni dopo il campionamento. Ancora più tempo richiede normalmente l'esito della MIC (Concentrazione Minima Inibente) per valutare le resistenze del patogeno ai principi attivi disponibili sul mercato. Nella tesi lisato sono stati selezionati animali con problemi precedenti, e questo ha probabilmente determinato l'inclusione nella ricerca di un maggior numero di bovine suscettibili a questa patologia; anche questo rappresenta un bias del trattamento autologo.

Viste queste premesse si è poi andati a valutare il decorso della situazione microbiologica dei quarti monitorati a una settimana dal trattamento, considerando i casi che erano migliorati clinicamente. In base all'esito batteriologico a 7 giorni sono state definite 4 classi di andamento:

- Negativo: caso parte negativo e resta negativo nei successivi 3 controlli
- Nuova infezione: caso parte negativo ma al controllo del settimo giorno 7 giorni è positivo senza manifestare sintomi clinici
- Positivo: caso parte positivo e resta positivo pur senza manifestare sintomatologia al controllo del settimo giorno
- Risanato: caso che inizialmente è positivo e diventa negativo

A 7 giorni post trattamento non si è rilevata una differenza statisticamente significativa sia per i casi rimasti positivi che per i casi risanati nelle due tesi di studio (tabella 2). A livello microbiologico non vi è differenza tra l'uso del lisato e l'antibiotico.

	Trattamento con antibiotico	Trattamento con lisato piastrinico
Esame batteriologico al 7° giorno:	% dei casi	
Negativo	50,0%	37,5%
Nuova infezione	0,0%	4,2%
Positivo	26,3%	37,5%
Risanato	23,7%	20,8%

Tabella 6: Risultati esami microbiologici a 7 giorni post trattamento in caso di mastite clinica

Nel post trattamento sono state monitorate anche le cellule somatiche per avere un quadro completo della remissione della mastite anche sotto il profilo infiammatorio. Non in tutte le aziende si utilizzano le stesse candele di antibiotico, in alcune vengono prescritte candele che presentano in associazione all'antibiotico dell'antinfiammatorio intramammario. Per questo motivo non vi è stato un confronto solo tra lisato e antibiotico ma è stata creata una ulteriore classe "antibiotico + antinfiammatorio" per saggiare l'efficacia del trattamento combinato.

Valutando l'andamento delle cellule somatiche totali dopo il trattamento (tabella 7) si può notare come il risultato migliore nell'abbassamento delle cellule somatiche sotto la soglia della 200.000/ml si è ottenuto con il trattamento combinato antibiotico+antinfiammatorio, segno che quest'ultimo ha comunque un ruolo molto importante nel raggiungimento di valori utili a definire la mammella come sana. I casi trattati con lisato hanno presentati valori di SCC medi più elevati in particolare nella prima settimana dal trattamento; le cellule diminuiscono più lentamente portandosi su valori più simili a quelli del trattamento antibiotico ai controlli successivi (14 e 30 giorni).

Valori più elevati di cellule somatiche nella tesi lisato dopo 7 giorni dal trattamento non sono correlabili ad un aumento delle nuove infezioni o ad una minor incidenza dei risanamenti quanto piuttosto sono una conseguenza intrinseca del prodotto che stimola la risposta infiammatorio acuta richiamando leucociti dal torrente circolatorio. Benché vi sia un aumento del conteggio cellulare è stato riscontrato un aumento delle nuove infezioni nella tesi lisato a 30 giorni post trattamento questo evidenzia che benché vi sia una maggior risposta infiammatoria non è sufficiente per proteggere la mammella da nuove infezioni. Chiaramente anche l'antibiotico non ha un'azione protettiva a lungo termine visto che la sua azione si esaurisce nei 3-5 giorni post trattamento.

Tabella 7: Percentuali di casi con cellule somatiche inferiori a < 200.000 ml a 7, 14, 30 giorni post trattamento nei tre gruppi studio. Lettere diverse poste in apice indicano una differenza significativa con probabilità di errore inferiore al 5%

	Lisato Piastrinico	Antibiotico	Antibiotico+ antinfiammatorio
	% di casi con cellule somatiche < alle 200.000/ml		
Giorni dal trattamento:			
7	8,3 ^b	18,2 ^{ab}	43,8 ^a
14	22,7 ^b	40,0 ^{ab}	66,7 ^a
30	30,4 ^b	50,0 ^{ab}	73,3 ^a

h) somministrazione del lisato alla messa in asciutta delle bovine

Nel progetto sono stati trattati alla messa in asciutta 152 casi con antibiotico mentre con Lisato Piastrinico 101 quarti.

Durante la sperimentazione dodici vacche sono state eliminate dallo studio per positività ad agenti contagiosi. Sette animali invece, a trattamento avvenuto, sono stati riformati dagli allevatori per problematiche non legate alla salute della mammella; quindi, non è stato possibile il monitoraggio nel postparto.

Nella Figura 12 è possibile vedere l'andamento medio delle cellule somatiche a T0 (campione preparto), T15 (15 giorni post-parto) e T30 (30 giorni dopo il parto) sui singoli quarti. I trattamenti con antibiotico e lisato hanno mostrato un andamento analogo, andando ad abbassare di 2 punti il linear score (LS) a T30, nonostante l'azione dell'antibiotico porti ad un abbassamento più repentino.

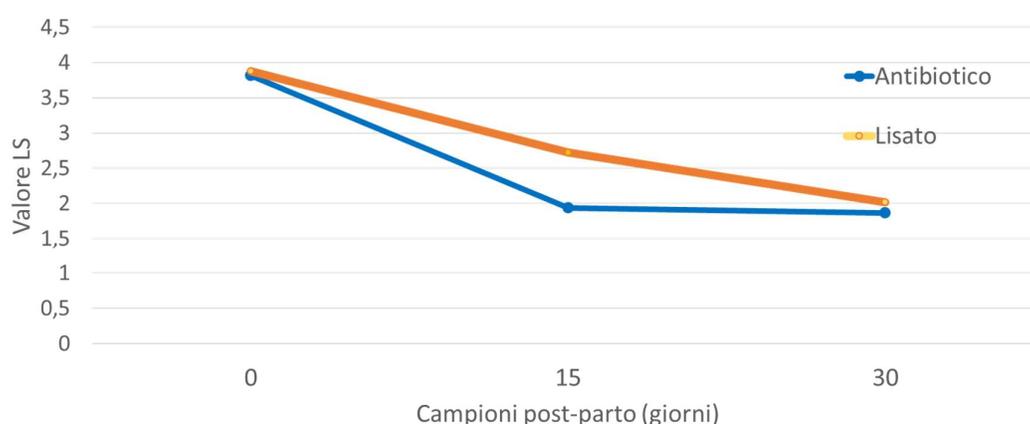


Figura 12. Rappresentazione dell'andamento delle cellule somatiche, espresse come linear score, per i casi trattati con antibiotico o lisato piastrinico.

La casistica è stata successivamente analizzata considerando numero di cellule somatiche rilevate al momento della messa in asciutta (T0) e ripartita in tre classi la prima ha considerato i quarti con cellule somatiche inferiori a 200.000 u/ml (quarti sani); la seconda animali con cellule comprese tra 200.000 u/ml e 400.000 u/ml (classe a rischio medio di mastite in posto parto); la terza animali con cellule superiori a 400.000 u/ml (classe a forte rischio mastite in post parto). Per ogni classe è stato poi comparato l'effetto del lisato piastrinico e quello dell'antibiotico. Gli stessi casi sono stati poi valutati nuovamente 14 giorni dopo il parto e attribuiti eventualmente alla nuova classe di appartenenza e in base al trattamento ricevuto.

Per quanto riguarda la prima classe (<200.000 SCC), il tasso di successo nel post-parto risulta nel complesso equiparabile tra antibiotico e lisato piastrinico. Nella maggior parte dei casi trattati sia per il lisato (82%) che per l'antibiotico (86%), le cellule somatiche totali all'inizio della lattazione successiva rimangono sotto la soglia delle 200.000 per ml (Figura 13). Nel resto della casistica si osserva un rialzo cellulare rispetto al preparto (>200.000 u/ml) evidenziando in modo aspecifico un aumento dell'infiammazione del tessuto mammario. Questo peggioramento è particolarmente evidente in un numero ridotto di casi sia per LP (6,67%) che per antibiotico (7%) nei quali le SCC

superano le 400.000 u/ml (valore soglia considerato legalmente per la commercializzazione del latte di massa aziendale).

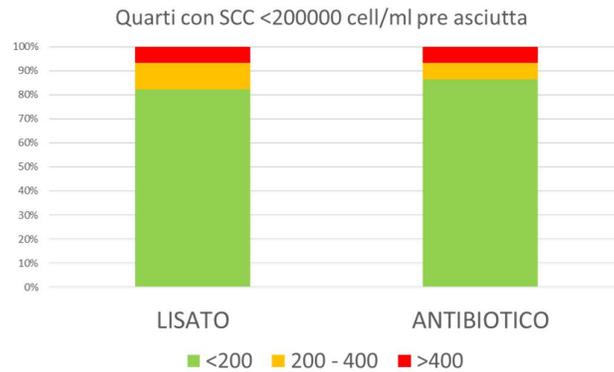


Figura 13: Andamento delle cellule somatiche nel post-parto in quarti con cellule somatiche alla messa in asciutta <200.000 ml e trattate con lisato o antibiotico.

Nella seconda classe (tra 200.000 e 400.000 cell/ml) le percentuali si discostano leggermente tra trattamenti senza tuttavia raggiungere la significatività statistica (Figura 14). Nel complesso sia il lisato (80%) che l'antibiotico (85,71%) portano ad un significativo abbassamento delle cellule somatiche (<200.000 u/ml) alla lattazione successiva.

Circa il 7% dei casi, per entrambi i trattamenti, non mostra variazioni tra inizio asciutta e nuova lattazione mantenendosi tra le 200.000 e le 400.000 cell/ml. Nei restanti quarti trattati invece si assiste ad un aumento (>400.000 u/ml) delle cellule somatiche sia nel gruppo lisato (13,33%) che nel caso di terapia antibiotica (7.14%).

Nonostante queste differenze, dal punto di vista statistico possiamo affermare che non c'è nessuna differenza tra i due gruppi sperimentali ($P > 0,05$).

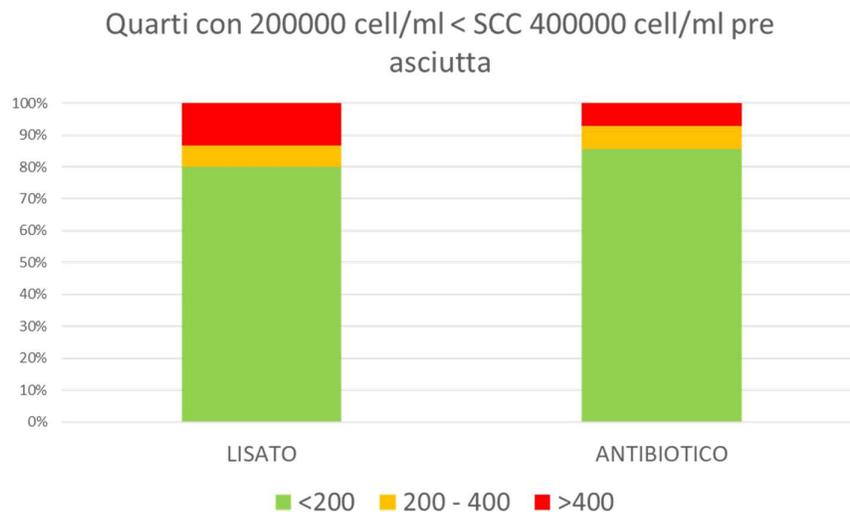


Figura 14: Andamento delle cellule somatiche nel post-parto in quarti con cellule somatiche alla messa in asciutta comprese tra 200.000 e 400.000 ml e trattate con lisato o antibiotico.

Nella terza classe (>400.000 cell/ml) invece la differenza tra trattamenti è significativa (Figura 15) . La percentuale di quarti che raggiungono valori di cellule somatiche sotto la soglia delle 200.000 per ml) nella lattazione successiva è pari al 95,2% mentre per il lisato questa percentuale si ferma al 57,7%. Per il Lisato si registra comunque un miglioramento (passaggio alla classe tra 200.000 e 400.000 di cellule per ml) rispetto al preparto (15,4%). Il valore più elevato delle cellule somatiche post parto non sembra essere correlato a positività microbiologiche (CNS, Corynebacterium).

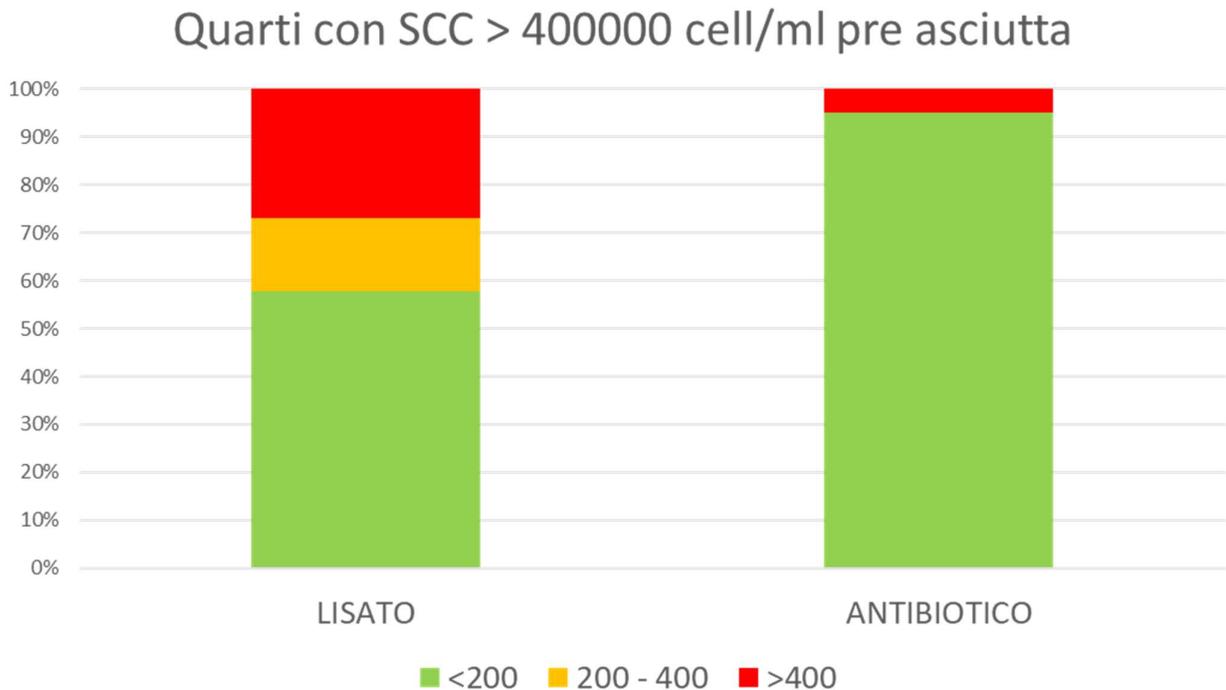


Figura 15: Andamento delle cellule somatiche nel post-parto in quarti con cellule somatiche alla messa in asciutta superiori a 200.000 e 400.000 ml e trattate con lisato o antibiotico.

Conclusioni

- È necessario continuare a lavorare sul metodo produzione del lisato per migliorare la resa e diminuire il tasso di manualità del processo. Dall'analisi della bibliografia inoltre emerge anche la possibilità di lavorare con altri prodotti delle piastrine utilizzabili in zootecnica anche in contesti diversi da quello del problema mastite
- È importante lavorare anche sul fronte delle conoscenze relative alla composizione del lisato Piastrinico per valutare come cambia la sua composizione;
- Le valutazioni sulla conservabilità dei fattori di crescita ed il loro stoccaggio non hanno evidenziato effetti del periodo di conservazione e della modalità di conservazione (-80°C in laboratorio vs -20°C in allevamento) rendendo ragionevole l'ipotesi che si trattasse di un prodotto con caratteristiche di buona stabilità
- Gli incoraggianti risultati ottenuti con il trattamento alla messa in asciutta spingono nella direzione di testare protocolli di utilizzo in azienda che portino ad una riduzione del numero di interventi. In definitiva un solo trattamento per quarto aumentando la concentrazione della singola siringa.
- Più complesso risulta l'uso del lisato nel trattamento della mastite clinica, dato che il successo del trattamento è condizionato dalla tipologia di patogeno. In assenza di test rapidi utili a identificare l'agente eziologico, è difficile stilare un protocollo standard di utilizzo del lisato senza correre il rischio di generare un problema permanente al quarto colpito.
- L'entrata in vigore della nuova normativa comunitaria sul farmaco (Gennaio 2022) ci induce a pensare che sarà a breve possibile utilizzare il lisato anche con modalità eterologa entro azienda. Questo comporterà con notevoli vantaggi sia per la produzione in laboratorio (minori sfridi e semplificazione della procedura) ma soprattutto in allevamento per la praticità di utilizzo.