



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PERUGIA
DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA
Corso di Laurea in Medicina Veterinaria (LM42)



TESI DI LAUREA

**INNOVAZIONE DEL TRATTAMENTO DELLE FERITE NEL
CANE: IL DISPOSITIVO ALL-IN-ONE one VET. STUDIO
PRELIMINARE**

**INNOVATION OF CANINE WOUND MANAGEMENT: AN
ALL-IN-ONE DEVICE one VET. PRELIMINARY STUDY**

Settore Scientifico Disciplinare VET07

Laureando

Sig.na Silvia Miglietta

Relatore

Prof.ssa Giorgia della Rocca

Co- Relatore

Dott.ssa Fiorella Carnevali

Anno Accademico
2013-2014

Ai miei genitori

SOMMARIO

RIASSUNTO	5
ABSTRACT	6
INTRODUZIONE.....	7
ANATOMIA CUTANEA.....	9
1.1 Epidermide	11
1.2 Derma	15
1.3 Ipoderma.....	16
1.4 Vasi e nervi.....	16
1.5 Annessi cutanei.....	17
1.5.1 Ghiandole cutanee	17
1.5.2 Peli	19
1.5.3 Produzioni cornee	21
2. LE FERITE CUTANEE: CLASSIFICAZIONE, FISIOPATOGENESI E TRATTAMENTO.....	22
2.1 Classificazione delle ferite	23
2.2 Altre lesioni cutanee di nostro interesse.....	26
2.3 Fisiopatologia della guarigione delle ferite	37
2.3.1. Fattori che influenzano la guarigione delle ferite	42
2.3.2. Patologie della cicatrizzazione.....	45
2.4. Trattamento delle ferite (wound care and wound management).....	47
2.4.1 Protocollo di wound management	50
3. NEEM (Azadirachta Indica)	61
3.1 Caratteristiche botaniche	62
3.2 Costituenti chimici e loro attività farmacologica	63
3.3 Applicazioni nel settore agrochimico	68
3.3.1 Tossicità ambientale	69
4. HYPERICUM PERFORATUM (ERBA DI SAN GIOVANNI).....	70
4.1 Caratteristiche botaniche	71
4.2 Costituenti chimici e loro attività farmacologica	72
5. MIX 557/1 Primary Wound Dressing®/ one VET	79

5.1 Studi sperimentali	83
6. PARTE SPERIMENTALE	95
6.1 MATERIALI E METODI	95
6.1.1 Reclutamento e raccolta dati dei pazienti	95
6.1.2 Classificazione delle lesioni	99
6.1.3 Protocollo di trattamento delle lesioni	99
6.1.4 Raccolta dati	101
6.2 Risultati	104
6.3 Discussione e Conclusioni.....	133
BIBLIOGRAFIA	138
SITOGRAFIA	162

RIASSUNTO

Uno degli obiettivi che ad oggi spinge verso la continua innovazione in campo medico-scientifico è la necessità di ricercare nuove sostanze caratterizzate da tossicità limitata, associate ad un rischio ridotto di induzione di antibiotico-resistenza. Questa necessità ha aperto le porte alla fitoterapia, dal greco phyton (pianta) e therapeia (cura).

Gli studi sulle sostanze naturali hanno messo in luce le proprietà terapeutiche di molte piante tra le quali il Neem (*Azadirachta indica*) e l'Iperico (*Hypericum perforatum*), entrambi caratterizzati da un potenziale anti-infiammatorio, antimicrobico e coadiuvante la cicatrizzazione. Utilizzando l'estratto oleoso dei semi del primo e le sommità fiorite del secondo, nasce one VET (European Patent: EP 48211/BE, 2008), prodotto da due ricercatori dell'ENEA nell'ambito dell'impiego di sostanze naturali ad attività antiparassitaria nei confronti di alcune ectoparassitosi.

Studi approfonditi sul medicamento hanno dimostrato le proprietà cicatrizzanti, biocide e repellenti che favorirebbero il perfetto svolgimento dei processi chimico-istologico-cicatrizziali nell'ambito della guarigione delle ferite.

Nel presente elaborato vengono riportati i dati di uno studio volto a valutare l'efficacia del prodotto fitoterapico one VET nella biostimolazione della riparazione di lesioni cutanee, di diversa natura, nel cane, senza uso di disinfettanti/antimicrobici anche in condizioni igienico-sanitarie scadenti.

La prova ha previsto l'impiego di sei soggetti reclutati nel parco canile E.N.P.A. loc. Collestrada, per un totale di 17 ferite sulle quali è stato valutato, a seguito dell'applicazione giornaliera di one VET: l'aspetto clinico, il decorso, la contrazione dell'area cicatrizziale (SER), il Time To Heal (TTH) e le modificazioni della popolazione microbica prevalente.

I risultati hanno evidenziato che utilizzando il protocollo ALL-IN-ONE di one VET, il 76,47% delle lesioni, guarisce in un tempo tre volte inferiore al periodo di persistenza (4 mesi circa), senza necessità di utilizzare disinfettanti/antimicrobici locali, notoriamente istolesivi.

ABSTRACT

The need to research new substances characterized by low toxicity and reduced risk of inducing antibiotic resistance is one of the aims currently leading toward a constant innovation in medical and scientific areas. This necessity has opened the door to herbal medicine.

The studies on natural substances drew attention to the therapeutic properties of several plants such as Neem (*Azadirachta indica*) and Iperico (*Hypericum perforatum*), both characterized by anti-inflammatory and antimicrobial properties in addition to promoting wound healing.

one VET (European Patent: EP 48211/BE, 2008) is a mixture of oily extract of Neem's seeds and *Hypericum's* flowering ends, produced by two ENEA's researchers in order to obtain a natural pesticide substance. In-depth studies showed the medicament's biocidal, repellent and healing effects promoting the development of chemical-histological and healing processes in wound healing.

The aim of this work is to investigate one VET's efficacy in biostimulating cutaneous wound healing in dogs, without the use of disinfectants or antimicrobials also in poor sanitary conditions.

The trial was carried out on 6 dogs from the Collestrada's kennel presenting 17 cutaneous wounds. Clinical appearance, clinical progress, epithelialization rate, time to heal and changes in the microbial population were evaluated during the trial.

The results obtained showed that using ALL-IN-ONE one VET, in 76.47% of the lesions healing time was three times inferior to the period of persistence (around four months) without the need for local disinfectants/antimicrobials, notoriously histolesive.

INTRODUZIONE

L'innovazione rappresenta la tensione evolutiva, su cui si basa la ricerca scientifica, che ci guida verso il miglioramento e rinnovamento di ciò che è noto, di ciò che già conosciamo.

Nel nostro caso poniamo l'attenzione sul *wound care*, inteso come cura e management delle ferite. Approccio in continua evoluzione, esso rappresenta una sfida in campo medico, data la possibilità di adottare diversi protocolli operativi in base alla tipologia della lesione considerata.

La cicatrizzazione è un complesso processo influenzato da diversi fattori quali: l'entità della perdita di sostanza, il grado di contaminazione batterica e lo stato del tessuto peri-lesionale. I primi passi verso la rivoluzione del concetto di guarigione delle ferite sono stati mossi nel 1962, quando George Winter introdusse il concetto di "*moist wound healing*" o guarigione umida della ferita. L'evoluzione progressiva di questa idea, portò fino alla creazione di quelli che oggi sono dei veri e propri dispositivi che funzionano da coadiuvanti della cicatrizzazione e garanti del mantenimento di un ambiente idoneo alla riparazione tissutale; facciamo riferimento a medicazioni avanzate che interagiscono con la ferita e non si limitano solamente a svolgere un compito di protezione dall'ambiente esterno.

Un altro importante obiettivo, che ad oggi spinge verso l'innovazione in ambito medico-scientifico, è la necessità di ricercare nuove sostanze caratterizzate da tossicità limitata associate ad un rischio ridotto di induzione di antibiotico-resistenza. Questo ha aperto le porte alla fitoterapia dal greco *phyton* (pianta) e *therapeia* (cura).

Gli studi sulle sostanze naturali hanno messo in luce le proprietà terapeutiche di molte piante tra le quali il Neem (*Azadirachta indica*) e l'Iperico (*Hypericum perforatum*), entrambi caratterizzati da un potenziale anti-infiammatorio, antimicrobico e coadiuvante la cicatrizzazione. Utilizzando l'estratto oleoso dei semi del primo e le sommità fiorite del secondo, nasce one VET (European Patent: EP 48211/BE, 2008). Il medicamento è stato prodotto ed utilizzato, per la prima volta, in occasione di una sperimentazione condotta dall'ENEA con lo

scopo di impiegare sostanze naturali ad attività antiparassitaria negli animali da fibra, rivelando sorprendenti proprietà repellenti e cicatrizzanti verso lesioni esterne di qualunque estensione e natura.

Diversi studi successivi hanno confermato queste potenzialità che favorirebbero il perfetto svolgimento dei processi chimico-istologico-cicatrizziali, con formazione in tempi rapidi del tessuto di granulazione, dalla qualità del quale dipende non solo la guarigione ma anche la formazione di una buona cicatrice. L'efficacia terapeutica, valutata attraverso diversi studi in ambito veterinario, ha portato all'utilizzazione del prodotto anche in medicina umana nel trattamento di lesioni acute e croniche con risultati sorprendenti che hanno valso, per il medicamento, il premio Frost and Sullivan come miglior prodotto dell'anno 2011 al Convegno Europeo EWMA (Bruxelles).

Nel presente elaborato di tesi vengono riportati i dati di uno studio volto a valutare l'efficacia del presidio fitoterapico one VET come dressing primario nella biostimolazione della riparazione di lesioni cutanee di diversa natura nel cane, senza uso di disinfettanti/antimicrobici anche in condizioni igienico-sanitarie scadenti.

ANATOMIA CUTANEA

L'apparato tegumentario è costituito dalla cute e suoi annessi quali ghiandole, peli e produzioni cornee. La prima riveste tutta la superficie corporea continuandosi a livello delle giunzioni muco-cutanee come quella oculo-congiuntivale, orale, nasale, vulvare/prepuziale, anale andando a rivestire anche il tratto dell'orecchio esterno, compresa la superficie esterna del timpano. La cute è l'organo più grande del corpo, rappresentando circa il 15% dell'intero organismo. L'estensione totale della superficie cutanea può variare da 4m² nel cavallo ai 0.25 m² nel gatto e tra 1,5 e 2,0 m² nell'uomo.

Per quanto riguarda lo spessore, anch'esso risente di differenze specie specifiche oltre che legate al sesso e alla regione anatomica ed è più consistente nelle aree maggiormente esposte a traumatismi; la pigmentazione infine può essere o meno presente.

Da un punto di vista funzionale, la cute fornisce una valida protezione contro gli agenti fisici, chimici e batterici; la barriera fisica è rappresentata prevalentemente dallo strato corneo, mentre la protezione verso insulti chimici e biologici è data da lipidi, enzimi idrolitici e peptidi ad azione antimicrobica (Proksch et al., 2008). Riguardo questi ultimi, è ormai validata la presenza della *defensina*, un peptide cationico a basso peso molecolare, prodotto dai cheratinociti. Il gene responsabile della sua produzione, viene trascritto in risposta a processi infiammatori indotti dall'azione dei microrganismi patogeni, verso i quali, la *defensina*, mostra un potenziale antimicrobico, distruggendone la membrana cellulare (Gallo et al., 2002); infine favorisce la chemiotassi leucocitaria. Un deficit nell'espressione genica di questa molecola determina un aumento della suscettibilità alle infezioni cutanee (Wingate et al., 2008).

Anche le molecole lipidiche svolgono un ruolo antibatterico di rilievo, contribuendo a determinare una parte imprescindibile della risposta immunitaria cutanea. Gli acidi grassi liberi, presenti nello strato corneo, mostrano attività contro i Gram-positivi e negativi, i microrganismi maggiormente sensibili sono *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogenes*, *Staphylococcus epidermidis* e *Micrococchi sp.* In particolare è stato visto che l'acido sapienico (16:1ω10),

prodotto dalle ghiandole sebacee, in combinazione con basse concentrazioni di etanolo, è efficace contro ceppi meticillino-resistenti di *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Drake et al., 2011). I meccanismi d'azione sono differenti. I FFAs (Free Fatty Acids) insaturi, grazie alla loro particolare struttura chimica, possono inserirsi nella membrana cellulare batterica aumentandone fluidità e permeabilità, rendendola così instabile e facilmente predisposta a rotture; possono legarsi ai carriers deputati al trasporto ionico trans-membrana, riducendo questo meccanismo e il processo di produzione dell'ATP che ne consegue. E' stato ipotizzato, infine, che questi due meccanismi d'azione agiscano di concerto ai fini della menomazione dell'up-take dei nutrienti da parte del batterio (Desbois, 2010).

La cute resiste a traumi di lieve entità grazie alle sue caratteristiche di elasticità e resistenza, possiede elevata sensibilità dovuta alla presenza di recettori atti alla codifica di informazioni di natura tattile, termica e dolorifica, funge da strumento per la termoregolazione e infine svolge funzione endocrina permettendo la trasformazione della provitamina D sotto l'azione dei raggi UV.

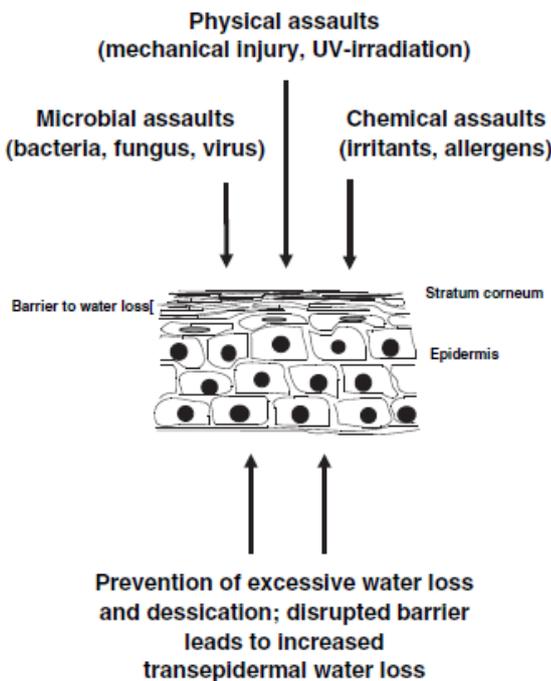


Figure 1. Functions of the epidermal 'inside-outside' and 'outside-inside' barrier.

Fig.1: il ruolo funzionale della cute (Proksch et al., 2008).

Anatomicamente possiamo distinguere uno strato cutaneo più superficiale, *l'epidermide*, e uno più profondo, *il derma* (Beghelli et al., 2006).

1.1 Epidermide

Si divide in diversi strati che, procedendo dall'alto verso il basso, sono: lo strato cheratinizzato, lucido, granuloso, spinoso, basale.

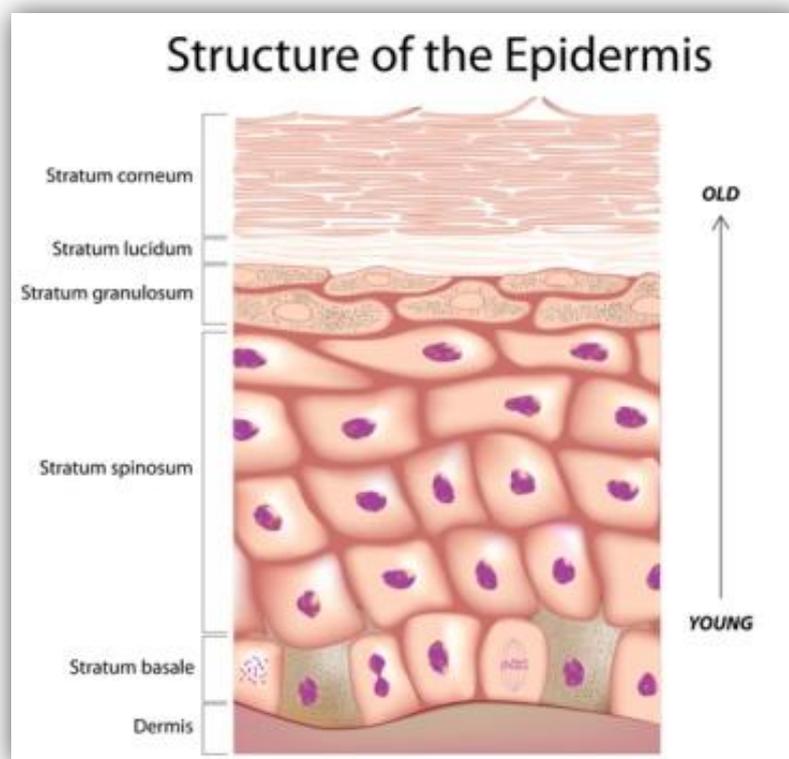


Fig.2: i diversi strati che costituiscono l'epidermide (www.coloradoskinadvein.com).

- ~ **Strato cheratinizzato o corneo:** rappresenta la principale barriera contro la penetrazione di agenti chimici e biologici, inoltre è in grado di resistere alle forze meccaniche. È costituito da numerosi piani di cellule sovrapposte morte (corneociti), strettamente imbricate che, partendo dallo strato basale fino ad arrivare in superficie, hanno completato il loro differenziamento (citomorfo) trasformandosi in “cellule” cornee. Il loro citoplasma è completamente occupato da tonofilamenti di cheratina

immersi in materiale amorfo, la membrana cellulare rappresenta l'elemento più resistente a fronte del suo aumentato spessore e della presenza di numerosi ponti disolfuro, che rappresentano la struttura base dei corneodesmosomi.

All'interno dello strato corneo troviamo monomeri di *filaggrina*, proteina filamento che si lega alla cheratina. Questi monomeri sono incorporati nell'involucro lipidico epidermico, prodotto dai corpi lamellari dello strato granuloso, con funzione di barriera della pelle. È stato dimostrato che una disfunzione coinvolgente l'espressione della filaggrina può essere alla base dei diversi disturbi atopici (dermatite atopica, asma, rinite allergica ed allergie ai cibi) (Proksch et al., 2008).

Gli strati più superficiali dello strato corneo, anche detti *disgiunti*, tendono a staccarsi frammentandosi in placche o squame di diversa dimensione. Lo spessore a tale livello è direttamente proporzionale alle sollecitazioni meccaniche ed è più consistente in quelle regioni anatomiche dove la copertura pilifera risulta assente o ridotta.

- ~ **Strato lucido:** si rinviene soltanto nelle zone in cui la pelle è ispessita e glabra, fornisce una barriera contro l'evaporazione e rende impermeabile la pelle. E' formata da due/tre lamine di cellule appiattite, prive di nucleo e con un citoplasma costituito da tonofilamenti e granuli translucidi di *eleidina*, precursore della cheratina.

- ~ **Strato granuloso:** presenta due/tre file di cellule allungate, appiattite con nucleo picnotico. Il citoplasma contiene granuli di cheratoialina, di dimensioni variabili e i *corpi lamellari*, prodotti dall'apparato del Golgi. Nei granuli dei corpi lamellari rinveniamo fosfolipidi, colesterolo e glicolipidi insieme ad enzimi idrolitici. Questi agiscono sui fosfolipidi e fosfogliceridi per produrre ceramide, colesterolo e acidi grassi liberi, che andranno a rappresentare i principali lipidi dello strato corneo con funzioni protettive ed antibatteriche. Quando il contenuto dei corpi lamellari viene rilasciato nello spazio intercellulare, i filamenti di cheratina presenti nei

cheratinociti, condensano, sotto l'azione della filaggrina, e determinano la formazione dello strato corneo (Drake et al., 2011). La filaggrina, contenuta anch'essa nel citoplasma dei cheratinociti, è stoccata in granuli contenenti il suo precursore, la *profilaggrina*. Questa subisce un processo proteolitico che porta alla formazione dei singoli monomeri di filaggrina, durante la transizione dallo strato granuloso allo strato corneo (Proksch et al., 2008).

~ **Strato spinoso:** formato da 8/10 file di cellule con uno spessore maggiore nelle aree sottoposte a traumatismi o compressioni. Distinguiamo cellule prismatiche in attiva mitosi più vicine alla lamina basale, che formano, insieme con quest'ultima, lo strato *germinativo* o *malpighiano*; seguono quelle più superficiali appiattite e con un citoplasma meno basofilo. La denominazione di questo strato è legata alla presenza, tra gli spazi intercellulari, di prolungamenti o "spine" che si innalzano dal contorno delle cellule, osservabili al microscopio ottico; l'osservazione al microscopio elettronico ha dimostrato che le cellule sono unite dai desmosomi e ha chiarito che l'aspetto "spinoso" è in realtà un artefatto provocato dai fissatori istologici che coartano le cellule, aumentando lo spazio tra queste, che rimangono unite solo a livello dei desmosomi mediante dei prolungamenti di membrana che assumono l'aspetto di "spine". In questo strato sono presenti anche le cellule *dendritiche* o *del Langerhans*, di derivazione midollare per differenziamento dai monociti, con funzione di APC (Antigen-Presenting Cell) legata alla presenza del Complesso Maggiore di Istocompatibilità (MHC) di classe II; tali cellule captano gli antigeni (Ag) che superano la barriera dell'epidermide e migrano, successivamente, nei linfonodi regionali drenanti. Presentano inoltre recettori FC (Frammento Cristallizzabile) per le immunoglobuline, implicati nel processo di cascata del complemento. Questi elementi cellulari costituiscono una parte imprescindibile del sistema immunitario tegumentale.

~ **Strato basale**: presenta un'unica fila di cellule iso o batiprismatiche in intensa attività mitotica, hanno un nucleo voluminoso, un citoplasma scarso e basofilo per la presenza di ribosomi. Le cellule sono in rapporto con il connettivo dermico mediante l'interposizione di una membrana basale che presenta caratteristiche estroflessioni dette *creste epiteliali*, le quali si interdigitano con rilievi del derma, le *papille dermiche*. Questo aspetto è maggiormente apprezzabile nelle aree con scarsa copertura di peli (Beghelli et al., 2006).

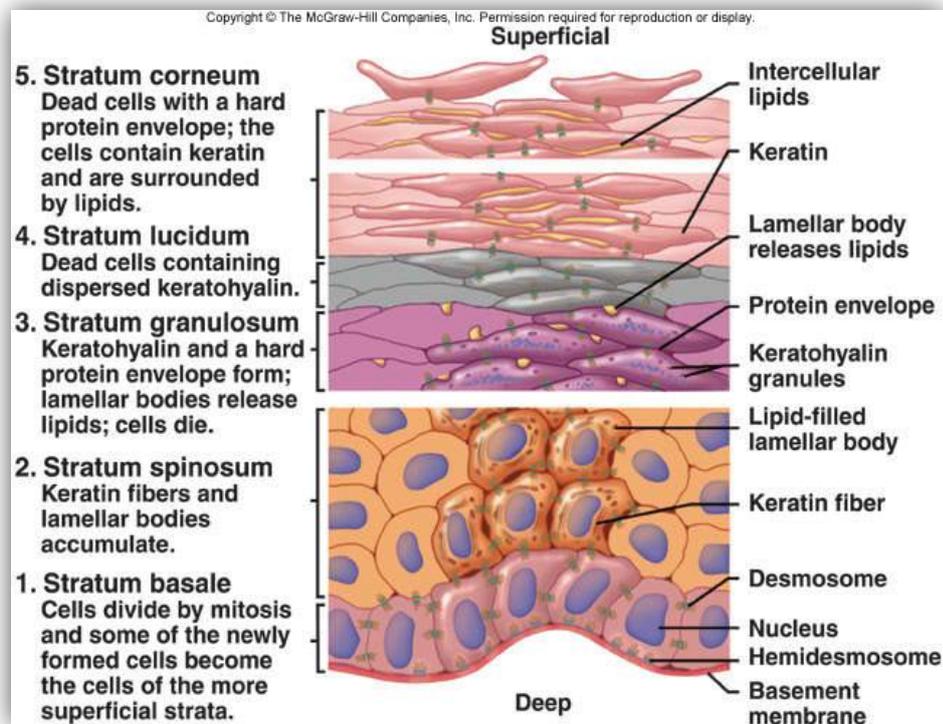


Fig.3: rappresentazione della suddivisione in strati dell'epidermide (www.anatomypic.com.).

1.2 Derma

Il derma, quale strato più profondo dell'epidermide, è costituito da tessuto connettivo provvisto di una ricca rete capillare, terminazioni nervose, follicoli piliferi e ghiandole. E' formato dallo strato *papillare*, superficiale e dallo strato *reticolare*, profondo. Il primo mostra una tessitura di sottili fibre collagene ed elastiche nelle cui maglie si rinvengono macrofagi, plasmacellule, mastociti e melanociti. Il secondo presenta una trama più densa, con fibre ispessite raccolte in fasci orientati parallelamente la superficie cutanea; la tessitura di questo strato è responsabile della resistenza e dell'elasticità della cute. Qui sono presenti i muscoli erettori del pelo.

Altri due elementi fondamentali del derma, insieme alle fibre collagene ed elastiche, sono i *fibroblasti* e la *sostanza fondamentale*. I primi rappresentano la componente cellulare maggiormente presente a questo livello, sono responsabili della sintesi sia delle fibre sia dei componenti della sostanza fondamentale. Quest'ultima è costituita da molecole di acqua, elettroliti e GAG (glicosaminoglicani) solforati o meno, come il condroitinsolfato, l'eparansolfato e l'acido ialuronico (Beghelli et al., 2006).

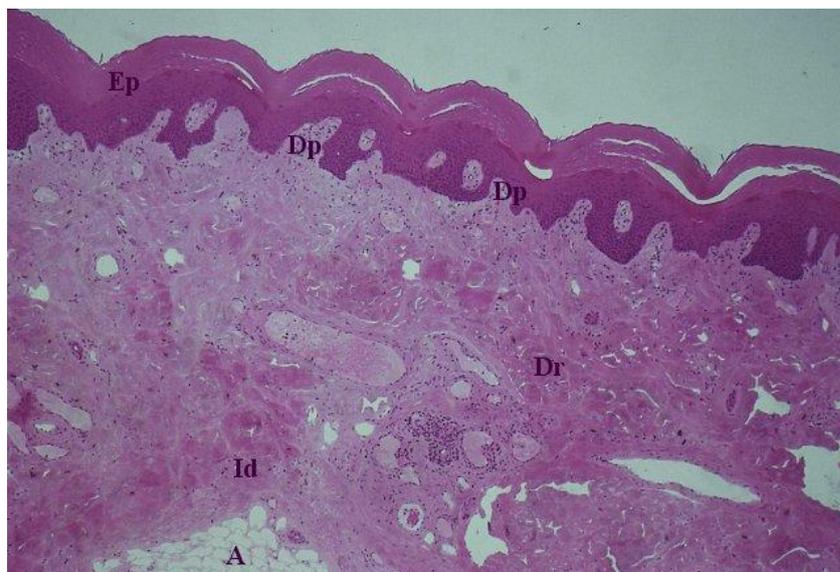


Fig. 4: rappresentazione istologica degli strati che costituiscono la cute: Ep: epidermide; Dp: derma papillare; Dr: derma reticolare; Id: ipoderma; A: tessuto adiposo. (www.medicinapertuttialtervista.org).

1.3 Ipoderma

La tela sottocutanea o ipoderma è lo strato tegumentario più profondo, il cui sviluppo è direttamente proporzionale al grado di mobilità della pelle ed è notevole a livello del tronco, meno intorno agli orifizi naturali. I suoi fasci connettivali sono in diretta connessione con quelli dello strato reticolare del derma e in profondità assumono un andamento parallelo alla superficie cutanea, formando una struttura più densa detta *fascia superficiale*. A livello ipodermico è presente un *pannicolo adiposo* particolarmente sviluppato nel Maiale e negli animali ibernanti che funge da riserva energetica e partecipa alla termoregolazione ostacolando la dispersione del calore (Beghelli et al., 2006).

1.4 Vasi e nervi

La vascolarizzazione dell'apparato tegumentario è abbondante e ricopre un ruolo fondamentale nell'ambito del trofismo tissutale e della termoregolazione. Consta di una *rete dermica* che si ramifica nella *rete sottopapillare* e a sua volta nelle *anse capillari intrapapillari* che si portano fino alle immediate vicinanze dell'epidermide, che ricordiamo essere priva di vasi. E' un sistema vascolare molto efficiente capace di creare anastomosi che garantiscono un circolo collaterale quando una compressione o un'occlusione riducono l'afflusso di sangue in un determinato distretto.

La struttura vascolare venosa vede la presenza di un *plesso venoso sottopapillare*, *dermico profondo* e *dermico sottocutaneo*, da cui derivano le vene efferenti.

I vasi linfatici, assenti anch'essi nell'epidermide, convogliano nella *rete linfatica sottocutanea*, drenata dai linfonodi superficiali.

I nervi si organizzano a formare il *plesso sottocutaneo*, più profondo, cui segue il *plesso dermico* e il *plesso sottoepidermico*. Sono rappresentate sia fibre mieliniche sia amieliniche: le prime veicolano l'informazione sensitiva proveniente da afferenze terminali, le seconde sono di origine ortosimpatica post gangliare, destinate ai muscoli erettori del pelo, alle ghiandole cutanee e alla muscolatura vasale (Beghelli et al., 2006). Tra le più importanti strutture

recettoriali ricordiamo i *corpuscoli del Pacini* e *Meissner* per la sensibilità tattile e pressoria, i *corpi del Ruffini* e le *clave di Kraus* per la sensibilità termica rispettivamente del caldo e del freddo.

1.5 Annessi cutanei

Gli annessi cutanei comprendono le ghiandole cutanee, i peli e le strutture cornee. Sono tutti di origine epidermica, alcuni di essi profondamente infissi nel derma sottostante da cui ricevono nutrimento (ghiandole e peli).

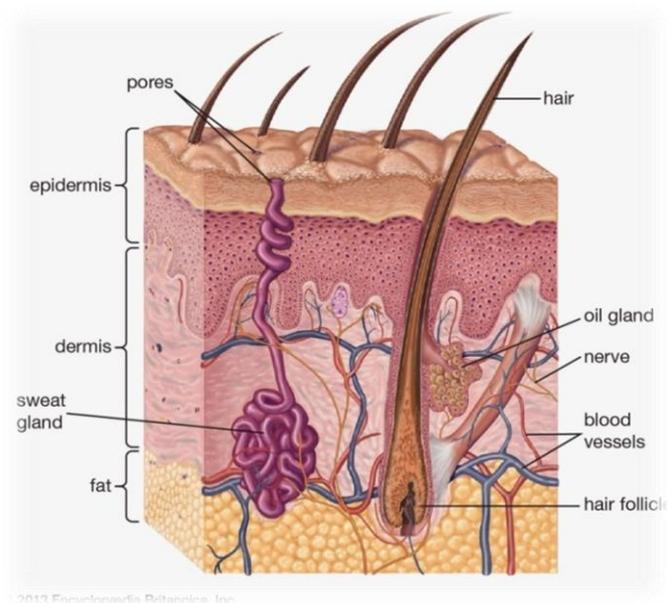


Fig.5: gli annessi cutanei (Enciclopedia Britannica, inc, 2013).

1.5.1 Ghiandole cutanee

Sono principalmente rappresentate dalle ghiandole sudoripare e sebacee, variamente distribuite e sviluppate in base alla specie. In distretti anatomici ben definiti, troviamo anche agglomerati di ghiandole speciali, quali ad esempio le ghiandole anali, perianali e dei sacchi anali del Cane.

- ~ Le **ghiandole sudoripare** sono classificate istologicamente come delle ghiandole tubulari semplici il cui adenomero è situato nel derma e presenta

un condotto escretore che costeggia il follicolo pilifero e si apre al di sopra del colletto di quest'ultimo o sulla superficie cutanea stessa. Queste ghiandole sono deputate alla secrezione di sudore, un liquido torbido costituito da acqua, elettroliti, urea. Nel cavallo sono numerose e ben sviluppate e secernono anche albumina, nei carnivori sono strutture rudimentali con uno scarso significato funzionale eccezion fatta per quelle localizzate a livello dei cuscinetti plantari.

~ Le **ghiandole sebacee** hanno una struttura alveolare ramificata, a secrezione olocrina, compresa nella guaina radicolare esterna dei follicoli piliferi, a livello della quale sfocia il condotto ghiandolare. L'adenomero si localizza nel derma. Sono deputate alla secrezione del sebo che si mescola con la secrezione sudoripara apocrina.

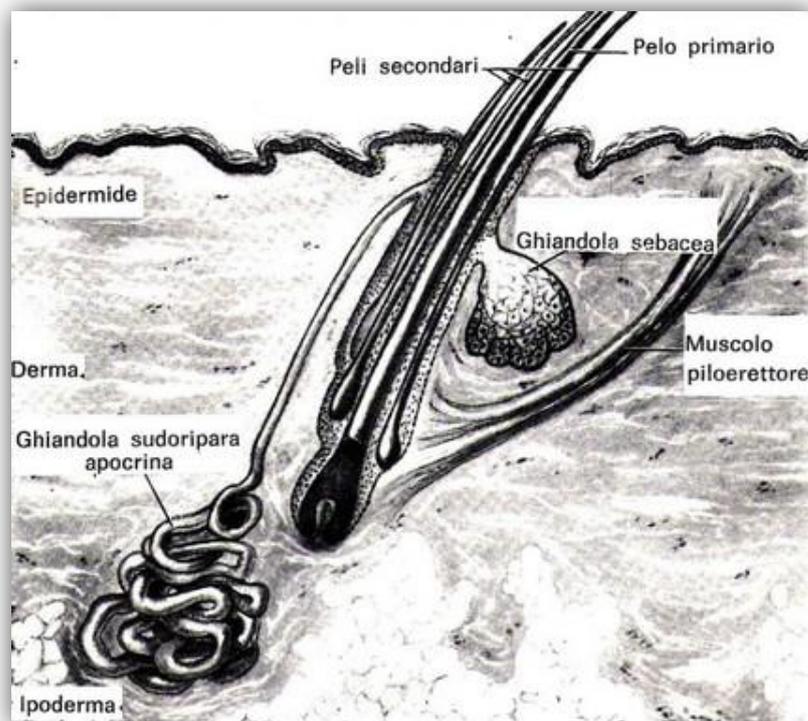


Fig.6: localizzazione anatomica delle ghiandole sudoripare e sebacee
(<http://www.centroveterinariofioranese.blogspot.it>)

~ **Ghiandole anali, dei sacchi anali e perianali:** le prime si rinvencono nel Cane, nel Gatto e nel Maiale, sono delle ghiandole tubulo-alveolari sudoripare, modificate, localizzate nella sottomucosa del canale anale (Akers and Denbow, 2013). Si aprono a livello dell'ano liberando un secreto che fornisce un rivestimento alla superficie mucosale e che permette, per il caratteristico odore, la marcatura del territorio; inoltre grazie alla presenza di sialoglicoconiugati e sostanze antimicrobiche, svolge un'attività difensiva sulla mucosa anale (Nara et al., 2011). Le ghiandole dei sacchi anali sono contenute all'interno di diverticoli della mucosa anale (sacchi anali) in uno spazio compreso tra lo sfintere anale interno ed esterno. Infine le ghiandole circumanali o perianali sono ammassi di cellule epiteliali adiacenti alle ghiandole sebacee e spesso non si identifica un vero e proprio dotto escretore (Akers and Denbow, 2013).

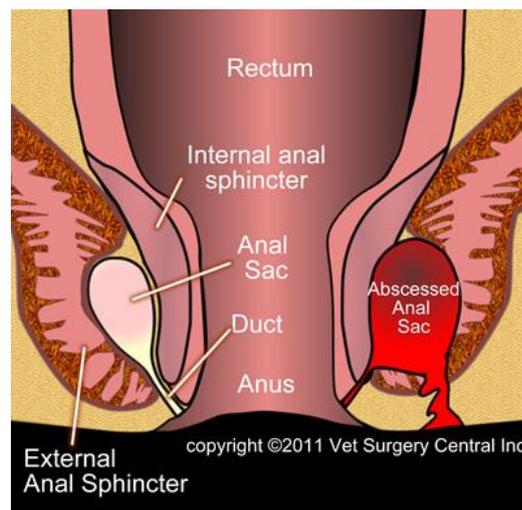


Fig. 7: localizzazione dei sacchi anali (www.analsurgicalcenter.com.)

1.5.2 Peli

Sono formazioni filamentose che originano dai follicoli piliferi e nel loro insieme costituiscono il mantello o vello (ovi-caprini) fornendo un rivestimento protettivo contro traumatismi ed agenti atmosferici. Conosciamo una vasta varietà di peli quali i crini, lunghi e ispessiti che costituiscono la criniera e la coda del cavallo; il fiocco del bovino e la barba della capra; le setole del maiale corte rigide e di

importante diametro (0.15-0.18mm); i peli corti e rigidi con la funzione di proteggere gli organi di senso quali le ciglia sul margine palpebrale, le vibrisse situate all'entrata delle narici e i tragi posti sul bordo e all'interno del meato acustico esterno. Infine abbiamo i peli tattili localizzati soprattutto sulla testa nella regione sopra-orbitale, sotto-orbitale, zigomatica, buccale, labiale, mentale, i cui follicoli arrivano fino ai piani muscolari che li rendono mobili.

Il pelo è formato da una parte libera, il fusto, ed una parte infissa, la radice, con alla base un rigonfiamento detto bulbo. Da un punto di vista citologico il pelo è costituito, nella parte più esterna, da cellule cheratinizzate nella caratteristica configurazione a "tegola di tetto". La radice è accolta nel follicolo pilifero, a sua volta suddiviso in tre segmenti: l'infundibolo, l'istmo e il segmento inferiore, circondato da una spessa membrana basale alla quale si ancora il muscolo erettore del pelo. Il pelo alterna periodi di crescita (anagen) a periodi di arresto (telogen) con fasi intermedie (catagen) dove assistiamo ad una progressiva riduzione della proliferazione delle cellule del bulbo.

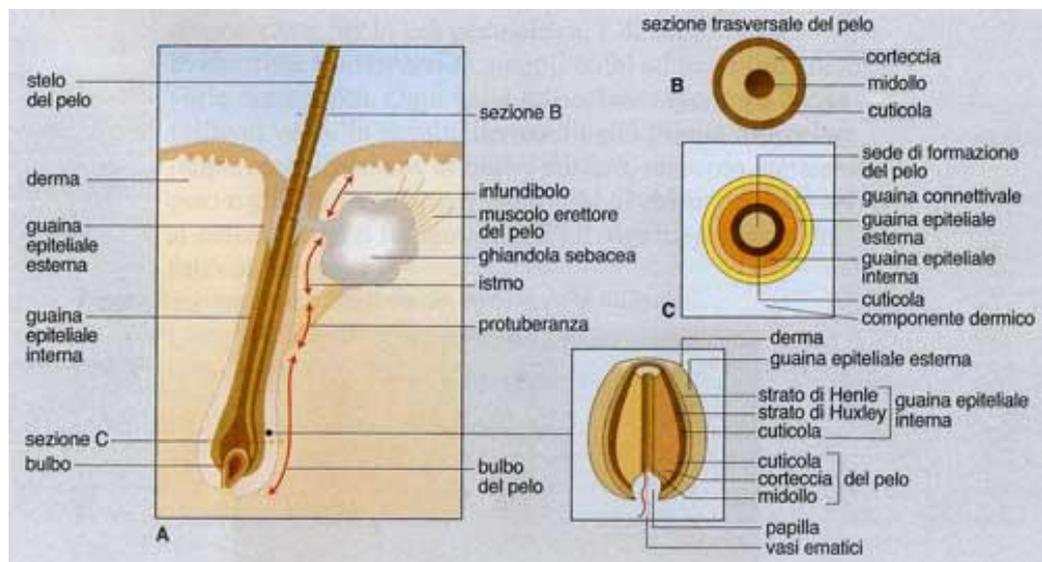


Fig. 8: anatomia del follicolo pilifero e del pelo (<http://www.notonlyblack.it>).

1.5.3 Produzioni cornee

Si rinvencono nella testa, come il corno frontale del Bovino, della Pecora o della Capra e, in tutte le specie, alle estremità delle falangi dove costituiscono gli artigli dei Carnivori e lo zoccolo degli Ungulati. Le produzioni cornee sono il risultato di un'imponente cheratinizzazione in partenza da una struttura ben definita detta *membrana cheratogena*, formata dallo strato malpighiano e dal derma. Questo è riccamente vascolarizzato ed adeso al segmento osseo falangeo più distale il quale fa da supporto alla produzione cornea stessa. I Carnivori presentano artigli sotto forma di cornetti incurvati terminanti a punta, la quale si usura per il contatto con il suolo, nei Canidi, mentre è sempre molto aguzza nei Felini. In questi ultimi, infatti, gli artigli durante l'appoggio al suolo sono nascosti in *tasche cutanee* (unghie retratti) da cui escono per contrazione del muscolo flessore profondo delle dita (Beghelli et al., 2006).

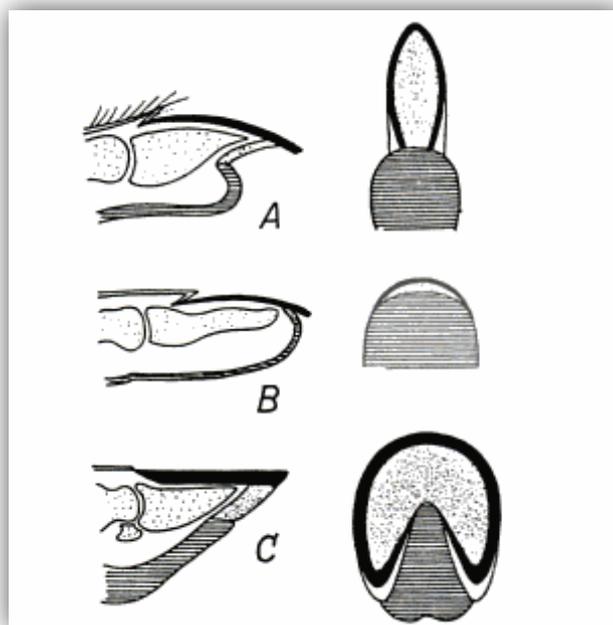


Fig. 9: schema di artiglio (A), unghia tegolata (uomo, B), zoccolo (C); in sezione sagittale e in veduta plantare. In nero la lamina ungueale, in punteggiato la solea, in tratteggio il polpastrello. (Padoa, 2002).

2. LE FERITE CUTANEE: CLASSIFICAZIONE, FISIOPATOGENESI E TRATTAMENTO

Per ferita cutanea si intende una “*soluzione di continuo dei tessuti molli, recente e aperta*” (*recente*: assenza di processi riparativi in atto; *aperta*: caratterizzata da perdita di integrità delle superfici di rivestimento quali cute e mucose).

Fra gli **elementi semeiologici** di una ferita possiamo rinvenire:

- ~ **Margini**: linee di sezione dei tessuti feriti a livello dei quali le due parti sconciuate si retraggono sotto l'azione delle forze di tensione determinate dall'orientamento predominante delle fibre del tessuto fibroso cutaneo;
- ~ **Commessure**: punto di raccordo dei margini alle estremità della ferita;
- ~ **Fondo**: piano sottostante la superficie della ferita e limite profondo di quest'ultima;
- ~ **Lembi**: porzioni cutanee che rimangono adese ai margini della ferita a livello di una zona ristretta;
- ~ **Orifizio**: foro di ingresso ed eventualmente di uscita del corpo feritore;
- ~ **Canale**: tragitto tra due orifizi o tra l'orifizio di entrata e il fondo della ferita;
- ~ **Moncone**: parti di organi e strutture, solitamente di forma cilindrica (tendini, muscoli, legamenti) recise di netto.

Tutti questi elementi non sempre sono riscontrabili ma, in base alla loro presenza o assenza, ci aiutano a collocare le lesioni in uno specifico campo di appartenenza.

2.1 Classificazione delle ferite

Conosciamo diversi criteri di classificazione delle ferite, tra i quali ricordiamo: l'eziopatogenesi, la gravità e il grado di contaminazione.

In base all'**eziologia** abbiamo:

- ~ **Ferite da taglio:** causate da corpi taglienti che agiscono per pressione e sfregamento; possono essere accidentali o iatrogene (f. chirurgiche). In base all'aspetto possono essere lineari, se il corpo feritore agisce perpendicolarmente al tessuto, o a lembo, se il corpo feritore agisce trasversalmente portando al parziale distacco della cute dai margini della ferita. Sono caratterizzate da contorni netti, commessure evidenti, scarsa perdita di sostanza, reazione algica modesta; l'emorragia nelle fasi iniziali è sempre molto abbondante, per rottura contemporanea di tutte e tre le tonache vasali; ciò provoca un abbondante sanguinamento che svolge un'azione di pulizia della ferita riducendo le possibili contaminazioni batteriche;

- ~ **Ferite da punta:** causate da corpi feritori acuminati che agiscono con un meccanismo di pressione perpendicolare e laterale sui tessuti. La trazione laterale è dovuta al fatto che il diametro del corpo feritore aumenta procedendo dalla punta alla base. L'emorragia è scarsa, il corpo feritore agisce divaricando i tessuti, in tal modo i vasi riescono a sottrarsi alla sua azione e si lacerano parzialmente per stiramento. La reazione algica è modesta, c'è poca perdita di sostanza ma sono frequenti le complicazioni batteriche secondarie. Spesso, infatti, i margini più superficiali della ferita collabiscono per l'intrinseca elasticità cutanea, lasciando, al di sotto, degli spazi morti dove l'anaerobiosi permette lo sviluppo di patogeni importanti (es: *Clostridi spp*). Possono essere definite penetranti se interessano delle cavità;

- ~ **Ferite lacere/abrasive:** causate da corpi feritori che agiscono con un meccanismo di pressione e trazione, solitamente lineare, come durante lo sfregamento su asfalto. I margini sono solitamente irregolari e sfrangiati, l'exeresi è cospicua spesso seguita da cicatrizzazione per seconda intenzione. Il rischio di contaminazione batterica è elevato a causa del frequente rinvenimento di corpi estranei, ne consegue che il *debridement* della ferita risulta fondamentale ai fini di una corretta guarigione;

- ~ **Ferite da strappamento:** il corpo feritore agisce con un meccanismo di trazione e torsione. Spesso si localizzano alle estremità degli arti e possono essere associate a lesioni ortopediche riguardanti ossa, articolazioni, tendini e legamenti;

- ~ **Ferite da morso:** seguono all'azione traumatica dei denti, l'aspetto cambia in base alla dentatura dell'animale feritore. Se il morso è seguito da lacerazione dei tessuti, i margini risultano sfrangiati ed irregolari. Si presentano come lesioni profonde, accompagnate da emorragia ed estesa exeresi. Sono spesso soggette a complicazioni secondarie legate alla penetrazione in profondità dei denti che rappresentano un veicolo ad elevata carica batterica intrinseca;

- ~ **Ferite avvelenate:** causate da ofidi, aracnidi e insetti. In questo caso le complicazioni sono legate alle diverse sostanze inoculate con il morso, capaci di produrre effetti a livello locale e sistemico. Il veleno delle vipere, ad esempio, risulta avere un potere ematotossico, vasculotossico e necrotizzante; altera la resistenza e l'integrità dei vasi sanguigni causando emorragia ed ipotensione, influenzando la dinamica cardiaca e la perfusione tissutale. Questo tipo di ferita si riscontra frequentemente a carico del muso e degli arti;

- ~ **Ferite da arma da fuoco:** diverse in base al tipo di proiettile coinvolto, alla distanza dello sparo e alla direzione del corpo feritore (tangenziale,

penetrante, trapassante). Sono caratterizzate da dolore intenso e scarsa emorragia. Provocano fratture per coinvolgimento dei tessuti duri e contusione dei tessuti molli;

- ~ **Ustioni:** in base all'agente fisico possono essere causate da caldo/freddo, agenti caustici ed energia elettrica. In base al grado di coinvolgimento tissutale abbiamo: ustioni di primo (epidermide), secondo (derma) e terzo grado (tessuti profondi). Le complicazioni più frequentemente associate a questo tipo di lesioni sono: disidratazione, iper/iponatriemia, iper/ipocalemia, acidosi, azotemia, anemia, insulti polmonari da inalazione di fumi, setticemia (Fowler, Williams, 1999).

Per quanto concerne la **gravità** delle lesioni, questa è determinata da: tipo di strutture interessate, entità dell'exeresi, estensione della ferita ed entità dell'emorragia. Avremo dunque:

- ~ **Abrasioni:** danno all'epidermide o all'epitelio di rivestimento mucosale;
- ~ **Ferite superficiali:** che coinvolgono cute/sottocute, sottocute/sottomucosa;
- ~ **Ferite profonde:** interessamento dei piani tissutali più profondi, fasce muscolari, tendini, legamenti;
- ~ **Ferite penetranti:** la scongiunzione dei tessuti è tale da permettere l'ingresso in una cavità (toracica o addominale);
- ~ **Ferite trapassanti:** il corpo feritore attraversa una regione anatomica nella sua totalità.

Le ferite possono ancora essere classificate in base al grado di **contaminazione** in:

- ~ **Asettiche:** assenza di contaminazione batterica o di altra natura. La flogosi, l'exeresi e il grado di emorragia sono di scarsa entità, cicatrizzano per prima intenzione;
- ~ **Settiche:** elevata contaminazione batterica, imponente flogosi, eventuale presenza di essudato, guarigione per seconda intenzione.

In relazione al **tempo** in cui è avvenuta la contaminazione abbiamo:

- ~ **Ferita sporca:** 0-4 ore;
- ~ **Ferita contaminata:** 5-10 ore;
- ~ **Ferita infetta o settica:** + di 12 ore.

Infine conosciamo ferite **aperte** e **chiuse**, le prime caratterizzate dalla presenza di soluzioni di continuo, le seconde, dovute a schiacciamento e contusione, non presentano soluzioni di continuo ma la cute e i piani sottostanti possono essere gravemente danneggiati.

2.2 Altre lesioni cutanee di nostro interesse

Ai fini dell'elaborato dobbiamo citare altre due frequenti lesioni cutanee: *le piaghe da compressione (o decubito)* e la *dermatite piotraumatica (hot spot)*.

Le piaghe da compressione si formano quando il soggetto resta in decubito per lunghi periodi di tempo a causa di paralisi, fratture, lesioni traumatiche o patologie sistemiche debilitanti. Questo tipo di lesione può anche svilupparsi al di sotto di ingessature e bendaggi non correttamente conformati o imbottiti. Potrebbero essere facilmente evitate fornendo agli animali una superficie d'appoggio adeguata (materassi in gommapiuma, tappetini in pelle) o modificando frequentemente la loro posizione e tenendoli puliti e asciutti. Le aree maggiormente suscettibili alla compressione sono l'epicondilo laterale dell'omero, la tuberosità del calcagno, il grande trocantere del femore, la tuberosità dell'anca e quella ischiatica. Queste prominenze sono coperte da tessuti molli quali cute, tessuto connettivo lasso, grasso, fascia profonda e periostio che vengono compressi a loro volta. Il tessuto adiposo sottocutaneo e i dotti escretori delle ghiandole sebacee sono i più delicati e quindi sono i primi ad essere interessati da questo fenomeno. In genere, con le compressioni discontinue, l'infiammazione conseguente è lieve e pertanto si forma un callo protettivo; con la compressione prolungata o grave, invece, si induce ischemia tissutale e necrosi (Fossum et al., 2003).

Il principale meccanismo eziopatogenetico che determina l'insorgenza delle lesioni da decubito è la **pressione**, accompagnata da altre condizioni che svolgono un ruolo di concausa ovvero lo **sfregamento** e l'**umidità** (Thomas et al., 2006).

La **pressione** esercitata sui tessuti diventa lesiva quando supera il livello critico di 32 mmHg, che corrisponde al valore pressorio normale nella circolazione capillare arteriosa (Vasconez et al., 1977; Bansal et al., 2005). Come conseguenza si genera una riduzione dell'apporto ematico, ischemia ed ipossia. In mancanza di ossigeno le cellule attiveranno un metabolismo anaerobio che produce sostanze tossiche ed acidosi locale, si avrà un aumento della permeabilità vasale, formazione di trasudato ed edema, nonché ulteriore sofferenza cellulare che condurrà alla necrosi (Thomas et al., 2006). Lo **sfregamento** determina la rimozione dello strato più superficiale della cute (strato corneo). L'**umidità** potenzia l'azione degli altri fattori perché rende la pelle più fragile e facilmente aggredibile. Un'esposizione prolungata della cute all'umidità provoca fenomeni di macerazione ed alterazione del pH, riducendo la funzione barriera della cute stessa. Questa caratteristica si osserva spesso nei pazienti che presentano incontinenza (Thomas et al., 2006).

Per quanto riguarda la **stadiazione** (Ankrom et al., 2005; Black et al. 2007), nelle lesioni di primo grado, l'area interessata si presenta lievemente edematosa, calda ed il paziente può provare un senso di tensione o di dolore. Rimuovendo la causa, che determina la compressione, la cute ritorna normale entro 24 ore senza alterazioni permanenti. Le lesioni al secondo stadio si presentano con margini ancora ben definiti, sotto forma di abrasione, vescicola o bolla. Il colore può variare dal rosso intenso al cianotico, l'area può essere calda o fredda, edematosa e lievemente indurita. Anche in questo stadio la rimozione della compressione conduce alla completa regressione delle alterazioni cliniche. Nelle fasi successive (terzo e quarto stadio) si assiste ad una progressiva degenerazione dei tessuti con interessamento degli strati più profondi. I margini dell'ulcera non sono ben delineati, i bordi sono irregolari, la cute circostante può essere eritematosa. Il fondo può apparire lucido ed edematoso, oppure coperto da una membrana aderente e giallastra formata da fibrina, cellule morte ed essudato purulento. Possono comparire croste sottili, necrosi, escare coriacee e fistole. La lesione che tende a cronicizzare è invece caratterizzata da un aspetto calloso con fibrosi diffusa dei margini e del fondo. Le lesioni al terzo e quarto stadio guariscono per seconda intenzione in tempi prolungati (Thomas et al., 2006).

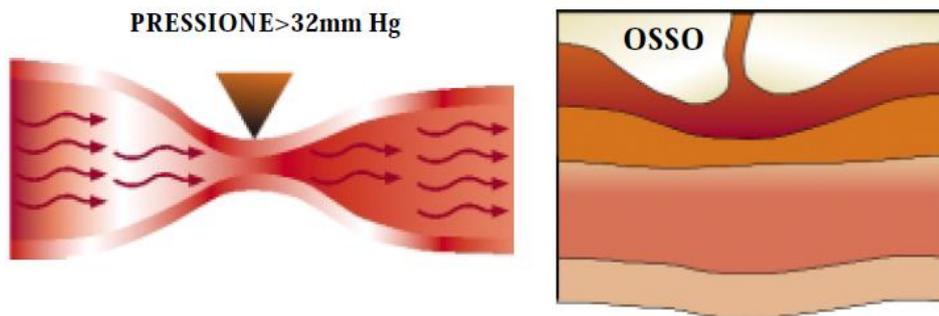


Fig. 1: effetto della pressione sulla circolazione
(http://www.apss.tn.it/public/allegati/DOC_269029_0.pdf)

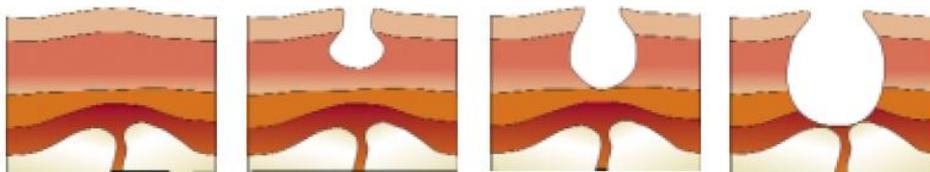


Fig. 2: stadiazione (http://www.apss.tn.it/public/allegati/DOC_269029_0.pdf)

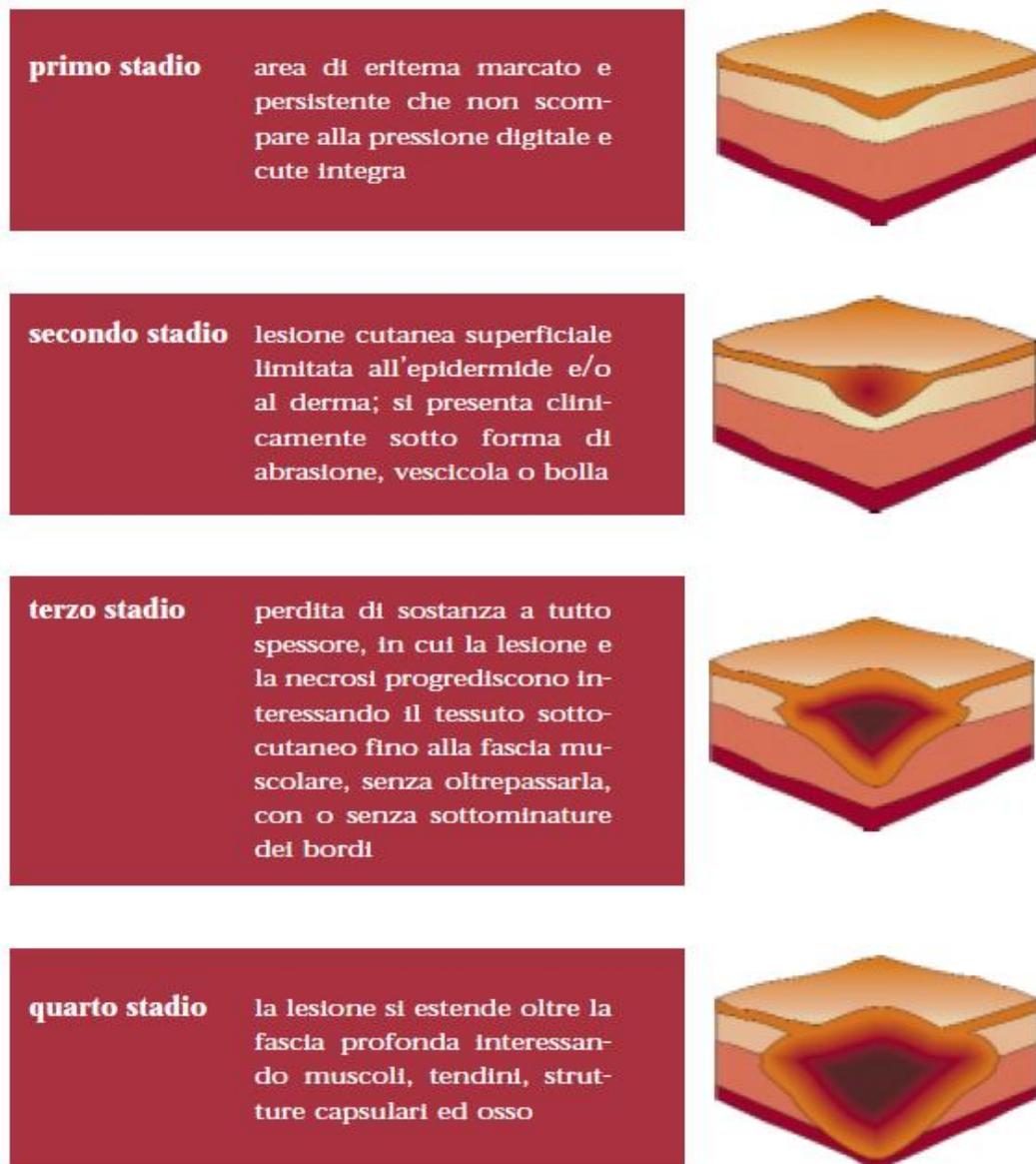


Fig. 3: stadiazione (http://www.apss.tn.it/public/allegati/DOC_269029_0.pdf).

Il **trattamento** e la **prevenzione** delle piaghe sono simili. Le prominenze ossee devono essere controllate quotidianamente per rilevare la comparsa di segni di ulcerazione imminente, iperemia, umidità e facile tendenza dei peli all'epilazione (Collier and Moore, 2006). In fase iniziale bisogna fornire un giaciglio imbottito o un bendaggio, la cute deve essere mantenuta pulita e asciutta. Le lesioni aperte devono essere trattate con agenti topici e bendaggi che promuovono la guarigione umida della ferita e la granulazione (Collier and Moore, 2006). È consigliato il lavaggio della parte lesa con soluzione fisiologica o Ringer Lattato e quando è necessaria la disinfezione si predilige l'uso della clorexidina gluconato in

soluzione acquosa allo 0,05% (Fleischer et al., 1997) mentre è sconsigliato l'uso di alcool etilico o acqua ossigenata che creano irritazione e distruggono le cellule in fase di riepitelizzazione (Drosou et al., 2003; Atiyeh et al., 2009). L'impiego di antibiotici topici è oggetto di pareri controversi perché comporta il rischio di comparsa di sensibilizzazione e resistenza batterica. La maggior parte degli autori sostiene che, anche per il trattamento delle lesioni colonizzate e/o infette, è sufficiente un'accurata e frequente detersione, o la somministrazione di antibiotici per os (Jackson and Mahon, 2009) La medicazione ideale deve creare sulla superficie della lesione un ambiente favorevole ai processi di divisione e replicazione cellulare, ossia garantire le condizioni ottimali di temperatura (37°), umidità ed ossigenazione, essere biocompatibile e proteggere l'ulcera dai danni meccanici e dalla contaminazione batterica, preservando la cute circostante (Margaret et al., 2008). A tale scopo la scelta può ricadere su diversi dispositivi medici. Possono essere utilizzate garze antisettiche non aderenti per il dressing secondario di copertura; medicazioni adsorbenti (idrocolloidi, alginati, idrofibre), caratterizzati dalla capacità di rimuovere l'essudato in eccesso, assorbendolo o intrappolandolo nella propria trama, indicato nelle lesioni cavitari profonde (Seaman et al., 2002). Ancora possiamo utilizzare medicazioni favorevoli la granulazione (collagene, alginati, microfibre), che agiscono attraverso un processo di gelificazione, mantenendo un microambiente umido favorente la produzione del tessuto di granulazione; il collagene, in particolare, fornisce una trama che favorisce lo sviluppo dei fibroblasti ed è indicato nelle lesioni superficiali e profonde ben deterse, umide e granuleggianti (Seaman et al., 2002; Margaret et al., 2008). Possiamo ancora citare gli idrogeli, polimeri sintetici che agiscono idratando i tessuti necrotici e favorendone l'autolisi. Infine annoveriamo medicazioni occlusive e semi-occlusive che non permettono il passaggio rispettivamente di ossigeno e di batteri e liquidi, utili nelle ulcere meno gravi (http://www.apss.tn.it/public/allegati/DOC_269029_0.pdf)

La dermatite piotraumatica (dermatite umida acuta, *Hot spots*) è un' infezione batterica della cute, a rapida insorgenza e decorso acuto, secondaria ad

autotraumatismi (morsicature, sfregamenti o grattamenti) (Foster et al., 2003). Lo sviluppo di questa patologia è legato a tutte quelle cause che possono provocare prurito, innescando una compulsione al grattamento nell'animale (Birgit et al., 2004). Tra i principali fattori predisponenti annoveriamo: le infestazioni da ectoparassiti (pulci, zecche, acari come *Sarcoptes Scabiei*), allergie cutanee (allergia da pulci, dermatite atopica da contatto, allergie alimentari), otiti esterne, corpi estranei nel pelo, psicosi (Mason et al., 1989; Scott et al., 2001; Foster et al., 2003).

BOX 3-2	
Cause di dermatite piotraumatica	
■	Pulci
■	Altri parassiti (per es., pediculosi, cheyletiellosi, scabbia)
■	Ipersensibilità (per es., atopia, cibo, morso di pulce)
■	Malattia dei sacchi anali
■	Otite esterna
■	Follicolite (per es., batterica, dermatofitica)
■	Traumi (per es., piccole ferite, corpi estranei)
■	Dermatite da contatto

Tab.1: elenco delle principali cause di dermatite piotraumatica (Medleau et al. Dermatologia Del Cane Del Gatto, 2007).

Il meccanismo patogenetico chiama in causa le alterazioni del micro-ambiente cutaneo quali un aumento dell'umidità o della temperatura che favoriscono la proliferazione batterica. I batteri e le tossine prodotte agiscono da molecole antigeniche responsabili dello sviluppo della risposta infiammatoria (Mason et al., 1989).

Le razze particolarmente predisposte sono quelle con un pelo folto e un fitto sottopelo che trattiene maggiormente l'umidità. Si può osservare una maggior incidenza nei soggetti giovani, di sesso maschile (Birgit et al., 2004) presumibilmente legata agli effetti ormonali sulla secrezione cutanea e sullo sviluppo dell'infezione, o ad una tendenza caratteriale a sviluppare una compulsione al grattamento (Bratka-Robia et al., 2002).

La lesione tipica si presenta **arrossata, umida, essudativa**. Può essere presente un coagulo di materiale proteinaceo, al centro dell'area, circondato da un alone

rossastro di cute eritematosa. La zona è **alopecica** e i margini ben definiti dal pelo circostante.



FIGURA 3-17 Dermatite piotraumatica. Particolare del cane in figura 3-16. È evidente la superficie umida ed erosa della lesione. le papule circostanti la lesione indicano una piodermite superficiale che si sta espandendo.

Fig. 4: tipico aspetto clinico di una dermatite piotraumatica (Medleau et al. Dermatologia Del Cane Del Gatto, 2007).

Le zone del corpo maggiormente colpite sono il collo, la groppa e le zampe posteriori (Birgit et al., 2004) ma se non si interviene con una terapia adeguata, la lesione progredisce velocemente trasformandosi in una piodermite profonda e diffusa (Wilkinson, 1989).

Il patogeno maggiormente rappresentato in questo modello di dermatite è *Staphylococcus intermedius*; meno frequenti sono *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus schleiferi*; Gram-negativi quali *Proteus sp.* ed *Escherichia coli*, si rinvencono maggiormente nelle piodermiti profonde (Ihrke et al., 2005), mentre *Pseudomonas sp.* presenta una bassa incidenza (Baxter et al., 2008).

La diagnosi viene effettuata tenendo conto dell'insorgenza acuta, dell'aspetto clinico e dell'associazione con una o più cause primarie (Wilkinson, 1989).

La terapia locale prevede la pulizia della lesione, l'applicazione di creme antibiotiche e l'utilizzo di shampoo antibatterici almeno due volte la settimana. Per alleviare il prurito, la dolorabilità e lo stato infiammatorio, è utile somministrare cortisonici per os. Nei casi più gravi si consiglia la somministrazione di antibiotici sistemici una volta al giorno (SID) per almeno 3 settimane. A guarigione clinica avvenuta, è preferibile continuare la terapia per

un'altra settimana. Pochissimi autori (Scott et al., 2006) riportano della risoluzione terapeutica in meno di 40 giorni somministrando antibiotici (in questo articolo è riportato l'uso dell'Orbifloxacin). Le molecole più efficaci nel trattamento della dermatite piotraumatica sono: cefalosporine (cefalexina, cefadroxil), fluorchinoloni (enrofloxacin, marbofloxacin) e β -lattamici (amoxicillina-acido clavulanico) (Ihrke et al., 2005). La marbofloxacin deve essere utilizzata solo nelle forme gravi e recidivanti, quando gli altri antibiotici si sono rivelati inefficaci (Paradis et al., 2001). Infine, anche la rifampicina risulta valida nel trattamento delle piodermiti da stafilococchi, ma il suo uso deve essere ristretto a quei casi che non rispondono alla terapia standard, per ridurre il rischio di sviluppo di antibiotico resistenza da parte dei micobatteri per i quali la rifampicina è elettiva (Sentürk et al., 2005).

Al momento del trattamento iniziale è sempre bene indagare la causa predisponente per evitare l'insorgenza di recidive, spesso legate a una terapia antibiotica inadeguata, dovuta alla scelta della molecola sbagliata, al sottodosaggio o allo sviluppo di antibiotico resistenza, problematica di difficile soluzione e grande preoccupazione sociale (Ihrke et al., 2005). E' noto, infatti, come l'utilizzazione prolungata degli antibiotici porti alla selezione di ceppi di germi resistenti, difficili da debellare (Bergan, 1981; Noble et al., 1992; Quinn et al., 1994; Lloyd et al., 1999; Werckenthin et al., 2001; Holm et al., 2002; Rantala et al., 2004; Loeffler et al., 2007), con gravissime ripercussioni non solo in campo veterinario, ma anche in campo umano motivo per cui il fenomeno deve essere tenuto sotto controllo (Donskey, 2004; Paterson et al., 2005; Ben-Ami et al., 2006; Rossi et al., 2006; Lee et al., 2006; Schwaber et al., 2006; Pop-Vicas et al., 2008).

Nel caso specifico delle piodermiti il problema assume importanti proporzioni se pensiamo che il maggior responsabile della patologia è lo *Staphylococcus intermedius*, microrganismo commensale nel cane residente delle mucose, che viene, quindi, influenzato dagli antibiotici somministrati per il trattamento di infezioni di ogni genere. Nel Regno Unito è stata esaminata la sensibilità in 2.296 isolati canini (costituiti principalmente da *S. intermedius*) ottenuti da cute, orecchie e mucose, presso strutture veterinarie specialistiche, durante il periodo

1980-1996. La resistenza alla penicillina risulta aumentata dal 69% all'89%, la resistenza all'ossitetraciclina è rimasta intorno al 40%, quella all'eritromicina, alla lincomicina ed al cotrimossazolo ha raggiunto un picco prossimo al 20% e 15%, rispettivamente, nel 1987-89, ma in seguito ha mostrato una caduta (Lloyd et al., 1996). Altri dati interessanti provengono dai programmi nazionali di monitoraggio dell'antibiotico resistenza di Svezia e Norvegia. I dati svedesi, raccolti dal 1992, indicano per lo *S. intermedius* (isolato da infezioni cutanee) una resistenza verso macrolidi, lincosamidi e tetracicline tra il 18 e il 30% (SVARM, 2003); i dati norvegesi del 2000, rapportati a quelli del 1986, rivelano un incremento della resistenza verso la tetraciclina di quasi il 50% (20% vs 36%) (NORM-VET, 2003).

Table IV. Comparative analysis of antimicrobial resistance in canine *S. intermedius* isolates from different studies conducted between 1986 and 1995 in the USA [46], the UK [50], Denmark [56], and USA/Germany [25].

Antimicrobial agents	Numbers (percentages) of resistant canine <i>S. intermedius</i> isolates			
	USA 1986 (n = 197)	UK 1992 (n = 96)	USA/Germany 1992 (n = 116)	DK 1995 (n = 50)
tetracycline	104 (52.8)	50 (52.1)	35 (30.0)	10 (20.0)
penicillin	163 (82.7)	77 (80.2)	n.d.	30 (60.0)
erythromycin	52 (26.4)	9 (9.4)	15 (12.9)	n.d.
linco-/clindamycin	49 (24.9)	n.d.	15 (12.9)	n.d.
streptomycin	n.d.	6 (6.3)	27 (23.3)	n.d.
gentamicin	0	n.d.	1 (0.9)	n.d.
sulfonamides/ trimethoprim	17 (8.6)	n.d.	n.d.	0
enrofloxacin	n.d.	n.d.	n.d.	0
chloramphenicol	21 (10.7)	n.d.	7 (6.0)	8 (16.0)

Tab.2: confronto tra i dati raccolti in diversi paesi riguardo l'antibiotico resistenza dello *S. intermedius* (Werckenthin et al., 2001).

L'acquisizione della resistenza antimicrobica da parte di *S. intermedius* è associata a ripetuti trattamenti (Noble et al., 1992) e può essere acquisita mediante trasferimento di plasmidi o essere di tipo cromosomico. A tale proposito è stato isolato un gene CAT (*chloramphenicol acetyltransferase*), di origine plasmidica, che codifica per la resistenza al cloramfenicolo, insieme a quattro geni di origine cromosomica, che determinano resistenza alla tetraciclina (geni *tet*), tra i quali il

tet (M) è frequentemente rinvenuto in ceppi di *S. intermedius* resistenti (Schwarz et al., 1998; Kim et al., 2005).

Table 2. Antimicrobial resistance amongst 160 *S. intermedius* isolates from pyoderma in dogs

Antibiotics	Abbreviation	Number resistant	%
Amoxicillin/clavulanic acid	AMC	2	1.3
Cephalothin	CF	7	4.4
Ciprofloxacin	CIP	41	25.6
Chloramphenicol	CM	29	18.1
Clindamycin	CC	76	47.5
Erythromycin	E	77	48.1
Gentamicin	GM	71	44.4
Neomycin	N	3	1.9
Norfloxacin	NOR	37	23.1
Oxacillin	OX	15	9.4
Penicillin	P	130	81.3
Trimethoprim/sulphamethoxazole	SXT	91	56.9
Tetracycline	TE	144	90.0

Tab.3: antibiotico resistenza in 160 casi di isolamento di *S. intermedius* (Kim et al., 2005).

Diversi studi hanno dimostrato, inoltre, la presenza di ceppi meticillino-resistenti di *S. aureus* (MRSA), *S. intermedius* (MRSI) e *S. schleiferi* (MRSS) in cani sani o affetti da patologie infiammatorie cutanee (Morris et al., 2006; Griffeth et al., 2008). La meticillina (β -lattamico) nasce nel 1959 come prima molecola efficace nelle infezioni da stafilococchi produttori di penicillasi, attualmente caduta in disuso per i numerosi fenomeni di antibiotico resistenza. Questa è dovuta alla modificazione delle proteine batteriche che legano la penicillina (PBP); in particolare l'acquisizione del gene *mec-A* da parte del germe determina la codifica di una PBP-2a insensibile all'azione di tutti i β -lattamici. Il batterio riesce a sintetizzare comunque il peptidoglicano anche in presenza di meticillina, poiché l'affinità tra quest'ultima e le PBP-2a è molto scarsa (Guardabassi et al., 2004).

Il crescente sviluppo nel mondo animale di ceppi meticillino-resistenti potrebbe favorire una trasmissione all'uomo di questi o dei geni che codificano per la resistenza, con possibili ripercussioni nell'ambito della salute pubblica. Quanto

detto vale soprattutto per la trasmissione di MRSA, considerando che *S. aureus* è comunemente presente sulla cute dell'uomo e può dar vita ad infezioni suppurative locali cutanee, o in diversi distretti, che vengono comunemente trattate con β -lattamici (Guardabassi et al., 2004).

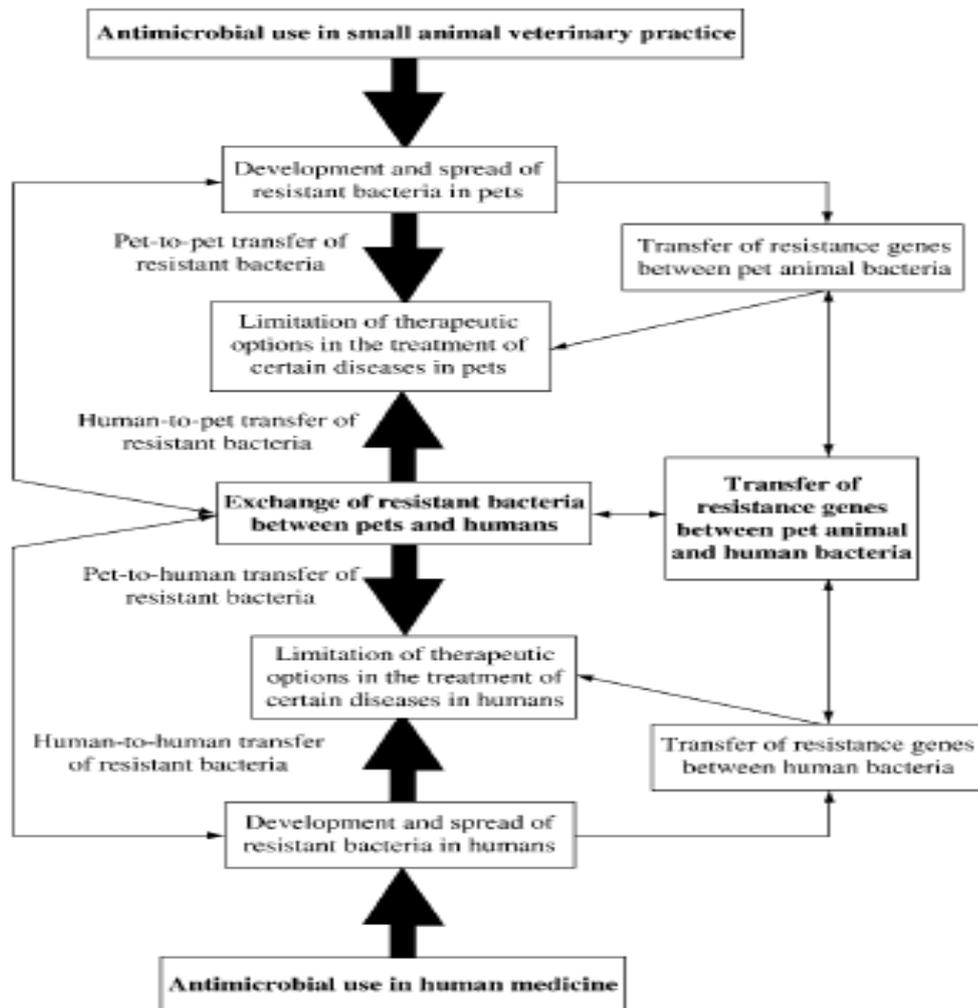


Fig. 5: rappresentazione schematica delle conseguenze dell'uso di antibiotici in medicina veterinaria ed umana sullo sviluppo di ceppi resistenti (Guardabassi et al., 2004).

La possibilità di risolvere le patologie sostenute da batteri, come le piodermiti, senza indurre antibiotico resistenza, è fortemente auspicabile ma di difficile realizzazione, vista la diffusione della patologia e l'assenza di alternative all'utilizzazione degli antibiotici (Pop-Vicas et al., 2008).

2.3 Fisiopatologia della guarigione delle ferite

La guarigione è un processo biologico atto a ripristinare la continuità tissutale dopo una lesione. Si tratta di una combinazione di eventi fisici, chimici e cellulari che si innescano subito dopo il trauma e si articola in quattro fasi: la fase infiammatoria, di detersione, riparativa e di maturazione.

Fase infiammatoria: l'infiammazione è una risposta protettiva dei tessuti evocata dal trauma. Questa fase è caratterizzata dall'aumento di permeabilità vascolare, chemiotassi delle cellule circostanti, rilascio di citochine e fattori di crescita nonché attivazione cellulare (macrofagi, neutrofili, linfociti, fibroblasti). I vasi sanguigni inizialmente si contraggono (per 5/10 min) per limitare l'emorragia ma, in seguito, si dilatano aumentando la permeabilità vascolare, e rilasciano nella ferita i fattori della coagulazione e il fibrinogeno. L'aggregazione piastrinica forma un coagulo che assicura l'emostasi, le piastrine rilasciano sostanze chemioattrattive e fattori di crescita che sono necessari in tutte le fasi della riparazione cicatriziale. La formazione del coagulo di fibrina stabilizza i margini della ferita, offre una barriera immediata all'infezione e alla perdita di fluidi. I mediatori dell'infiammazione (istamina, serotonina, enzimi proteolitici, chinine, prostaglandine, complemento, enzimi lisosomiali, trombossani, fattori di crescita) avviano il processo infiammatorio che inizia immediatamente dopo il trauma e dura 3-5 giorni. I leucociti, giunti nella ferita dai vasi sanguigni, daranno inizio alla fase di detersione (Fossum, 2013).

Fase di detersione: durante questa fase un essudato composto da leucociti, tessuto non vitale e fluidi ricopre la ferita. Neutrofili e monociti giungono rispettivamente 6 e 12 ore dopo il trauma, iniziando la rimozione dei detriti. I monociti si trasformano in macrofagi entro 24-48 ore e rimuovono i tessuti necrotici, i batteri e il materiale estraneo; secernono inoltre fattori chemiotattici e di crescita, quali PDGF, TGF-alfa, TGF-beta, interleuchina-1 che possono avviare e coordinare la formazione del tessuto di granulazione. I macrofagi, inoltre, attivano le cellule mesenchimali stimolando l'angiogenesi (Fossum, 2013).

Fase riparativa: inizia in genere 3-5 giorni dopo il trauma, è caratterizzata dalla proliferazione fibroblastica indotta dai macrofagi e dalle citochine che rilasciano il

TGF- β . Questo stimola a sua volta i fibroblasti a produrre fibronectina la quale favorisce il legame cellulare. Uno stato di leggera ipossia, comunque mai inferiore a 20 mmHg e una modesta acidità dei tessuti, stimolano anch'essi la proliferazione fibroblastica con conseguente produzione di collagene. I fibroblasti originano dalle cellule indifferenziate mesenchimali del connettivo circostante la ferita e migrano, verso questa, attraverso le catene di fibrina del coagulo; ciò accade appena dopo la fase infiammatoria. Infine invadono la lesione per sintetizzare collagene, elastina, proteoglicani che maturano nel tessuto fibroso. La sintesi del collagene è associata all'aumento della resistenza alla tensione della lesione. A mano a mano che la ferita va incontro a maturazione, avviene un notevole incremento del rapporto fra il collagene di tipo I, maturo, e quello di tipo II, immaturo, che raggiunge il suo massimo entro 2-3 settimane dopo il trauma. In questa fase prende avvio anche il processo di angiogenesi (o neoangiogenesi) che porta alla proliferazione delle cellule endoteliali. Queste originano da vasi sanguigni già esistenti, attraverso cordoni di cellule endoteliali (le gemme capillari) che si cavitano e si allungano verso la sede della lesione, all'interno della quale si anastomizzano con altre gemme e altri vasi interrotti dal trauma. Questo sviluppo è indotto sia dai macrofagi, che rilasciano fattori mitogeni e chemiotattici per le cellule endoteliali, sia dalla bassa concentrazione di O_2 (leggera ipossia) e dall'aumento di acido lattico (catabolismo del glucosio in condizioni di ipossia), che influiscono sulla proliferazione delle cellule endoteliali citochino-indotta. La neoangiogenesi ha la funzione di nutrire ed ossigenare le cellule del tessuto di granulazione, principalmente fibroblasti, che dovranno colmare la perdita di sostanza mediante la produzione della Matrice Extra-Cellulare (ECM). La proliferazione dei vasi endoteliali, perpendicolari al piano cutaneo, è responsabile della caratteristica presenza dei puntini rossi, o granuli, che hanno dato il nome al tessuto di granulazione.

Il *tessuto di granulazione* si forma a livello di ciascun margine della lesione alla velocità di 0.4-21 mm/die riempiendo le perdite di sostanza causate dal trauma e proteggendo i tessuti sottostanti. Rappresenta una efficace barriera contro le infezioni e, contemporaneamente, una superficie di migrazione delle cellule endoteliali presenti sui margini della lesione. Una parte dei fibroblasti proliferati

nel tessuto di granulazione, si trasforma in miofibroblasti che determineranno la contrazione della ferita nel tentativo di diminuire la distanza tra i lembi da riepitelizzare.

La riepitelizzazione inizia dalla proliferazione degli strati basali situati ai margini della ferita per proseguire in senso centripeto fino a che il contatto fra le cellule epiteliali funge da segnale di stop (inibizione da contatto). Quello che si forma è un mono strato epiteliale molto fragile che si ispessisce gradualmente dopo la formazione della membrana basale. L'epitelizzazione avviene più velocemente in un ambiente umido e ricco di ossigeno piuttosto che secco e anossico. La contrazione della piaga determina una trazione verso l'interno dei margini della ferita, la cute circostante viene stirata e assume un aspetto stellato fino a che i margini non si incontrano (circa 5-9 giorni dal trauma) (Fossum, 2013). Nelle ferite suturate in cui l'apposizione dei margini è buona e guariscono per prima intenzione, l'epitelizzazione inizia quasi immediatamente giacché non ci sono perdite di sostanza che devono essere colmate dal tessuto di granulazione.

Fase di maturazione: la resistenza del tessuto riparativo raggiunge il suo livello massimo grazie a cambiamenti che avvengono nella cicatrice durante la fase di maturazione. Le fibre collagene si rimodellano, modificando il loro orientamento e incrementando l'unione delle catene polimeriche conferendo così maggiore resistenza ai tessuti. Aumentano progressivamente le fibre collagene di tipo I mature e il numero di capillari diminuisce (Fossum, 2013).

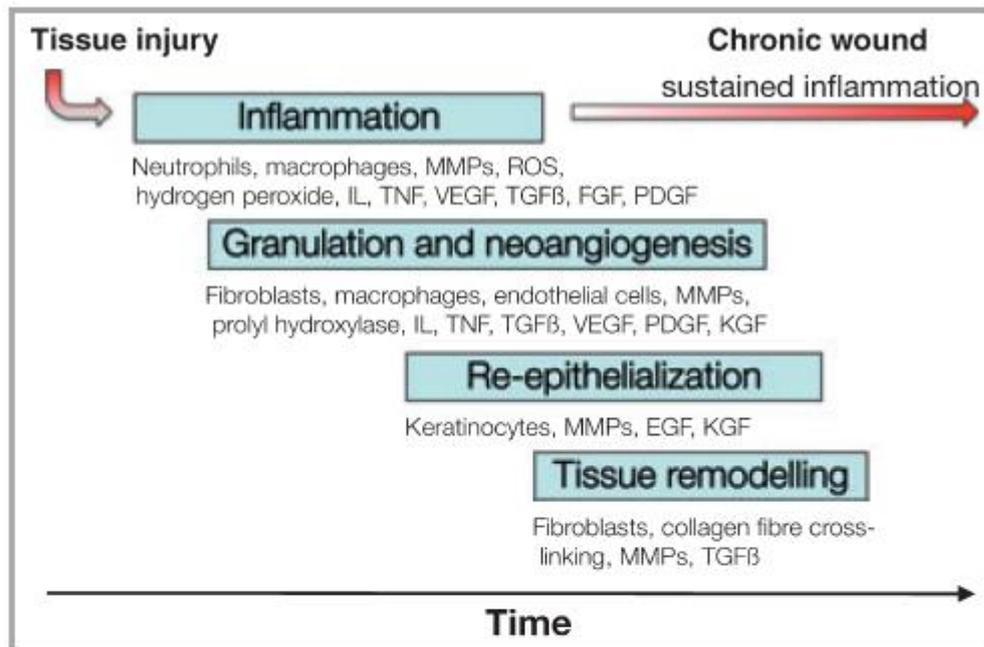


Fig 1. Wound healing phases. The inflammatory phase starts after tissue injury. At this stage, cytokines, chemokines and reactive oxygen species are released and cells are recruited to the wound site. In the subsequent proliferative phase (neoangiogenesis, tissue formation, re-epithelialization) new tissue is formed by endothelial cells, fibroblasts and keratinocytes. After these initial steps, tissue remodelling starts. EGF, epidermal growth factor; FGF, fibroblast growth factor; IL, interleukin; KGF, keratinocyte growth factor; MMPs, matrix metalloproteinases; PDGF, platelet-derived growth factor; ROS, reactive oxygen species; TGF, transforming growth factor; TNF, tumour necrosis factor; VEGF, vascular endothelial growth factor.

Fig. 6 Fasi del processo infiammatorio (Schreml et al. 2010).

La **cicatrizzazione** può avvenire per prima o seconda intenzione:

Prima intenzione: tipica delle ferite da taglio o chirurgiche caratterizzate da scarsa perdita di sostanza, margini regolari e giustapposti, scarsa reazione flogistica, guarigione rapida in 7-12 giorni;

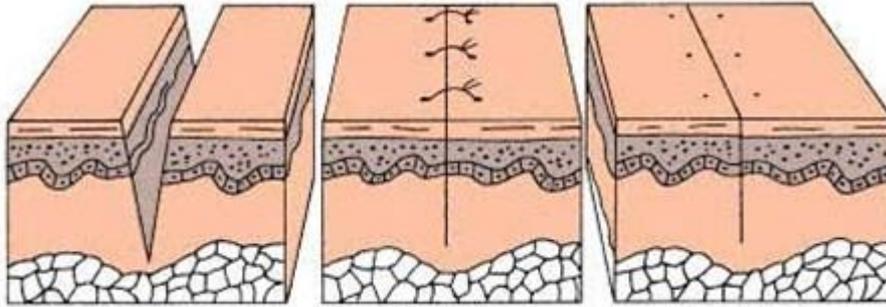


Fig. 7: esempio di cicatrizzazione per prima intenzione (<http://slideplayer.it/slide/567597/>).

Per seconda intenzione: la perdita di sostanza non consente l'avvicinamento dei margini, la distanza tra questi deve essere colmata dal tessuto di granulazione neoformato. I margini possono essere frastagliati, lacerati o contusi e l'exeresi marcata così come la reazione flogistica, soprattutto se la ferita è infetta o presenta lembi traumatizzati, necrotici, che non vengono adeguatamente e prontamente rimossi. Il processo riparativo richiede un decorso che è influenzato dalla perdita di sostanza e dalla gestione della ferita.

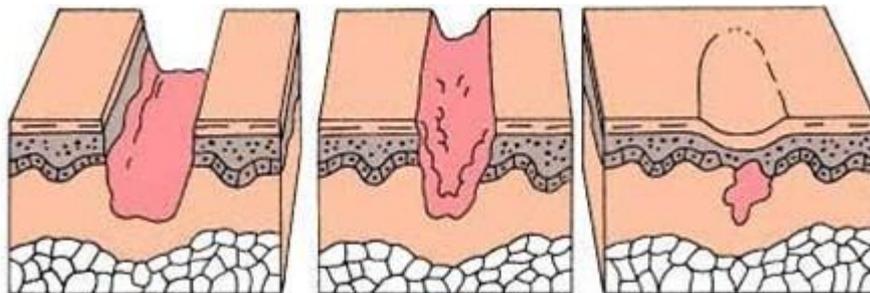


Fig. 8: esempio di cicatrizzazione per seconda intenzione (<http://slideplayer.it/slide/567597/>).

2.3.1. Fattori che influenzano la guarigione delle ferite

I fattori che influenzano il processo di guarigione delle ferite sono diversi e possono essere legati al paziente, alle condizioni in cui versa la ferita o alle influenze provenienti dall'ambiente esterno.

Fattori legati al paziente: possiamo affermare che, negli animali anziani, la guarigione si sviluppa più lentamente. Ciò è legato a diversi fattori quali:

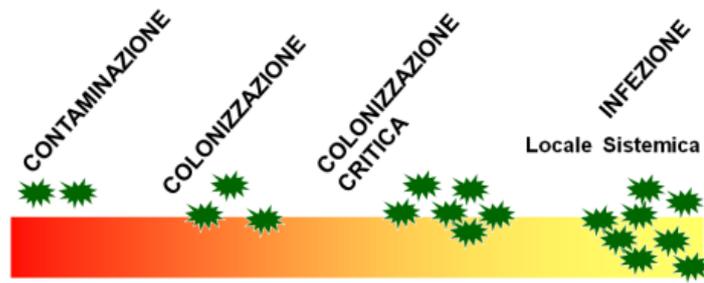
- ~ la senescenza d'organo che provoca un decremento della produzione dei fattori implicati nel processo cicatriziale. Infatti, alcuni autori hanno evidenziato un incremento dei fenomeni riparativi, altrimenti rallentati a causa dell'età avanzata, attraverso il trattamento della ferita rispettivamente con TGFβ-2 (Cox et al., 1992), o con *chondrolux*, peptide bioregolatore ricavato dalla cartilagine/tessuto osseo di vitello (Kurilov et al., 2009).
- ~ la presenza di malattie concomitanti: ad esempio le epatopatie possono causare riduzione dei fattori della coagulazione; l'iperadrenocorticismo ritarda la guarigione per l'eccesso di glucocorticoidi in circolo, malattie metaboliche come il diabete;
- ~ la debilitazione fisica: ad esempio soggetti denutriti, con una protidemia inferiore alla norma, possono presentare ritardi nella cicatrizzazione.

Fattori legati alla ferita: l'entità della reazione flogistica a livello della ferita assume un'importanza rilevante ai fini del corretto svolgimento del processo cicatriziale. La reazione infiammatoria è normale per i primi tre giorni ma diviene patologica ogni volta che si prolunga oltre i 3-5 giorni, sintomo di attecchimento e sviluppo di batteri patogeni (infezione).

Questa ultima condizione è sempre accompagnata da segni clinici classici: **dolor** (legato al rilascio di citochine infiammatorie che stimolano le fibre nervose sensitive e del dolore) **rubor** (legato all'arrossamento della lesione e dell'area perilesionale dovuto all'iperemia e all'aumento della permeabilità vascolare che favorisce la migrazione e la concentrazione delle cellule provenienti dal sangue con funzioni antibatteriche, leucociti, granulociti, ecc), **tumor** (rigonfiamento edematoso dei lembi, del fondo e della cute perilesionale, conseguente all'aumento della permeabilità vascolare e all'iperemia), **calor** (aumento della

temperatura locale per effetto dell'iperemia e dell'aumento del metabolismo locale) e **functio lesa** che in questo caso significa rallentamento o arresto del processo cicatriziale che non evolve verso la formazione del tessuto di granulazione (Gary et al., 2006; Brambilla et al., 2010). Lo stato di infezione dipende dal grado di trauma tissutale (lembi contusi, poco vascolarizzati e/o necrotici che diventano terreno di coltura per i batteri), dalla quantità di materiale estraneo presente (frammenti, terreno, sporcizia, peli, ecc, portatori di germi), dal tempo intercorso fra trauma e trattamento e, infine, dalle competenze immunitarie dell'ospite. La presenza di materiale estraneo sulla ferita innesca tutti i processi immunitari ed enzimatici atti a degradare il corpo estraneo; questi disturbano la produzione e l'organizzazione funzionale della matrice extracellulare, prolungando la fase infiammatoria e ritardando quella fibroblastica. Le tossine batteriche e gli infiltrati infiammatori, prodotti dalle cellule provenienti dal sangue per degradare dette tossine e ricchi in radicali liberi (ioni OH), possono causare necrosi e trombosi vascolare, mentre gli essudati derivanti dall'imponente iperemia vascolare dei siti infetti, impediscono meccanicamente l'adesione degli innesti cutanei sul fondo della ferita e creano un ambiente eccessivamente ipossico, inibente la migrazione delle cellule riparatrici (Margaret et al., 2008). E' molto importante individuare se una lesione è **infetta**, **contaminata** o **colonizzata** da agenti patogeni perché da questa valutazione dipendono le scelte terapeutiche locali e/o sistemiche che si dovranno intraprendere.

- ~ **Contaminazione:** presenza di microrganismi sulla superficie senza moltiplicazione;
- ~ **Colonizzazione:** presenza di microrganismi sulla superficie che si moltiplicano senza indurre reazione da parte dell'ospite (carica batterica mantenuta intorno a valori di 10^5);
- ~ **Colonizzazione critica:** notevole sviluppo di flora batterica con adesione ai tessuti e lieve reazione tissutale infiammatoria (infezione superficiale);
- ~ **Infezione:** presenza di microrganismi che si moltiplicano, invadono i tessuti profondi ed inducono una risposta infiammatoria tissutale con successivo danno.



Bibliografia: Thompson e Smith 1994, Dow et al. 1999, Sibbald et al. 2000

Fig. 9: stadi della colonizzazione batterica (Zorzi, L. Convegno Interregionale AIUC, PADOVA 17 APRILE 2010).

L'individuazione dei microrganismi responsabili dell'infezione, mediante esame culturale e la valutazione in vitro degli antibiotici sensibili o resistenti ai batteri isolati (antibiogramma), rappresenta un aspetto fondamentale per un corretto trattamento farmacologico. Con l'esame culturale viene individuato il microrganismo/i responsabile/i dell'infezione. Questo viene quindi testato nel terreno di coltura con una serie di antibiotici in modo da individuare quello/i a cui il batterio è più sensibile. Il resoconto di questo studio viene riportato nell'antibiogramma dove vengono elencati gli antibiotici testati, la relativa efficacia (sensibili o resistenti) e la concentrazione minima inibente. Il prelievo di materiale da sottoporre a cultura microbiologica può essere eseguito con tre differenti modalità: tampone, prelievo dell'essudato con siringhe e biopsia tessutale.

Fattori esterni: tra i fattori esterni che influenzano la riparazione delle ferite ricordiamo l'utilizzo di antisettici, corticosteroidi e FANS. La radioterapia, riducendo il numero dei vasi sanguigni, ritarda la maturazione del collagene e aumenta la fibrosi del derma. L'utilizzo di bendaggi troppo stretti è da prendere in considerazione per l'ischemia che provocano; ricordiamo, infatti, che

l'epitelizzazione e la sintesi fibroblastica sono processi ossigeno-dipendenti (Fossum, 2013).

2.3.2. Patologie della cicatrizzazione

Per patologia della cicatrizzazione intendiamo una condizione che devia dai normali fenomeni riparativi, in cui il processo cicatriziale risulta insufficiente o eccessivo rispetto le reali esigenze; lo sviluppo della cicatrizzazione è disturbato da eventi patologici che ne impediscono il normale processo evolutivo. Possono essere implicati processi infiammatori settici primitivi, secondari o stimoli irritativi (es. disinfettanti troppo concentrati) che possono indurre necrosi del tessuto di granulazione.

Tra le patologie della cicatrizzazione di annoverano:

- ~ **Sieroma:** la formazione di spazi morti sia a seguito del trauma o come conseguenza della dissezione chirurgica, può risultare in una raccolta, attraverso gli spazi sottocutanei, di trasudato sterile. Non è associato a dolorabilità ma può determinare un ritardo nella cicatrizzazione e formazione di aderenze (Fowler, 1999);
- ~ **Deiscenza:** perdita di tenuta della sutura; le cause possono essere stiramenti improvvisi, autotraumatismi, gestione insufficiente della medicazione, trattamenti terapeutici troppo aggressivi o sbagliati. Un fattore che predispone alla deiscenza è la localizzazione della ferita;
- ~ **Piaga esuberante:** tessuto di granulazione particolarmente rigoglioso o/e in rapido accrescimento (overgranulation) che sopravanza in altezza i piani circostanti. Le cause possono essere ricondotte a irritazione chimica e meccanica. L'evoluzione della piaga esuberante consiste nella maturazione a cicatrice ipertrofica, a seguito di un adeguato trattamento. E' tipica dei cavalli con ferite nelle parti distali degli arti e necessita di un protocollo di trattamento specifico come escissione chirurgica del tessuto in esubero e

fasciatura contenitiva per favorire l'epitelizzazione senza formazione di cicatrici ipertrofiche (Theoret et al., 2008);

- ~ **Cheloide cicatriziale:** tessuto di granulazione che conserva ancora i caratteri di immaturità e che continua a crescere in senso ultrafinalistico, sopravanzando in estensione e altezza i limiti della perdita di sostanza. Il cheloide se non viene fermato continua ad accrescersi. Le cause sono di natura chimica, meccanica (autotraumatismi), ma anche genetica come per alcune popolazioni africane o latino americane umane (Butler et al, 2008).

Tra le patologie della cicatrice ricordiamo:

- ~ **Cicatrice retratta:** retrazione eccessiva che consegue ad un'abbondante perdita di sostanza primitiva o secondaria (suppurazioni croniche) oppure dovuta ad estese ustioni o causticazioni. Può causare problemi estetici, morfologici e funzionali, determinando stiramento e costrizione degli organi o di strutture dotate di una certa mobilità quali sfinteri, labbra, palpebre ed esofago. Un certo grado di retrazione è fisiologico e legato all'addensamento delle fibre collagene;
- ~ **Cicatrice ipertrofica:** è l'esito di una piaga esuberante. Macroscopicamente si presenta come una massa rilevata bianco-grigiastra rugosa, non dolente, priva di annessi cutanei e peli, istologicamente costituita da tessuto fibroso maturo. Non recidiva se asportata chirurgicamente;
- ~ **Cicatrice metaplastica:** ha subito ossificazione o calcificazione.

2.4. Trattamento delle ferite (wound care and wound management)

In passato i medicinali tradizionali miravano alla semplice protezione meccanica ed asettica della ferita. Un grande passo in avanti nell'ambito del *wound care* si ebbe nel 1962, quando George Winter propose per primo il concetto di *moist wound healing* (guarigione umida della ferita), sottolineando l'importanza di creare un ambiente umido per favorire i processi di cicatrizzazione. Sulla base di queste prime acquisizioni, si arriva fino alla creazione del concetto circolare e dinamico di **TIME** (Stojadinovic et al., 2008; Schultz, 2012). **TIME** è l'acronimo di: **T**essuto, **I**nfezione (Infiammazione), **M**acerazione (Secchezza), progressione del margine **E**piteliale. Con l'approccio **TIME** si intende uno standard ottimale di trattamento che garantisce una rapida ed efficace cicatrizzazione e rappresenta, dunque, un'indispensabile guida per chi approccia alla gestione di una lesione cutanea.

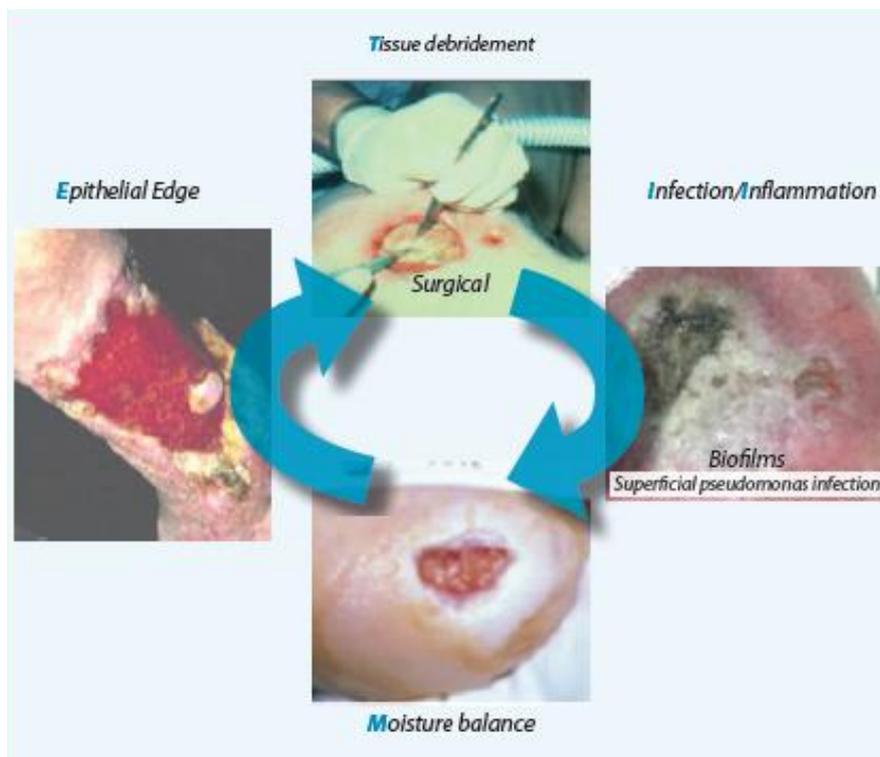


Fig. 10: concetto dinamico di **TIME** (Schultz and Dowsett, 2012).

~ **T:** acronimo di **TISSUE** fa riferimento alla preparazione del letto della ferita attraverso il *debridement* del tessuto necrotico e non vitale che altrimenti rappresenterebbe un ostacolo all'innescò del processo di guarigione attraverso diversi meccanismi che sono elencati nella tabella seguente;

Il tessuto non vitale:
Costituisce un ottimo terreno per la crescita batterica con aumento del rischio di infezione;
Prolunga la fase infiammatoria e l'infiltrazione dei leucociti inibendo la fagocitosi;
Rende difficile la valutazione della profondità di ferita e l'estensione del danno tessutale;
Contribuisce all'aumento dell'odore della ferita;
Limita l'efficacia della terapia antibiotica;
Inibisce la migrazione delle cellule epiteliali;
Aumenta il rischio di cicatrici ipertrofiche (in particolare nelle ustioni);
Prolunga il riempimento e la chiusura della ferita;
L'esito cicatriziale può risultare cosmeticamente non ottimale.

Tab. 4: conseguenze della mancata rimozione dei tessuti non vitali (Schultz and Dowsett, 2012).

~ **I: INFLAMMATION** (o **INFECTION**) fa riferimento allo stato infiammatorio delle lesioni, dovuto a complicazioni infettive, che devono essere tenute sotto controllo e rimosse pena la compromissione del processo di guarigione;

~ **M: MOISTURE** la superficie della lesione deve essere mantenuta sempre sufficientemente idratata per evitare l'eccessiva disidratazione, utilizzando *dressing* adeguati; anche l'eccessiva perdita di liquidi dalla ferita deve essere tenuta sotto controllo utilizzando *dressing* atti ad assorbirne l'eccesso causato da trasudazione ed essudazione;

~ **E: EPIDERMAL ADVANCEMENT** fa riferimento all'avanzamento dei margini della ferita come prova clinica del buon andamento del processo

cicatrizziale. Il concetto di *epidermal edge advancement* viene oggettivamente quantificato mediante l'utilizzazione di metodi di misurazione di contrazione dell'area cicatrizziale.

Per poter essere comparati con altri approcci terapeutici, i concetti compresi nell'acronimo *TIME* devono essere classificati e quantificati in qualche modo. A tale scopo, diversi autori, hanno studiato dei sistemi di quantificazione dei parametri che sono considerati indicativi dell'evoluzione del processo cicatrizziale. Questi, possono risultare utili per il rilevamento oggettivo dei dati in corso di studi clinici. Tra i più recenti ricordiamo “*Wound Bed Score*” (WBS) (Falanga et al., 2006) e lo “*Scaled Healing Assessment Index Algorithm*” (Shai et al., 2007). Il primo metodo si basa su una scala da 0 a 2 che considera otto parametri, il secondo è una valutazione colorimetrica (da 1 a 10) in cui i valori crescono al passaggio dalla colorazione giallastra e sporca della superficie, fino al colore rosso ottimale del tessuto di granulazione (Shai et al., 2007).

New Wound Bed Score (WBS) and Its Individual Features ^a			
Wound bed score characteristics	0	1	2
Healing edges	None	25–75%	> 75%
Black eschar	> 25% of wound surface area	0–25%	None
Greatest wound Depth/granulation Tissue	Severely depressed or raised when compared to peri-wound skin	Moderate	Flushed or almost even
Exudate amount	Severe	Moderate	None/mild
Edema	Severe	Moderate	None/mild
Peri-wound Dermatitis	Severe	Moderate	None or minimal
Peri-wound Callus/fibrosis	Severe	Moderate	None or minimal
Pink wound bed	None	50–75%	> 75%

^aThe total WBS adds each individual score for each characteristic to give a total score. The maximum possible score (best score) is 16. The minimum possible score (worst score) is 0.

Tab. 5: tabella dei parametri valutati nel WBS (Falanga et al., 2006).

2.4.1 Protocollo di wound management

Le ferite devono essere coperte con un bendaggio pulito e asciutto, immediatamente dopo il trauma o al momento della visita, per prevenire l'ulteriore contaminazione e l'emorragia. Prima di proseguire con i trattamenti successivi bisogna stabilizzare il paziente. Quando appropriato, la ferita dovrebbe essere valutata e classificata.

La procedura iniziale prevede il “*Wound cleansing*” (lavaggio della ferita) con lo scopo di ridurre meccanicamente il numero di batteri, rimuovere i contaminanti grossolani e permettere il distacco e il dilavamento dei detriti necrotici (Whitney et al., 2006). Può essere efficacemente praticato con semplice acqua di rubinetto (potabile e non inquinata) o con Soluzione Salina sterile (0,9%) che, pur non avendo specifiche attività antisettiche, sembra facilitare la riduzione della carica microbica (Atiyeh et al., 2009). In aggiunta si possono utilizzare detergenti non citotossici, che agiscono come un surfactante distruggendo il legame ionico che si instaura tra i microrganismi, le particelle estranee e la ferita, permettendo un facile risciacquo (Fossum, 2013). Si può ricorrere anche ad un lavaggio ad alta pressione usando delle siringhe (da 35-60 ml) per favorire il dilavamento. Il *Wound Cleansing* deve essere praticato sin dai primi momenti del danno e viene routinariamente ripetuto ad ogni cambio di medicazione, fino alla completa riparazione della lesione. È convinzione diffusa che sia indispensabile per il buon andamento del processo cicatriziale, nonostante letteratura in merito sia scarsa (Whitney et al., 2006).

L'uso di antisettici/antimicrobici, applicati direttamente su ferite aperte della cute (lacerazioni, abrasioni, ustioni, ulcerazioni), durante tutto il processo di guarigione, è oggetto di controversie non del tutto appianate (Drosou et al., 2003). Da un lato, infatti, permettono di prevenire e trattare l'infezione che altrimenti rallenterebbe la guarigione (Dow et al., 1999), dall'altro, possono indurre effetti citotossici verso fibroblasti, cheratinociti e leucociti (Lineaweaver et al., 1985; Cooper et al., 1991), essenziali nel processo di cicatrizzazione; tuttavia questo effetto non si osserva a basse concentrazioni (Fleischer et al., 1997). I dispositivi antimicrobici, a differenza degli antibiotici, non hanno un'azione specifica su qualche attività metabolica dei microrganismi, ma agiscono indifferenziatamente

su tutti, distruggendoli o impedendone la moltiplicazione sui tessuti vivi, con un ampio spettro di azione (McDonnel et al., 1999; Taylor et al., 1999) senza sviluppo di fenomeni di resistenza (Drosou et al., 2003). Il loro uso più tradizionale è quello di detergere e disinfettare la superficie cutanea integra (prima di iniezioni intramuscolo o endovena, per la disinfezione di aree cutanee da sottoporre a manovre invasive, per la disinfezione delle mani dei chirurghi, degli operatori sanitari) e le superfici delle strutture sanitarie (per la preparazione del distretto chirurgico e degli strumenti); per questo motivo contengono detergenti che li rendono particolarmente aggressivi per i tessuti vivi e tossici per le cellule, di conseguenza se ne sconsiglia l'uso sulle ferite aperte (Drosou et al., 2003; Atiyeh et al., 2009).

Segue un elenco dei più comuni antisettici utilizzati per il “*Wound Care*” (Sibbald et al., 2006).

Class and agent	Action	Effect in healing	Effect on bacteria	Comments
<i>Alcohols</i> Ethyl alcohol Isopropyl alc.	Dehydrates, denatures proteins and dissolves lipids	Cytotoxic May cause dryness and irritation on intact skin	Bactericidal and virucidal	Used as a disinfectant on intact skin.
<i>Biguanides</i> 0,02 – 0,05% <u>Chlorhexidine</u>	Acts by damaging the cell membranes	Relatively safe. Little effect on wound healing. Toxicity – small effect on tissue	Highly bactericidal against Gram + and-- organisms	Highly effective as hand washing agent and for surgical scrub. Binds to <i>stratum corneum</i> and has residual effect
<i>Halogen compounds</i> Sodium hypochlorite	Lyses cell walls	Acts as a chemical debrider	Gram-- microorganisms	High pH causes irritation to the skin

1% iodine Betadine	Oxidizes cell constituents especially proteins at – SH groups; iodinate proteins and inactivates them	Povidone iodine: <u>Cytotoxicity depends on dilution.</u> Potential toxicity <i>in vivo</i> related to concentration and exposure	Prevents and controls bacterial growth. <u>Resistance has not been reported.</u> Broad spectrum of activity, although decreased in the presence of pus or exudates.	Toxicity is of concern with prolonged use or application over large areas. Potential for thyroid toxicity.
Organic acids Acetic acid (0,25 – 1%)	Lowers surface pH	Cytotoxicity <i>in vitro</i> ; <i>in vivo</i> is concentration dependent	Effective against <i>Pseudomonas</i> . May be useful for other Gram – and <i>S. aureus</i>	Often burns and stings on application
Peroxides 3% Hydrogen peroxide	May induce cell death by oxidative damage	Can harm healthy granulation tissue and may form air emboli if packed in deep sinuses	Very little to absent antimicrobial activity	Acts more like a chemical debriding agent by dissolving blood clots and softening slough.
Tinctures Gentian violet	Very weak antiseptic	Carcinogenic and cytotoxic. May cause erosions, ulcers or areas of necrosis especially on mucous membranes	Kills Gram + organisms and some yeasts such as <i>Candida</i> , more effective at higher pH but can select out overgrowth of Gram – organisms.	High irritancy potential and occasional allergies
Mercurochrome	A very weak antiseptic with action inhibited in the presence of organic debris	Epidermal cell toxicity	Not enough data available	Contact allergen and irritant; systemic toxicity possible aplastic anemia

<i>Quaternary ammonium</i> Cetrimide	may inactivate some proteins	High toxicity to tissues	Gram + and --	very irritating to wounds
---	------------------------------	--------------------------	---------------	---------------------------

Tab. 6: elenco degli antisettici più utilizzati per il “Wound cleansing”(Sibbald et al., 2006).

Le controversie riguardo l’uso di questi presidi medici portano a concludere che il loro utilizzo rimane pienamente giustificato solo in caso di infezione conclamata e clinicamente accertata (Atiyeh et al., 2009), mentre deve essere inderogabilmente evitato in presenza di tessuto di granulazione sano e non infetto (Thomas et al., 2009); se utilizzati nelle concentrazioni giuste (es. clorexidina 0.05%) e nelle formulazioni più moderne (Iodio-cadexomero e composti a base di argento nano cristallino e/o contenenti anche alginato/carbossimetilcellulosa) possono anche facilitare il processo cicatriziale, grazie al loro effetto di riduzione della carica microbica superficiale che, pur non dando infezione, può essere di ostacolo alla riepitelizzazione (Drosou et al., 2003; Atiyeh et al., 2009).

Qualora fosse presente del tessuto necrotico sulla ferita, bisogna procedere con il “*Wound Debridement*” o **sbrigliamento** che consiste nella rimozione dei tessuti non vitali, essudati ed escare dal letto della ferita, con lo scopo di ottenere margini puliti e un fondo adatto alla chiusura primaria. Il tessuto necrotico rappresenta, infatti, un terreno di coltura per germi patogeni con conseguente rischio di infezione e riassorbimento di prodotti tossici, con ostacolo alla progressione del processo cicatriziale (Fossum, 2013). Conosciamo diversi metodi di *debridement* che possono essere utilizzati, in combinazione o sequenzialmente, in base alle necessità:

- ~ **Pulizia chirurgica:** mediante bisturi, elettrochirurgia o laser. Si procede dalla superficie verso le sezioni più profonde del tessuto necrotico, facendo attenzione a preservare ossa, tendini, nervi e vasi. Tuttavia frammenti ossei devitalizzati e sezioni muscolari devono essere rimossi, pena l’ostacolo alla completa granulazione dei margini della ferita; rappresenta il metodo più veloce ed efficace ma determina abbondante sanguinamento (Fossum, 2013);

- ~ **Detersione autolitica:** consiste nel creare un ambiente umido che consenta agli enzimi endogeni di dissolvere il tessuto non vitale. Si ottiene con bendaggi idrofilici occlusivi o semioclusivi che evitano la dispersione di vapore acqueo e mantengono ben idratata la superficie; la reidratazione dei tessuti devitalizzati ed essiccati ne favorisce il distacco da quelli sani. La tecnica può richiedere qualche settimana ed è consigliata nei soggetti con tendenza al sanguinamento (Margaret et al., 2008);
- ~ **Detersione con bendaggio (meccanico):** le garze aderiscono alla superficie della lesione strappando gli strati più superficiali nel momento in cui vengono rimosse. La tecnica ha un'efficacia controversa perché è poco selettiva verso i tessuti necrotici e può portare al danneggiamento del tessuto di granulazione neoformato (Margaret et al., 2008);
- ~ **Detersione enzimatica:** viene attuata tramite l'applicazione topica di enzimi proteolitici, di origine esogena, atti a coadiuvare e migliorare in modo sinergico l'azione degli enzimi proteolitici endogeni, spontaneamente attivati, per ottenere la liquefazione, dissoluzione e digestione dei tessuti non vitali (Margaret et al., 2008). L'enzima di origine esogena più studiato e utilizzato è la collagenasi batterica estratta dal *Clostridium histolyticum*, che presenta un'elevata specificità per i tipi di collagene maggiormente rappresentati a livello cutaneo (Romanelli et al., 2001); di pari efficacia è la Papain-urea, che contiene la papaina, enzima proteolitico, e l'urea, denaturante proteico;
- ~ **Detersione biochirurgica:** vengono utilizzate larve di mosca *Lucilia sericata* che effettuano detersione mediante il rilascio di enzimi proteolitici (Fossum, 2013).

Il passo successivo verso l'appropriato trattamento delle ferite prevede il “**Wound Dressing**”. I *dressing* possono essere raggruppati in quattro categorie:

1. *Primary dressing:* viene applicato direttamente a contatto con la superficie lesa e può avere un gran numero di intenti in funzione della gravità e della posizione della lesione, sebbene tutto è sostanzialmente focalizzato alla

promozione del recupero anatomico e funzionale della ferita ed alla prevenzione di ulteriori danni (Margaret et al., 2008);

2. *Secondary dressing*: serve a mantenere in situ il dressing primario;
3. *Occlusive dressing*: proteggono la ferita dall'ambiente esterno e creano un ambiente umido;
4. *Semi-occlusive dressing*: permettono, solo in parte, il passaggio di ossigeno e l'evaporazione dal sito della ferita.

Il *dressing* occlusivo e quello semi occlusivo mirano ad evitare la perdita dei liquidi dalla superficie lesa, si basa sul concetto che i fluidi naturali, essudanti dalla lesione, contengano *Growth Factors* e principi attivi che facilitano e dirigono gli eventi del processo cicatriziale fino alla risoluzione; creano una benefica ipossia che stimola la neoangiogenesi per un sano sviluppo del tessuto di granulazione (Knighton et al., 1981; Alvarez et al., 1983; Margaret et al., 2008). Possono essere utilizzati: nelle fasi di *debridement* autolitico per facilitare i processi digestivi e colliquativi di modiche quantità di tessuti non vitali da rimuovere; per mantenere adeguatamente idratata la superficie lesa (*moisturising dressing*) ed evitare il disseccamento del letto della ferita, specie durante la fase di granulazione; per assorbire l'eccesso di essudato.

Un *dressing* "ideale" dovrebbe:

- ~ rimuovere l'eccesso di essudato;
- ~ mantenere un ambiente umido;
- ~ proteggere dalla contaminazione;
- ~ non causare trauma con la rimozione;
- ~ non lasciare frammenti sulla ferita;
- ~ alleviare il dolore;
- ~ non indurre reazioni allergiche (Margaret et al., 2008).

Nella pratica clinica, i *primary dressings* più utilizzati sono: Idrogel, Idrocolloidi e Alginati associati o meno a spugne o granuli assorbenti. Annoveriamo anche "*topical agents o biological agents*", che comprendono un'ampia categoria di

sostanze, spesso molto diverse tra loro, che spaziano da prodotti di derivazione naturale (*Growth factors*, acido ialuronico, biomolecole) o sintetici e semisintetici, in genere sostitutivi della pelle (biomembrane autologhe o sintetiche), che interagiscono attivamente con le strutture cellulari e proteiche del letto della ferita modulandone alcuni processi fisiologici del processo cicatriziale.

Product	Advantages	Disadvantages	Indications	Comment
Gauzes	Inexpensive Accessible	Drying Poor barrier	Packing deep wounds	Change every 12-24 hours
Films	Moisture-retentive Transparent Semioclusive Protects wound from contamination	No absorption Fluid trapping Skin stripping	Wounds with minimal exudate Secondary dressing	Can leave in place up to 7 days or until fluid leaks
Hydrogels	Moisture-retentive Nontraumatic removal Pain relief	May overhydrate	Dry wounds Painful wounds	Change every 1-3 days
Hydrocolloids	Long wear-time Absorbent Occlusive Protects wound from contamination	Opaque Fluid trapping Skin stripping Malodorous discharge	Wounds with light to moderate exudate	Can leave in place up to 7 days or until fluid leaks
Alginates and hydrofibers	Highly absorbent Hemostatic	Fibrous debris Lateral wicking (alginates only)	Wounds with moderate to heavy exudate Mild hemostasis	Can leave in place until soaked with exudate
Foams	Absorbent Thermal insulation Occlusive	Opaque Malodorous discharge	Wounds with light to moderate exudate	Change every 3 days

Tab.7: sintesi dei *Wound dressing* di base (Margaret et al., 2008).

Idrocollidi: interagiscono con gli essudati della ferita per formare un gel umido di rivestimento. Lo strato assorbente può essere costituito da carbossimetilcellulosa, gelatine, pectine; al di sopra di questo troviamo un film impermeabile a fluidi, gas e batteri. Sono indicati nel trattamento di ferite con scarsa quantità di essudato, ferite in fase di granulazione o in presenza di tessuto necrotico; sono frequentemente utilizzate nelle ulcere venose e da decubito. Risultano ideali nel creare un ambiente idoneo al *debridement* autolitico (Seaman et al., 2002).

Table VI
Hydrocolloids

Product	Company	Cost/wk	Comment
Tegasorb	3M	\$13.06	Becomes transparent with use ¹¹⁰ Film backing
DuoDERM CGF	ConvaTec	\$17.00	Prevents lateral invasion of microorganisms from the dressing edge ⁵¹ Foam backing
Comfeel Plus	Coloplast	\$19.16	Contains alginate for increased absorption Film backing

Tab. 8: elenco degli Idrocolloidi più utilizzati (Margaret et al., 2008).

Idrogel: sono polimeri umettanti composti da acqua, con una percentuale che varia dal 60% al 94%. Provvedono principalmente a creare un ambiente umido sulla ferita ed hanno uno scarso potere assorbente. Sono indicati nel trattamento di lesioni caratterizzate da scarsa presenza di essudato, altrimenti andrebbero a favorire la macerazione della cute perilesionale. I fogli di idrogel sono molto efficaci nel ridurre il dolore infiammatorio della lesione, grazie alla sensazione di freddo che provocano per abbassamento della temperatura locale. Non sono efficaci per impedire l'eventuale colonizzazione batterica e necessitano di un dressing secondario per essere mantenuti in situ, non presentano difficoltà al cambio di dressing e non aderiscono alla lesione (Seaman et al., 2002).

Table V
Hydrogels and related products

Product	Company	Cost/wk	Comment
Restore hydrogel	Hollister	\$15.05	Amorphous gel
Carrasyn hydrogel	Carrington	\$15.40	Amorphous gel Contains aloe vera gel extract
SAF-Gel	ConvaTec	\$16.43	Contains alginate for increased absorption
Curagel	Kendall	\$12.90	Sheet hydrogel Superior pain control
XCell cellulose dressing	Xylos	\$36.43	Sheet of biosynthesized cellulose from <i>Acetobacter xylinum</i> bacteria Can absorb or donate moisture depending on wound microenvironment ¹⁹⁹

Tab. 9: elenco degli idrogeli più utilizzati (Margaret et al., 2008).

Alginati: sono derivati polisaccaridici, in forma di polimeri, a diverse percentuali di acido mannuronico e acido glucuronico, estratti da alghe brune marine e contenenti calcio e sodio (acido alginico o alginato di calcio e sodio). Assorbono circa 20 volte il proprio peso rappresentando il dressing ideale nei casi di lesioni altamente essudanti. Richiedono un *secondary dressing* per essere tenuti in situ (Seaman et al., 2002; Margaret et al., 2008).

Spugne di polimeri: sono dressing inerti, semi-occlusivi, formati da poliuretano microporoso, adatti ad assorbire una quantità di essudato moderata. Non aderiscono alla lesione e, pertanto, non provocano dolore al momento della rimozione. La loro capacità di assorbimento varia in funzione dello spessore. Gli studi comparativi hanno dimostrato che le spugne di poliuretano sono equivalenti agli idrocolloidi ma necessitano di cambi più frequenti, riducendo i vantaggi di economicità (Seaman et al., 2002; Margaret et al., 2008).

Collagene: sono matrici di collagene di origine animale (bovino, suino, equino) o umana, pensati per fornire una matrice strutturata all'interno della quale i processi cicatriziali sono facilitati. Il collagene facilita la concentrazione nel sito di lesione di macrofagi e neutrofili, favorendo l'aggregazione piastrinica, la granulazione e la riepitelizzazione. Dal punto di vista dell'efficacia, non sono state rilevate differenze significative nel tasso di cicatrizzazione tra il collagene e gli idrocolloidi, ma il primo risulta più costoso (Seaman et al., 2002; Margaret et al., 2008).

Table VII
Alginates and related products

Product	Company	Cost/wk	Comment
Kaltostat	ConvaTec	\$14.61	High guluronic acid content
Sorbsan	Bertek	\$12.15	High mannuronic acid content Tendency for lateral wicking ¹¹⁸
Tegagen	3M	\$9.71	Available in high integrity (HI) and high gelling (HG) formulations
AlgiSite	Smith & Nephew	\$11.12	High mannuronic acid content
Aquacel Hydrofiber	ConvaTec	\$15.81	Hydrofiber dressing composed of sodium carboxymethylcellulose (CMC) fibers More absorptive than alginates ²⁰⁰ Vertically wicks to prevent periwound maceration ²⁰¹

Tab. 10: elenco degli alginati più conosciuti (Margaret et al., 2008).

Table 1. Selecting the Appropriate Dressing		
Wound Characteristic	Goal of Therapy	Dressing Examples
High exudate	Exudate absorption	Absorptive wound fillers Foams (high moisture vapor transmission rate) Collagens Gauze
Low exudate	Maintain moisture	Hydrocolloids Foams (low moisture vapor transmission rate) Transparent films (secondary dressing over filler)
No exudate	Add moisture	Hydrogels Amorphous for wounds with depth Sheet for superficial wounds Transparent films: add small amount of amorphous hydrogel under film for rapid hydration Hydrocolloids: slower hydration than hydrogels or films
Clinically infected	Systemic treatment of infection Wick away exudate Wound cleansing	Use dressing appropriate for amount of exudate, but change dressing daily Avoid occlusive dressings Antimicrobial dressings may be used Saline irrigation (35 mL syringe/19 g needle)
High infection risk Immunosuppression Ischemic ulcer Diabetic foot ulcer	Prevent infection	Use dressing appropriate for amount of exudate, but change dressing every 1-3 days Use occlusive dressings with caution
Wound location	Prevent wound contamination Prevent maceration on plantar foot	Use adhesive dressings (films over filler, hydrocolloids, foams) in the sacral area to protect from incontinence Avoid dressings that will compress with ambulation and ooze onto surrounding skin (eg, hydrocolloids, paste wound fillers)
Skin quality	Fragile skin Risk of contact sensitivity Periwound maceration	Avoid adhesive dressings; use a sheet hydrogel on skin tears secured with gauze wrap or netting Avoid adhesive dressings or products with sensitizing preservatives Use skin sealants on surrounding skin for protection

Tab. 11: linee guida per la selezione del dressing più appropriato in relazione al tipo di ferita (Seaman et al., 2002).

Il *secondary dressing* è prevalentemente rappresentato dalle garze semplici, sovrapposte al *dressing primario*, tenute in situ con cerotti adesivi o bendaggi. Possono essere messe a diretto contatto con la lesione per assorbirne l'essudato (tecnica *Wet to Dry*) e se lasciate disseccare, tra un cambio e l'altro di *dressing*, risultano utili in fase di sbrigliamento (i tessuti non vitali si attaccano alle garze che possono, così, essere rimossi), ma in questo modo non si esclude il danno al tessuto di granulazione (Seaman et al., 2002), con rischio di emorragia e soprattutto grande dolore per il paziente (Margaret et al., 2008). Molte garze moderne sono impregnate con sostanze che ne impediscono l'adesione alla ferita mantenendo idratata la superficie (paraffina), perdendo però la capacità assorbente; oppure creano un ambiente ipertonico per contrastare l'aggressività batterica (soluzione salina ipertonica) e, contemporaneamente, prevenire lo

sviluppo in eccesso del tessuto di granulazione (Seaman et al., 2002). Le garze in forma di benda, infine, sono molto utili per zaffare e riempire gli spazi vuoti nelle lesioni con grande perdita di sostanza.

Table III
Gauzes

Product	Company	Cost/wk	Comment
Curity gauze sponge	Kendall	\$1.02	100% cotton sterile gauze
Curity packing strip	Kendall	\$3.08	½" width 100% cotton gauze ribbon
Vaseline gauze	Kendall	\$5.95	Gauze impregnated with petrolatum Less adherent than plain gauze
Xeroform	Kendall	\$25.90	Gauze impregnated with 3% bismuth tribromophenate (xeroform, an antiseptic and deodorizer) in petrolatum Less adherent than plain gauze
Mesalt	Mölnlycke	\$20.25	Hypertonic sodium chloride-impregnated gauze Highly absorbent Discourages bacterial growth Inhibits overexuberant granulation tissue formation
Iodoform impregnated packing strips	Derma Sciences/ Dumex Medical	\$2.73	½" width iodoform (antiseptic) impregnated gauze ribbon

Tab. 12: elenco delle diverse tipologie di garze utilizzate come *secondary dressing* (Margaret et al., 2008).

Possiamo concludere che, data la complessità biologica di ogni ferita, sarebbe opportuno improntare un protocollo terapeutico basato sui principi della “*dressing philosophy*” e quindi, sulla scelta del/i dressing in funzione della valutazione clinica della lesione e dell’effetto primario che si vuole ottenere (Ricci et al., 2006).

3. NEEM (*Azadirachta Indica*)

Il Neem è un albero nativo dell'India e della Birmania, appartenente alla famiglia delle Meliacee di cui conosciamo tre specie principali tra cui *Azadirachta indica*, anche conosciuta volgarmente come Margosta. “*Arishtha*” è il termine che in sanscrito vedico, la lingua dei più antichi testi sacri indiani (II millennio a.C), veniva utilizzato per definire l'albero del Neem, il cui significato è: “*capace di curare tutte le malattie*” (Biswas et al., 2002; Brahmachari, 2004). Questa parola nella sua semplicità ci permette di comprendere il polimorfismo terapeutico della pianta e come il suo utilizzo affondi le radici nel passato. Da circa duecento anni, infatti, le proprietà dell'albero del Neem sono riconosciute dal popolo indiano e da tradizioni mediche locali quali la medicina Ayurveda (Varma, 1976; Biswas et al., 2002).

Table1. Ayurvedic Uses of NEEM	
Part	Medicinal Use
Leaf	Leprosy, eye problem, epistaxis, intestinal worms, anorexia, biliousness, skin ulcers
Bark	Analgesic, alternative and curative of fever.
Flower	Bile suppression, elimination of intestinal worms and phlegm.
Fruit	Piles, intestinal worms, urinary disorder, epistaxis, phlegm, eye problem, diabetes, wounds and leprosy
Twig	cough, asthma, piles, phantom tumour, intestinal worms, spermatorrhoea, obstinate urinary disorder, diabetes.
Gum	Scabies, wounds, ulcers, skin diseases
Seed	Leprosy and intestinal worms
Oil	Leprosy and intestinal worms.

Tab. 1: usi del Neem nella medicina Ayurveda (www.scialert.net)

Oltre all'efficacia terapeutica è riconosciuto l'effetto pesticida, insetticida e parassiticida (Brahmachari, 2004).

3.1 Caratteristiche botaniche

DIVISIONE: *Spermatophyta*

SOTTODIVISIONE: *Angiospermae*

CLASSE: *Dicotyledones*

FAMIGLIA: *Meliaceae*

GENERE: *Azadirachta*

SPECIE: *A. indica*

Azadirachta Indica è un albero sempreverde che può raggiungere i 30 metri di altezza. Presenta una chioma di piccole foglie verde brillante, una corteccia rugosa e fessurata di colore grigio-marrone, fiori piccoli e bianchi che sbocciano in primavera e frutti simili ad olive. Cresce facilmente su terreni asciutti, rocciosi e argillosi; richiede scarse quantità di acqua e piena esposizione alla luce solare. Può crescere da semi o per talea con uno sviluppo molto lento nel primo anno di piantagione, durante il quale non tollera le basse temperature. E' stato introdotto dal XX secolo in Africa occidentale, Arabia Saudita, America centrale e meridionale e nelle isole caraibiche (www.ecoindia.com).



Fig. 1 albero del Neem (www.agraria.com)

3.2 Costituenti chimici e loro attività farmacologica

Risale al 1942 la scoperta e l'isolamento, da parte del ricercatore S. Siddiqui, di tre composti estratti dall'olio di semi del neem: nimbina, nimbinina, nimbidina. Da quel momento sono stati ricavati diversi componenti successivamente inclusi, in base alla struttura chimica, in due grandi categorie: *isoprenoidi* e *non isoprenoidi*. I primi, pur differendo per massa molecolare, gruppi funzionali e intelaiatura di atomi di carbonio, presentano un elemento strutturale comune ovvero due o più unità di atomi di carbonio, dette *unità isopreniche*. Tra questi possiamo citare diterpenoidi e triterpenoidi, che comprendono: protomeliacine, limonoidi, azadirone e derivati, gedunina e derivati, nimbina, azadiractina e salanina. I composti *non isoprenoidi* comprendono proteine, aminoacidi, molecole solforate e polifenoli come i flavonoidi. Segue una tabella che raggruppa le strutture chimiche dei più importanti principi attivi del Neem (Biswas et al., 2002; Brahmachari, 2004; Sudhir et.al., 2010).

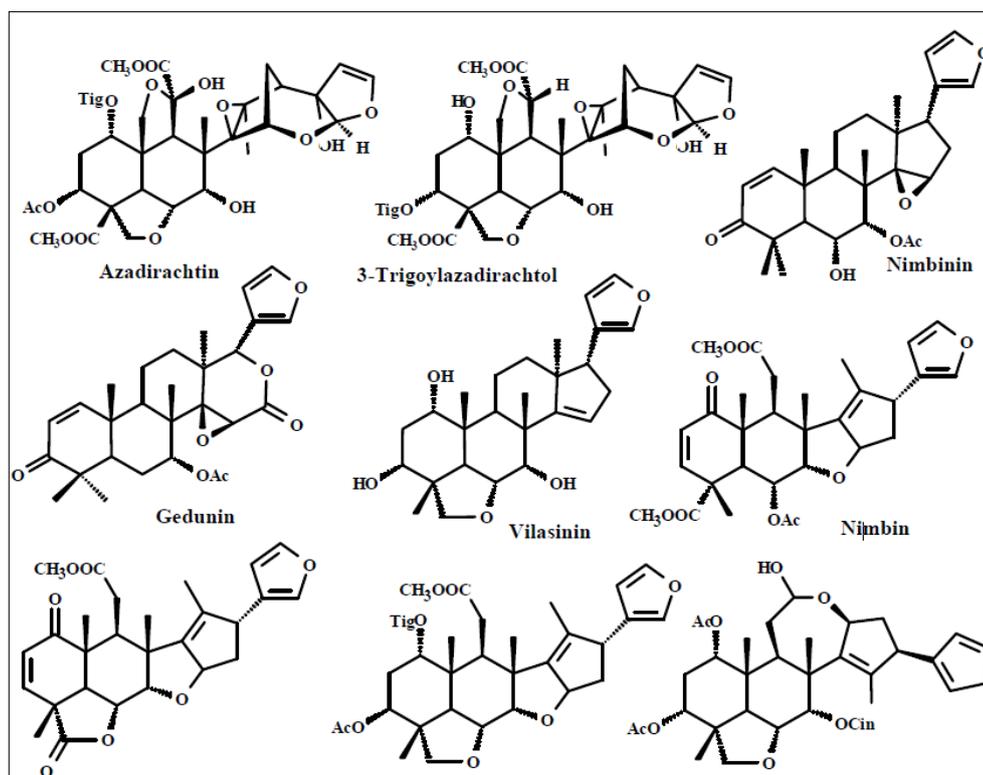


Fig.2: struttura chimica dei più importanti principi attivi del Neem (Sudhir, 2010).

L'attività biologica di questi estratti, avvalorata da numerose ricerche, vede effetti ipoglicemici, antiulcera, antiossidanti, anticarcinogenici, epatoprotettivi, diuretici, contraccettivi/spermicidi, antimalarici, anti-infiammatori, antipiretici, analgesici; inoltre evidenziamo diverse applicazioni in campo dermatologico (Khosla et al., 2000; Biswas et al., 2002; Sudhir et al., 2010).

- ~ **Effetti ipoglicemici:** riduzione significativa sia dei livelli di glucosio ematico (Chattopadhyay, 1999; Khosla et al., 2000) sia dell'azione dell'adrenalina e del glucagone sul metabolismo del glucosio (Murty et al., 1978; Chattopadhyay, 1996). Khosla registrò un effettivo calo della glicemia in conigli affetti da diabete indotto da allossano e trattati con estratti di foglie e semi di neem (Khosla et al., 2000); Chattopadhyay raggiunse lo stesso risultato su ratti affetti da diabete indotto da streptozotocina (sostanza tossica per le cellule β del pancreas). Il meccanismo d'azione sembra essere connesso alla capacità degli estratti della pianta di bloccare l'azione dell'epinefrina sul metabolismo del glucosio, incrementandone l'utilizzazione a livello periferico (Chattopadhyay, 1996). In commercio si possono trovare delle formulazioni omeopatiche utilizzate come supplemento alla dieta di soggetti diabetici, quali ad esempio "*Pancreas tonic*" (M/S Botanical Indian Laboratories Private Ltd., 2002) contenente estratti di diverse piante, incluso il neem;
- ~ **Effetto anti-ulcerogeno:** può essere attribuito alla nimbidina, contenuta negli estratti oleosi dei semi del neem, dove la presenza di acidi grassi (stearico e palmitico) gioca un ruolo importante nella guarigione delle ulcere (Divakar et al., 2001). Anche gli estratti acquosi della corteccia del neem sembrano possedere un effetto anti-ulcera e di riduzione della secrezione acida, grazie all'azione di un glicoside fenolico (Badyopadhyay et al., 2002). Questo è in grado di inibire, in vitro, l'attività della pompa H^+-K^+ ATPasi, di prevenire il danno ossidativo sulla mucosa gastrica bloccando il processo della lipoperossidazione lipidica e di degradare i radicali idrossilici. Paragonato alla ranitidina e all'omeoprazolo, quali

farmaci gastroprotettori per eccellenza, questo glicoside rivela un potere sovrapponibile se non superiore (Badyopadhyay et al., 2002);

~ **Effetto anticarcinogenico:** è stato dimostrato che azadiractina e nimbolina possiedono azione chemiopreventiva e antitumorale verso diversi tipi di neoplasie, attraverso meccanismi quali: inibizione della proliferazione cellulare, induzione della morte cellulare, riduzione dei fenomeni di angiogenesi (Hao et al., 2014). L'incontrollata proliferazione cellulare rappresenta una delle caratteristiche principali della crescita neoplastica e dello sviluppo di metastasi (Hanahan et al., 2011); gli estratti del neem sopprimono questo processo alterando la progressione del ciclo cellulare, quale complesso meccanismo regolato a più livelli dall'azione di complessi proteici. Tra questi giocano un ruolo importante le cicline e le chinasi ciclina dipendenti, che risultano essere il target d'azione della nimbolina (Roy et al., 2006). I componenti del neem, inoltre, possono innescare diverse forme di morte cellulare. I limonoidi, ad esempio, inducono apoptosi tramite il rilascio del *Cyt C* (citocromo c) che, liberato dai mitocondri, attiva un meccanismo a cascata per cui si ha un aumento del rilascio del calcio intracellulare e successiva attivazione delle caspasi, proteasi implicate nel fenomeno dell'apoptosi (Priyadarsini et al., 2010; Srivastava et al., 2012); l'azadiractina e la nimbolide, agiscono inducendone direttamente l'espressione genica (Priyadarsini et al., 2010) o determinando il rilascio dell'*apoptosis-inducing factor* (AIF) (Susin et al., 1999; Joza et al., 2001). Per quanto concerne l'effetto anti-angiogenico, modelli di studio in vivo evidenziano che la frazione etanolica dell'estratto delle foglie del neem è in grado di determinare *down-regulation* nei confronti delle proteine angiogeniche VEGF-A (*vascular endothelial growth factor*) prodotte dalle cellule neoplastiche (Arumugan et al., 2014). Infine si segnala un'azione inibente nei confronti del NF-κB (Nuclear Factor- κB) quale complesso proteico funzionante come fattore di trascrizione che si trova in tutti i tipi di cellule e gioca un ruolo importante nella carcinogenesi (Van Waes et al., 2007). Il NF-κB si ritrova nel citosol normalmente legato ad una proteina inibitrice (inhibitor of NF-κB, IκB)

che si distacca in seguito alla sua fosforilazione indotta da specifici segnali, permettendo la traslocazione del NF- κ B nel nucleo e la sua attivazione. Gli estratti del neem possono agire sia alterando l'azione di questa molecola regolatrice (I κ B), sia direttamente sul NF- κ B inibendone l'attivazione (Gupta et al., 2010; Priyadarsini et al. 2010; Schumacher et al., 2011; Manikandan et al., 2012).

- ~ **Effetto epatoprotettivo:** è stato provato l'effetto protettivo dell'estratto acquoso delle foglie del neem nei confronti della necrosi indotta dal paracetamolo nei ratti (Charles et al., 1992), insieme ad una significativa riduzione dei livelli sierici di ALT, AST, GGT (Biswas et al., 2002);
- ~ **Attività diuretica:** il sodio nimbidinato mostra una potente attività diuretica nel cane (Abraham et al., 1986), agendo a livello del tubulo renale come dimostrato in uno studio condotto su soggetti affetti da insufficienza cardiaca con relativo gruppo di controllo, non trattato con molecole dall'azione diuretica; la somministrazione di sodio nimbidinato nel primo gruppo porta ad un effetto diuretico non evidenziabile nel secondo (Shah et al., 1958);
- ~ **Attività antispermatogenetica/spermicida:** Aladakatti et al. (2001) dimostrarono che il trattamento con il neem per 48 giorni in ratti albini porta ad una riduzione del numero, motilità e velocità di avanzamento degli spermatozoi; questi effetti sono probabilmente dovuti ad una riduzione di androgeni conseguente ad un effetto antiandrogenico delle foglie della pianta. La salanina e il sodio nimbidinato mostrano effetto spermicida diretto; quest'ultimo a dosi di 2.5mg/litro uccide la totalità degli spermatozoi in un campione di liquido seminale di ratto in vitro (Sharma et al., 1959; Madhu et al., 2001);
- ~ **Attività antimalarica:** i componenti degli estratti alcolici delle foglie e dei semi del neem sono efficaci contro il *Plasmodium falciparum* anche nelle forme cloroquina resistenti (farmaco utilizzato per il trattamento della malaria) (Badani et al., 1987). È stata identificata inoltre una capacità di

inibizione della crescita e dello sviluppo sia delle forme asessuate sia sessuate del protozoo (Dhar et al., 1998).

~ **Attività antibatterica:** Zhang et al. (2010) hanno dimostrato l'attività in vitro di un componente estratto dal neem, il tetraidrofuranil diestere 1 (TD1). La molecola agisce contro *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis* verso la quale il composto risulta più attivo alla minima concentrazione inibente (MIC) di soli 2.5 mg/ml TD1;

~ **Attività antipiretica, anti-infiammatoria, anti-dolorifica:** l'effetto antipiretico è attribuibile alla nimbidina (Brahmachari, 2004).

Per quanto concerne l'effetto anti-infiammatorio, Chattopadhyay (1998) dimostra il potere della porzione idrosolubile dell'estratto alcolico di *A. indica* nel trattamento dei granulomi nel ratto. Nimbidina e sodio nimbidato possiedono effetto anti-infiammatorio dose dipendente, evidenziato nella terapia degli edemi indotti dalla carragenina nei ratti o nelle forme di artrite provocate dalla formalina (Tidjani et al. 1989). Khatak et al., hanno ottenuto un effetto antinfiammatorio nei ratti, mediante inibizione della prostaglandin-sintetasi, utilizzando la porzione idrosolubile del 70% dell'estratto etanolic delle foglie del neem. Subaprija et al. (2005) hanno dimostrato che l'effetto analgesico è mediato dall'attivazione di recettori oppioidi in animali da laboratorio; inoltre hanno evidenziato un'attività immunostimolante dell'estratto acquoso del neem, che agisce migliorando: i livelli della risposta umorale e cellulo-mediata; l'attività fagocitaria dei macrofagi; la produzione di IL-1, interferone e TNF (Fattore di Necrosi Tumorale) in colture di leucociti di sangue periferico umano, mentre l'olio stimola la produzione di citochine, IL-1 e interferone in vivo, nei ratti (Subaprija et al., 2005);

~ **Applicazioni dermatologiche:** la nimbidina mostra la sua efficacia nel trattamento di diverse patologie cutanee quali foruncolosi, dermatiti seborroiche e non, ulcere, ustioni e infezioni da *Herpes labialis* (Brahmachari, 2004). Studi clinici dimostrano che formulazioni in gel a base di estratti *Azadirachta indica*, *Centella asiatica*, *Aloe vera* e Carbopol 934P sono efficaci nel trattamento di agenti responsabili della formazione

di forfora (Brahmachari, 2004). Nel trattamento degli eczemi e della psoriasi la nimbina risulta essere quattro volte più efficace dell'idrocortisone, senza mostrare effetti collaterali quali l'assottigliamento e l'atrofia della cute (Bodeker et al., 2002). Shaker et al. (2013) hanno evidenziato che l'estratto acquoso delle foglie del neem possiede un potenziale acaricida sovrapponibile all'ivermectina nei confronti del *Sarcoptes scabiei var. cuniculi* in vivo e in vitro.

Segue una tabella che raggruppa i principali componenti del neem e le loro proprietà.

Neem compounds	Source	Biological activity	References
Nimbidin	Seed oil	Anti-inflammatory	Bhargava <i>et al.</i> (1970) Chattopadhyay (1998)
		Antiarthritic	Pillai and Santhakumari (1981)
		Antipyretic	David (1969)
		Hypo glycaemic	Chattopadhyay <i>et al.</i> (1993)
		Antigastric ulcer	Garg <i>et al.</i> (1992)
		Spermicidal	Khillare and Shrivastav (2003)
		Antifungal	Bhattacharyya <i>et al.</i> (2005)
		Antibacterial	Chary <i>et al.</i> (1984)
		Diuretic	Murthy and Sirsi. (1958) Bhide <i>et al.</i> (1958)
		Sodium nimbidate	
Nimbin	Seed oil		Chattopadhyay (1998)
			Khillare and Shrivastav (2003)
Nimbolide	Seed oil	Spermicidal	
		Antibacterial	Chopra <i>et al.</i> (1952)
Gedunin	Seed oil	Antimalarial	Udeinya (1993)
		Antifungal	Rochanakji <i>et al.</i> (1985)
Azadirachtin	Seed	Antimalarial	Rao and Rao (1977)
		Antibacterial	Sengottayan <i>et al.</i> (2005)
Mahmoodin	Seed oil	Antibacterial	Khalid <i>et al.</i> (1989) Jones <i>et al.</i> (1994)
Gallic acid, epicatechin and catechin	Bark	Anti-inflammatory and Immunomodulatory	Devakumar and Dev (1996) Van der Nat <i>et al.</i> (1991)
Margolone, margolonone and isomargolonone	Bark	Antibacterial	Ara <i>et al.</i> (1989)
Cyclic trisulphide and cyclic tetraulphide	Leaf	Antifungal	Kakai and Koho (1984)
Polysaccharides	Bark	Anti-inflammatory	Pant <i>et al.</i> (1986)
Polysaccharides GIa, Gib	Bark	Antitumour	Fujiwara <i>et al.</i> (1982)
Polysaccharides GIIa, GIIIa	Bark	Anti-inflammatory	Fujiwara <i>et al.</i> (1984)
	Bark	Immunomodulatory	Vander Nat <i>et al.</i> (1987, 1989)

Tab. 2: principali componenti del Neem e loro proprietà (www.scialert.net).

3.3 Applicazioni nel settore agrochimico

La crescente consapevolezza dei pericoli connessi all'utilizzo di insetticidi e pesticidi sintetici in campo agricolo, ha spinto verso la ricerca di sostanze

bioderivate dotate di efficacia funzionale e basso impatto ambientale. Il neem guida la lista delle piante utilizzabili a tale proposito. Già in passato, infatti, gli agricoltori indiani lo usavano per adornare i granai con lo scopo di tenere lontani i parassiti (Brahmachari, 2004). I primi studi in questo settore vennero condotti negli anni '50 dall'entomologo tedesco H. Schmutterer che, chiamato in Sudan per combattere le pullulazioni di cavallette, notò come l'albero del neem fosse l'unica pianta a non essere attaccata dalle locuste; le ricerche successive lo portarono ad isolare l'azadiractina quale maggior componente ad attività insetticida. Il meccanismo d'azione svelato è di tipo IGR (*insect growth regulator*) ed è dovuto ai metaboliti in cui la molecola si scompone una volta ingerita dall'insetto. Si sviluppa un'interferenza a livello ormonale, correlata ad alterazioni morfogenetiche, che porta alla formazione di larve permanenti, incapaci di completare il ciclo biologico di muta. Prove condotte su ninfe di *Locusta migratoria* dimostrarono come l'iniezione di azadiractina determinasse una riduzione di *ecdisteroli*, ormoni necessari al completamento delle fasi di muta con blocco di questo processo (De Cristofaro et al., 2001). L'attività repellente dell'olio del neem a differenti diluizioni venne approfondita da Blackwell et al. (2004) nei confronti dei culicoidi (*C. impunctatus*).

3.3.1 Tossicità ambientale

Per quanto concerne la tossicità ambientale potenziale dei derivati del neem, ricordiamo che questi si degradano nell'ambiente in 4-5 giorni per azione dei raggi UV e dell'effetto di dilavamento delle piogge. Studi sull'artropodofauna utile confermano una buona selettività nei riguardi dei predatori e parassiti, anche se non può essere escluso un effetto attraverso cuticola o per assunzione di prede contaminate (De Cristofaro, 2004).

4. HYPERICUM PERFORATUM (ERBA DI SAN GIOVANNI)

Pianta erbacea perenne, a crescita arbustiva, appartenente alla famiglia delle Ipericaceae. Il nome deriva dal greco “*Ypericon*” che si scompone in “*yper*”=*sopra*, “*eikon*”= *immagine* a significare “*al di sopra delle immagini*, intese come ombre; Linneo attribuisce una diversa etimologia alla desinenza “*eicon*”, che fa derivare dal verbo “*eico*”= *sembro simile, appaio* facendo riferimento al tipico aspetto delle foglie che, viste in contro luce, sembrano punteggiate, perforate, da piccoli fori. Da qui l'appellativo di *Hypericum perforatum*”. Basandoci semplicemente sull'etimologia si inizia a capire il complesso mondo leggendario costruito negli anni intorno a questa pianta e alle sue proprietà. I primi cristiani iniziarono a chiamarla *Erba di San Giovanni*, con riferimento alla fioritura che avveniva intorno al 24 giugno, data di nascita del Santo; inoltre, l'olio di color rosso che gemeva da fiori e foglie durante la raccolta, richiama, per il volgo, il sangue della decapitazione del martire. Nel Medioevo, nella notte della vigilia di S. Giovanni, era tradizione dormire con un mazzolino di iperico sotto il cuscino, con la convinzione, che così facendo, il Santo proteggesse il dormiente dalla morte per un anno intero; mentre appenderne una corona sulla porta di casa teneva lontani gli spiriti maligni. Nell'antica Roma la pianta era sacra a Giove e considerata il simbolo della luce che disperde l'oscurità e permette di scacciare i fantasmi; da qui il nome di “*caccia diavoli*”. Fa parte delle nove erbe “*magiche*” che venivano colte tradizionalmente nella notte del solstizio d'estate quando, per credenza popolare, si riteneva che l'incontro tra Sole e Luna permettesse alle piante di sprigionare le loro proprietà.

Intorno al I secolo a.C., Discoride Pedanio, medico, botanico e farmacista greco, nella sua opera “*De Materia Medica*” descrive per primo il potenziale terapeutico della pianta (anti-depressivo, antisettico, anti-infiammatorio, espettorante e lenitivo), confermato ed apprezzato fino ai nostri giorni (Istikoglou, 2010).



Figg. 1-2: particolari della pianta dell'Iperico (da www.agraria.com).

4.1 Caratteristiche botaniche

DIVISIONE: Magnoliophyta

CLASSE: Magnoliopsida

SOTTOCLASSE: Dilleniidae

ORDINE: Mapighiales

FAMIGLIA: Hypericaceae

È una pianta perenne semi-sempreverde, glabra, con fusto eretto percorso da due strisce longitudinali in rilievo. È ben riconoscibile, anche quando non è in fioritura, se si vanno a valutare le foglie che, osservate in controluce, appaiono bucherellate. In realtà, questi fori, sono piccole vescichette oleose, visibili anche ai



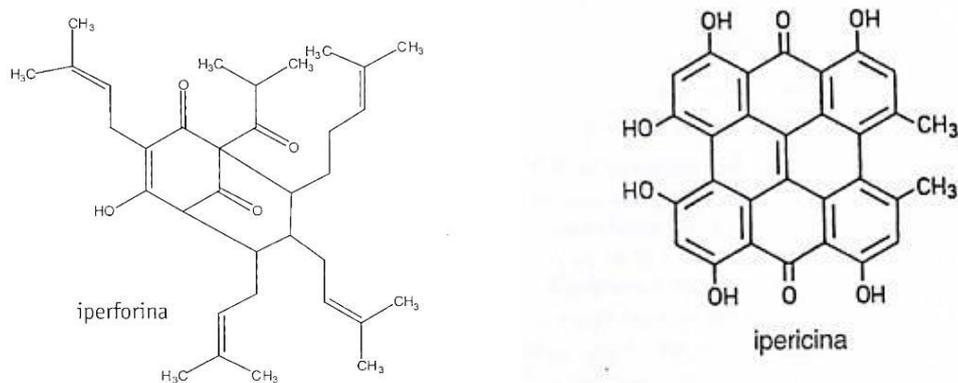
Fig.3: vescichette oleose, particolare della foglia dell'Iperico (www.agraria.com).

margini come dei punti neri. Rappresentano delle strutture ghiandolari che secernono una sostanza oleosa di colore rosso. Infine le foglie si presentano oblunghe e opposte. I fiori giallo oro hanno 5 petali riuniti in corimbi che raggiungono la fioritura massima a fine giugno. Originario dell'arcipelago britannico, è oggi diffuso in tutte le regioni d'Italia e nel mondo. Predilige

posizioni soleggiate o semi-ombreggiate e asciutte come campi abbandonati, ambienti rurali e boschi radi; non teme le basse temperature (Istikoglou, 2010).

4.2 Costituenti chimici e loro attività farmacologica

I più importanti costituenti attivi della pianta sono l'iperforina e l'ipericina. La prima isolata dal ricercatore russo Bystrov nel 1975, appartiene al **gruppo dei derivati del floroglucinolo**. Presenta la struttura chimica di un acilfloroglucinolo poliprenilato. La sua concentrazione è maggiore nei fiori e nei frutti, in particolare cresce dal 2.5% all'8.5% rispettivamente nei germogli e nei frutti acerbi. Alla classe dei derivati del floroglucinolo è ascrivibile anche l'adiperforina. L'ipericina appartiene al **gruppo dei derivati naftodiantronici** come la pseudo- e iso-ipericina. Infine possiamo citare **flavonoidi** (rutinina, quercitina), biflavonoidi e **tannini** come altre classi di appartenenza dei composti biologicamente attivi della pianta (Barnes et al, 2001).



Figg. 4-5: struttura chimica di iperforina e ipericina (Barnes et al., 2010).

La formulazione tradizionale, maggiormente diffusa in commercio, è ottenuta mediante la macerazione delle infiorescenze apicali in olio d'oliva, seguita da esposizione al sole per almeno 2-3 settimane (Isacchi et al., 2007).

Isacchi et al. (2007) hanno condotto uno studio approfondito riguardo i diversi metodi di produzione del preparato oleoso, con lo scopo di ottenere la maggior concentrazione e stabilità dei floroglucinoli. I risultati hanno portato a concludere che la massima estrazione di iperforina e adiperforina si ottiene con il metodo tradizionale, usando porzioni fresche della pianta, seguito dalla utilizzazione delle porzioni apicali congelate, mentre il processo di essiccamento, durante la macerazione, interferisce con il meccanismo di estrazione di questi composti determinandone una riduzione dei valori percentuali presenti (Isacchi et al., 2007).

Fig.5.4 Main components of the extracts and ethylacetic fraction of *H. perforatum*

Compound	Hydroalcoholic extract	Lipophilic extract	Ethylacetic fraction
Chlorogenic acid	3.39%	n.d.	0.05%
Rutin	3.42%	n.d.	5.40%
Hyperoside	4.88%	n.d.	9.29%
Isoquercitrin	2.29%	n.d.	3.84%
Quercitrin	0.56%	n.d.	0.95%
Quercetin	0.29%	n.d.	3.20%
13,118-biapigenin	0.36%	n.d.	1.18%
Amentoflavone	n.d.	n.d.	n.d.
Pseudohypericin	0.18%	n.d.	0.21%
Hypericin	0.09%	n.d.	0.06%
Hyperforin	4.50%	27.02%	10.27%
Adhyperforin	0.38%	5.23%	0.80%

n.d. = not detected (< 0.05%, practical limit of detection).

Tab.1: maggiori componenti rinvenuti nell'estratto idroalcolico, lipofilo e nella frazione etilacetica dell'*H. perforatum* (Isacchi et al., 2007).

L'attività farmacologica dei componenti attivi dell' *H. perforatum*, largamente documentata, comprende effetti antidepressivi, anticancerogeni, antibatterici, anti-infiammatori e cicatrizzanti (Barnes et al., 2001; Shempp et al., 2002; Sosa et al., 2007). Inoltre sono noti fenomeni di interazione con altri farmaci e di fotosensibilizzazione (Shempp et al., 2003).

- ~ **Attività antidepressiva:** inibizione del meccanismo di re-uptake di diversi neurotrasmettitori quali serotonina, noradrenalina, GABA, glutammato (Müller, 2003). I comuni farmaci antidepressivi svolgono un'azione a livello sinaptico, dove agiscono mediante diversi meccanismi quali: inibizioni delle MAO (monoammino-ossidasi) o blocco delle proteine trasportatrici, implicate nella captazione dei neurotrasmettitori con una certa selettività. E' stato sorprendentemente scoperto che l'iperico influenza con la stessa efficacia l'*uptake* di diverse molecole segnale, alterando il meccanismo alla base e non comportandosi come semplice inibitore competitivo a livello recettoriale. L'iperforina, infatti, è in grado di modificare il gradiente trans-membrana del Na⁺; come conseguenza si ha il blocco delle proteine che normalmente legano i neurotrasmettitori e li veicolano dentro la sinapsi con un meccanismo di co-trasporto Na⁺ dipendente (Müller, 2003). Gli studi clinici condotti a riguardo hanno confermato l'efficacia della pianta nel trattamento di stati depressivi lievi/moderati, meno nelle forme gravi e croniche (Gaster et al., 2000; Di Carlo et al., 2001);
- ~ **Effetto anticancerogeno:** l'iperforina induce apoptosi con un meccanismo dose-dipendente; in vivo il suo effetto anti-proliferativo è paragonabile al Taxolo, principio attivo anti-mitotico utilizzato nella cura delle neoplasie (Schempp et al., 2002).
Martínez-Poveda (2005) approfondì il potenziale anti-angiogenico della pianta sia in vivo, su membrane di corion-allantoide, sia in vitro su cellule endoteliali di bovino, con risultati sorprendenti;
- ~ **Effetto antibatterico:** nel 2001 Dall'Agnol et al., indagarono il potere antibatterico dell'estratto metanolico di sei specie di *Hypericum* (*H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. connatum*, *H. ternum*, *H. myrianthum*, *H. polyanthemum*) nei confronti di sette specie microbiche tra le quali *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia. coli* e *Candida albicans*. I risultati raggiunti possono essere così sintetizzati:

- ~ l'estratto più attivo è stato quello di *H. caprifoliatum*, che mostra attività contro *S. Aureus*;
- ~ solo gli estratti di *H. polyanthemum* e *H. ternum* sono attivi nei confronti di *Bacillus subtilis*;
- ~ nessuno degli estratti crudi metanolici, mostra attività nei confronti di *S. epidermidis* ed *E. coli*;
- ~ solo aumentando i tempi di incubazione a 36 ore, si osserva la crescita di *Candida albicans*.

I risultati, incoraggianti ai fini della riduzione della crescita batterica, spinsero i ricercatori ad effettuare un'analisi fitochimica delle sei specie di iperico, con lo scopo di identificare i componenti maggiormente rappresentati. Questi risultano essere i polifenoli (tannini/flavonoidi) e gli acidi fenolici, a cui venne attribuito il potere antibatterico. Il meccanismo d'azione svelato vede la capacità di legame con le adesine batteriche, impedendone, in questo modo, l'interazione con i recettori cellulari; i tannini, in particolare, formano dei complessi insolubili legandosi alla prolina di molte molecole proteiche, provocando una riduzione nei processi di sintesi della parete cellulare batterica. Hubner (2003) ha puntato l'attenzione sulla possibilità di sviluppo di resistenza dello *S. aureus* verso l'iperforina. Questo fenomeno non si registra a concentrazioni basse come quelle che si riscontrano nel plasma umano in seguito a trattamento antidepressivo a base di iperico (900 mg/die) e non da vita a fenomeni di resistenza crociata verso gli antibiotici più comunemente utilizzati;

- ~ **Effetto anti-infiammatorio:** Sosa et al. (2007) mostrarono il potere anti-infiammatorio, dose-dipendente, dei diversi principi attivi dell'iperico nel trattamento di edemi del padiglione auricolare indotti dall'olio di Croton, in vivo sui ratti. Ipericina, iperforina, adiperforina e amentoflavoni rivelarono un'efficacia comparabile all'indometacina (FANS).

Hunt nel 2001 descrisse l'efficacia anti-radicalica di alcune formulazioni a base di iperico presenti in commercio. Indagò l'effetto "scavenger" dei

principi attivi della pianta a diverse diluizioni, dimostrando una maggior attività a basse concentrazioni di principio attivo.

L'*H. perforatum* è in grado di sopprimere l'attività della 5-lipossigenasi e della ciclossigenasi-1 (COX-1), portando ad una riduzione della quantità di leucotrieni e prostanoidi prodotti, molecole, queste, fortemente implicate nel fenomeno dell'infiammazione (Albert et al., 2002).

H. perforatum è in grado di inibire l'attivazione, TNF-alfa (Fattore di Necrosi Tumorale) indotta, del NF- κ b (Nuclear-Factor- κ b) in cellule leucemiche umane (Orhan et al., 2014); questo dato è molto importante ai fini del ruolo anti-infiammatorio della pianta. Il TNF- α è una citochina coinvolta nella fase acuta della flogosi, attiva il fattore nucleare κ B il quale trasloca a livello del nucleo per dar vita alla trascrizione di diversi geni implicati in processi quali: il ciclo cellulare, meccanismo anti-apoptosi, risposta allo stress e produzione di citochine pro-infiammatorie. Di conseguenza, una riduzione d'attivazione di questo fattore influenza lo sviluppo della flogosi. Inoltre gli stessi autori hanno indagato il contenuto in acidi grassi presenti in diverse preparazioni a base di iperico. Le molecole maggiormente rintracciate sono state: l'acido palmitico, stearico, palmitoleico, oleico, linoleico e linolenico i quali, a loro volta, coadiuvano nel meccanismo di inibizione del NF- κ B e della COX-2 (Orhan et al., 2014);

~ **Ruolo nella guarigione delle ferite:** Il potenziale antibiotico ed anti-infiammatorio della pianta giustifica il suo tradizionale uso nelle affezioni cutanee (Beerhues, 2006). L'estratto alcolico acquoso dell'iperico è in grado di stimolare la produzione di fibroblasti in embrioni di pollo (Ozturk et al., 2007) e la migrazione fibroblastica, insieme alla produzione di collagene, in cellule fibroblastiche di topo (Dikmen et al., 2011).

Lavagna et al. (2001) indagarono il potenziale di rigenerazione tissutale di una miscela d'olio di *H. perforatum* e *Calendula arvensis* in 24 pazienti con ferite chirurgiche da parto cesareo, applicando un protocollo terapeutico che prevedeva:

- ~ disinfezione e pulizia della ferita con perossido di idrogeno a 20 vol.;
- ~ applicazione di garze sterili imbevute della mistura di olio direttamente sulla ferita;
- ~ applicazione di un bendaggio occlusivo.

Questa procedura veniva ripetuta due volte al giorno per 16 giorni. I risultati ottenuti sono stati quantificati mediante il calcolo del Perimetro di Superficie dell'Area della ferita espressa in cm^2 (SPA) ed hanno rivelato che:

- ~ nel gruppo di pazienti trattati con olio di iperico-calendula, si sono ottenuti risultati migliori rispetto al gruppo di controllo;
- ~ l'SPA nel gruppo trattato si è ridotto di 37.6 +/- 9.9% rispetto al 15.83 +/- 4.64% del gruppo controllo.

L'utilizzo di creme a base di iperico contenenti iperforina all'1,5%, si dimostra efficace nel trattamento della dermatite atopica. Lo studio è stato portato avanti da Schempp et al. nel 2003 ed ha coinvolto 20 pazienti umani trattati due volte al giorno per 14 giorni. L'entità della guarigione è stata valutata utilizzando lo SCORAD test, che considera la severità dell'eritema, la presenza di papule, croste, focolai di lichenificazione e di escoriazione; è stata condotta anche una valutazione del numero di unità formanti colonia (CFU) da tamponi della ferita. I risultati hanno rivelato un progressivo miglioramento delle condizioni della cute al giorno 7, 14 e 21 nel gruppo trattato con la lozione a base di iperico rispetto al gruppo controllo, oltre che una progressiva riduzione della carica microbica;

- ~ **Interazioni con altri farmaci:** l'iperico, provocando l'induzione del Citocromo P450 a livello epatico e della glicoproteina P intestinale, favorisce la metabolizzazione e l'eliminazione degli xenobiotici (Maurer et al., 1999; Roby et al., 2000; Barnes et al., 2001). Questo determina, in alcuni casi, una riduzione d'efficacia di alcuni farmaci. Sono note le

interazioni con la ciclosporina, anticoagulanti cumarinici, contraccettivi orali, antivirali inibitori delle proteasi come “*Indinavir*” utilizzato nel trattamento dell’HIV (Breckenridge, 2000), quando assunto per via sistemica;

- ~ **Fotossicità:** l’attività fototossica su pecore alimentate con foraggi è nota fin dalla fine del 1700. Per tutto il XIX secolo molte pubblicazioni hanno riportato il complesso sintomatologico di sensibilizzazione acuta e subacuta denominato “*ipericismo*” o “*malattia della luce*”. Questi sintomi furono riscontrati anche in bovini e cavalli. Più tardi, in esperimenti compiuti su conigli e pecore, l’agente colorante rosso, l’ipericina, fu considerato responsabile della reazione fotosensibilizzante (Duran and Song, 1986). Il composto, assorbito a livello intestinale, passa in circolo concentrandosi a livello del derma. Dopo l’esposizione alla luce solare e in presenza di ossigeno, avviene un’emolisi fotodinamica che porta al danno tissutale. In assenza di luce solare il composto non mostra tossicità. Queste osservazioni sono connesse alle grandi quantità di pianta fresca consumata dagli animali (un chilo o più di pianta fresca al giorno) al pascolo. Nonostante la fotossicità sia stata dimostrata per diverse specie animali, essa è, invece, molto rara negli esseri umani. Schempp et al. (2003) hanno effettuato uno studio inerente gli effetti derivanti dalla somministrazione orale di estratto di *Hypericum perforatum* sulla pigmentazione della cute e sugli eritemi indotti da raggi UVA, UVB, Luce Visibile e radiazioni solari simulate. I risultati non mettono in evidenza un potenziale effetto fototossico per somministrazioni orali di dosaggi entro i 1800 mg al giorno di ipericina; l’esposizione ai raggi UVB induce un incremento della pigmentazione e dell’indice di eritema, ma questi effetti sono indipendenti dalla dose di ipericina somministrata; non ci sono effetti significativi per esposizione alle altre sorgenti in quanto, l’incremento dell’indice di eritema e di pigmentazione che si osserva dopo la singola somministrazione di ipericina, non è significativo rispetto alla cute non trattata.

5. MIX 557/1 Primary Wound Dressing®/ one VET

Il “MIX 557” nasce dalla combinazione degli estratti di due piante l’Hypericum perforatum e l’Azadirachta indica, dalle note proprietà anti-infiammatorie, cicatrizzanti, antimicrobiche. Il prodotto, completamente naturale, non presenta molecole di sintesi ed è ottenuto utilizzando le sommità fiorite dell’Iperico e l’estratto oleoso del Neem, ricavato dalla spremitura a freddo dei semi. E’ stato brevettato dall’ENEA nel 2004 con la dicitura *“composizione fitoterapica con effetti cicatrizzanti, biocida e repellente per la cura e la risoluzione delle lesioni esterne di qualunque estensione e natura”*. Nel 2007 ottiene la concessione europea e nel 2008 il brevetto con il N° 48211BE/2008. E’ conosciuto con il nome di one VET nell’ambito veterinario e di 1Primary Wound Dressing® (1PWD®) in medicina umana.



Fig. 1: one VET (www.endospitalia.it).

Gli inventori di questa composizione fitoterapica sono Fiorella Carnevali, medico veterinario e Stephen Andrew van der Esch, biologo, entrambi ricercatori ENEA presso il Dipartimento BIORAD-RAB, Centro Ricerche della Casaccia. Il medicamento messo a punto dai ricercatori, presenta tutte le caratteristiche di un

rimedio “**ALL in ONE**” nel senso che non richiede l’interazione con medicazioni attive, come dressing primario, ed è sufficiente, da solo, a determinare la guarigione di qualunque ferita, sulle quali può essere applicato dai primi stadi del trauma fino a chiusura completa. Possiede spiccate proprietà cicatrizzanti, antibatteriche, anti-disidratative e lenitive, tiene lontani insetti nocivi, evita la deposizione delle uova e delle larve dei Ditteri sulle ferite e ostacola lo sviluppo delle larve già deposte, che scompaiono dalla lesione in circa tre giorni (effetto repellente e biocida). Il suo utilizzo ha permesso di raggiungere risultati straordinari nella cura di ferite difficili, prima su diverse specie animali, come caprini, ovini, cavalli e poi sull’uomo.

Sul sito ufficiale dell’ENEA è riportata l’intervista, rilasciata dai due ricercatori, in occasione della premiazione “Eccellenze ENEA 2008” per il medicamento “ALL in ONE”. Leggendola, si apprende come il prodotto nasca inizialmente dalla necessità di creare un antiparassitario ad uso esterno, a base di sostanze naturali, con l’obiettivo di impedire la colonizzazione stagionale da parte dei ditteri miasigeni delle ferite provocate con la tosatura negli animali da fibra (nell’ambito della filiera di produzione di fibre pregiate di Angora, Alpaca, Cachemire). Dalla combinazione dell’attività cicatrizzante dell’Iperico e repellente del Neem, dopo vari tentativi, nasce quello che ad oggi è un unguento che non solo cura e rimargina qualunque tipo di lesione esterna, ma evita anche l’infestazione da larve di ditteri Miasigeni (Carnevali, 2007, van der Esch *et al.*, 2007).

Il preparato agisce secondo diversi meccanismi d’azione:

1. forma un film oleoso semipermeabile sulla lesione che ne impedisce la disidratazione superficiale, ne garantisce la giusta umidità ed evita la formazione dell’escara;
2. svolge un’azione antibatterica, correlata sia alle proprietà intrinseche dell’Iperico e del Neem (vedi capitoli 3 e 4) sia alla componente oleosa ricca in acidi grassi mono e polinsaturi noti come Free Fatty Acids (FFAs);
3. previene l’adesione del dressing secondario alla ferita, evitando danni al tessuto di granulazione neofornato, durante il cambio di medicazione

giornaliera, favorendo l'epitelizzazione e riducendo la sensazione di dolore provata dal paziente;

4. protegge i margini perilesionari dalla macerazione.

Il primo punto rimanda al concetto di guarigione umida della ferita, introdotto per la prima volta nel 1962 da George Winter, portando ad una rivoluzione nel trattamento delle ferite (Winter, 1962). L'ambiente umido favorisce una rapida epitelizzazione, una riduzione dei fenomeni necrotici e della dolorabilità percepita dal paziente (Dealey, 2005). Schultz et al. (2003) elencarono i vantaggi della *moist wound healing* come segue:

- ~ aiuta la migrazione delle cellule dell'epidermide;
- ~ promuove l'alterazione del pH e dei livelli di ossigeno;
- ~ mantiene il gradiente elettrolitico;
- ~ permette la ritenzione dei fluidi prodotti dalla ferita.

E' di particolare interesse la presenza, nel medicamento, della specifica combinazione di **FFAs (Free Fatty Acids)** nella frazione oleosa. La presenza di doppi legami nella molecola dei FFAs insaturi consente il sequestro dei radicali liberi che si formano durante il processo infiammatorio (lipoperossidazione). La lipoperossidazione dei FFAs, al posto dei lipidi delle membrane cellulari, favorisce la protezione delle cellule responsabili del processo cicatriziale.

La letteratura riferisce che i FFAs mono e poli-insaturi sono anche dei potenti agenti antimicrobici (Desbois, 2010). Non a caso rappresentano la maggior componente lipidica prodotta dalle ghiandole adipose cutanee, evolute nella scala zoologica con fini protettivi nei confronti delle aggressioni batteriche della cute (attività antimicrobica) (Drake et al., 2008). Lo spettro d'azione, soprattutto dei cis-FFAs (acidi grassi a catena medio-lunga saturi e insaturi), è molto ampio con meccanismi d'azione differenti. I FFAs insaturi, grazie alla loro particolare struttura chimica, possono inserirsi nella membrana cellulare batterica aumentandone fluidità e permeabilità, rendendola così instabile e facilmente predisposta a rotture. Inoltre sono in grado di legarsi ai *carriers* deputati al

trasporto ionico trans-membrana, riducendo questo meccanismo e il processo di produzione dell'ATP che ne consegue. E' stato ipotizzato, infine, che questi due meccanismi d'azione agiscano di concerto ai fini della menomazione dell'*uptake* dei nutrienti da parte del batterio (Desbois, 2010).

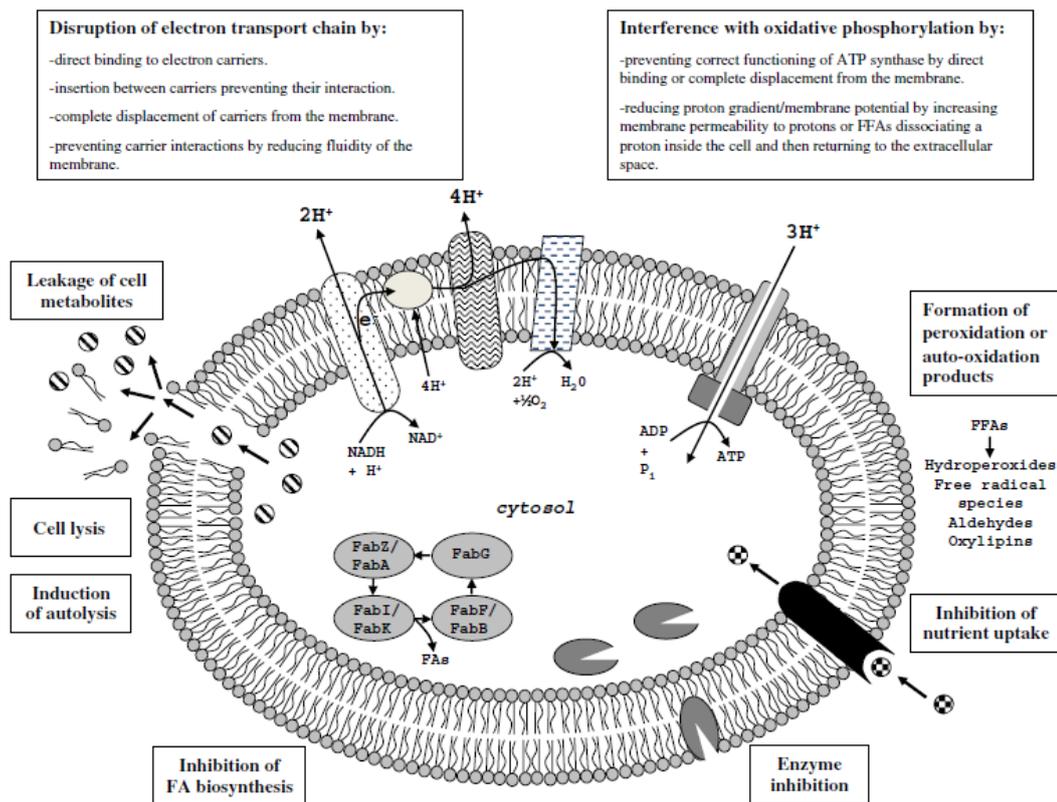


Fig. 2: rappresentazione dei meccanismi d'azione con cui agiscono i FFAs (Desbois 2010).

5.1 Studi sperimentali

Le prime sperimentazioni sono state condotte in cosiddetto “*regime di compassione*”, poiché eseguite su soggetti destinati ad essere soppressi a causa della gravità delle lesioni (previo consenso dei proprietari); sono stati così presi in considerazione più di cento casi. Riportiamo alcune testimonianze nelle figure che seguono.



Figg. 3-4: due casi trattati con il mix557 (<http://neem.tea-nifty.com>).



Figg. 5-6: MIX557 effetto biocida-repellente. Aspetto di una lesione infestata da diverse generazioni di larve di ditteri miasigeni (day 0); la stessa lesione dopo 7 giorni di trattamento, scomparsa delle larve già depositate e assenza di nuove deposizioni (day 7). (<http://neem.tea-nifty.com/neem/files/9.Dr.S.%20Andrew%20Van%20Der%20Esch.pdf>)

La casistica si è poi estesa a ferite meno gravi, ma sempre problematiche, dove la superiorità di efficacia terapeutica del medicamento si è palesata sin da subito, soprattutto nelle lesioni in cui le terapie convenzionali avevano fallito.

Nel 2010 è stata presentata una tesi di laurea in Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari, Laureanda Sabrina Fiore, intitolata: *"Efficacia del composto brevettato MIX 557 nella riparazione delle ferite cutanee: Studio sperimentale su ovino"* che è stato poi oggetto di presentazione al Congresso Nazionale Della Società di Chirurgia Veterinaria (SICV) (Franchini et al., 2010).

In questo studio è stata valutata l'efficacia del MIX557 nella biostimolazione della riparazione di lesioni cutanee con ampia perdita di sostanza comparandola con l'attività delle componenti singole che costituiscono il prodotto, e una medicazione convenzionale di controllo (amuchina). Ai fini dello studio sono state isolate 5 pecore di circa 50 kg di peso che, previa sedazione ed anestesia, sono state sottoposte all'exeresi di quattro tasselli cutanei circolari (6 cm diametro) nella zona posteriore del tronco. Il trattamento delle lesioni è stato eseguito quotidianamente, a partire dal giorno dell'escissione chirurgica, mediante pennellatura della superficie lesa con i quattro diversi trattamenti: MIX 557, iperico, neem, amuchina.



Figg. 7-8: aspetto dei tasselli cutanei escissi nella zona posteriore del tronco e applicazione dei diversi prodotti mediante pennellatura (tesi di laurea di S. Fiore, 2010).

Nei giorni 0, 3, 5, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 65 sono stati effettuati:

- ~ il calcolo della lesione su acetato per valutare la velocità di cicatrizzazione, mediante equazione di Gilman;
- ~ la biopsia del margine della lesione;
- ~ l'allestimento di vetrini per istologia classica (Colorazione H&E) e per l'immunoistochimica dei seguenti *markers*: EGF; FGF; VWE; TGF- β ;
- ~ la fenotipizzazione dell'infiltrato infiammatorio e della risposta immunitaria.

I risultati ottenuti possono essere così sintetizzati:

- ~ risulta essere significativa la variabilità individuale della velocità di cicatrizzazione (tre pecore hanno completato la cicatrizzazione in 4 settimane per tutti i trattamenti, mentre due pecore hanno completato la cicatrizzazione in 6 settimane, sempre per tutti i trattamenti);
- ~ gli esami istologici hanno rivelato che il MIX 557, rispetto ai singoli componenti del medicamento ed al controllo, determina un adeguato richiamo di neutrofili, macrofagi e mononucleati che si esaurisce con il termine della fase infiammatoria, con conseguente efficace riduzione della flogosi nella fase riparativa; ciò è importante ai fini di un rapido passaggio dalla fase infiammatoria a quella di granulazione con una riepitelizzazione più rapida e riduzione dei tempi di trattamento;
- ~ gli esami d'immunoistochimica hanno rivelato che il MIX 557, rispetto ai singoli componenti ed al controllo, determina una maggior produzione di

VWE (fattore di crescita dell'endotelio vascolare), maggiore neo-angiogenesi, elevata produzione di collagene III, ridotta espressione dei fattori di crescita pro-fibrotici e chemiotattici per i fibroblasti: FGF, TGF- β , l'EGF;

- ~ nessun tassello ha presentato complicazioni infettive, dimostrando che il medicamento MIX 557 e le sue componenti non compromettono il processo cicatriziale fisiologico ma ne consentono un decorso privo di complicazioni infettive/batteriche senza l'utilizzazione di disinfettati o antimicrobici.



Figg.9-10: 35esimo giorno di trattamento. Lesioni trattate con MIX557, Hyperico, Neem, Amuchina (procedendo da sinistra verso destra) (Tesi di S. Fiore, 2010)

Gli autori concordano nell'affermare che non è tanto rilevante la velocità di cicatrizzazione, quanto la qualità della cicatrice ottenuta. Questa è fortemente influenzata dal tipo di trattamento, con minima sclerosi nelle lesioni in cui è stato utilizzato il MIX 557, e una qualità della cicatrice scadente e fortemente fibrotica per le ferite trattate con semplice disinfettante (amuchina). In definitiva il MIX 557 induce lo svolgimento, in tempi fisiologici, di un processo riparativo qualitativamente superiore, in cui sono favorite una maggiore vascolarizzazione del tessuto di granulazione, un'elevata produzione di collagene III, una ridotta fibroplasia e una migliore qualità della cicatrice finale.

Altri importanti dati sull'efficacia d'uso del medicamento, possono essere ricavati da un altro studio condotto da Carnevali et al. (2014), grazie al quale è stato possibile dimostrare come one VET riesca a tenere sotto controllo quei processi di alterazione della cicatrizzazione che si verificano frequentemente nel cavallo, in

particolare lo sviluppo d'infezione e la formazione di tessuto di granulazione esuberante (cheloide).

Il cheloide, in fase di granulazione, è una tipica patologia del processo cicatriziale, geneticamente determinata (Ghamsari et al., 2007; Azari et al., 2010), che riguarda esclusivamente il cavallo, ma non i ponies (Wilmink et al., 2004) e si sviluppa con una maggiore predisposizione nella parte distale degli arti (Miller et al., 2000; Cochrane et al., 2003; Lepault et al., 2005). E' caratterizzato da un'iperproliferazione dei fibroblasti e conseguente produzione di matrice extracellulare con debordamento del tessuto neofornato rispetto ai margini della ferita (Theoret et al., 2001; Wilmink et al., 2009). Sembra sia causato da:

- ~ alterazione dei meccanismi apoptotici che dovrebbero portare alla scomparsa dei fibroblasti (Wilmink et al., 2004);
- ~ mancata trasformazione dei fibroblasti in mio-fibroblasti che hanno il compito di rimodellare la cicatrice nella fase finale (Theoret et al., 2001);
- ~ probabile occlusione microvascolare dei vasi sanguigni del sito cicatriziale che non consente il corretto sviluppo dei processi riparativi (Lepault et al., 2005).

one VET si è dimostrato efficace nel controllare lo sviluppo della reazione cheloidea, azione che si palesa, clinicamente, con il *“fenomeno dell'emorragia”*. Con questa dicitura si fa riferimento ad un sanguinamento superficiale e temporaneo (40-50 secondi) causato dalla rimozione del bendaggio e dovuto al collasso della rete neo-angiogenica, rimasta senza sostegno, a causa della scomparsa fisiologica dei fibroblasti (per apoptosi selettiva dei fibroblasti senza coinvolgimento della rete vascolare).

Queste considerazioni sono il risultato dello studio precedentemente citato in cui, in collaborazione con i servizi veterinari dell'Esercito, Carabinieri, Reggimento Corazzieri e con l'Ospedale Militare Veterinario di Montelibretti, è stato studiato il decorso di 57 ferite. Queste sono state classificate secondo il *Classification Of Wounds score system* (COW) (Ducharme-Desjarlais et al., 2005), in ferite

semplici (**SW**) e ferite caratterizzate dalla presenza di tessuto di granulazione esuberante (**EGT-W**). Altri parametri presi in considerazione sono stati:

- ~ tempo di guarigione espresso in giorni (TTH);
- ~ tasso di epitelizzazione (cm/giorno) (SER);
- ~ health of wounds score (HOW);
- ~ Time of first epithelium appearance (TFE);
- ~ cosmetic aspect of the final scar (CAS);
- ~ valutazione della facilità di guarigione, dolore e sviluppo di complicazioni.

Il protocollo del trattamento prevedeva l'applicazione quotidiana del medicamento, fino a completa epitelizzazione, applicando un bendaggio semi-occlusivo solo sulle lesioni caratterizzate da EGT.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che:

- ~ il tasso di epitelizzazione (SER) risulta essere di $0,14 \pm 0,06$ cm/die per le SW contro gli $0,0742 \pm 0,0342$ cm/die delle EGT;
- ~ il tempo di comparsa dell'epitelio (TFE) è di 7 giorni per le ferite semplici rispetto ai 18 di quelle esuberanti;
- ~ l'aspetto estetico finale della cicatrice è buono in entrambi i tipi di lesione.

Lo studio dimostra che le ferite semplici guariscono più velocemente di quelle complicate da cheloide, così come già riferito da Stashak (1991); anche il tempo di comparsa dell'epitelio è più breve nelle ferite semplici rispetto a quelle cheloidee, ma quest'ultime, dalla quarta settimana in poi, assumono le stesse caratteristiche di salute (HOW score) delle SW (simple wounds) con pari qualità della cicatrice finale. In questo studio non è mai stata necessaria la resezione chirurgica del tessuto cheloideo esuberante, che viene invece praticata come terapia elettiva, in sostituzione ai trattamenti convenzionali a base di causticanti, steroidi o gel di silicone (Ducharme-Desjarlais et al., 2005; Theoret et al., 2008).

one VET dimostra, quindi, di essere un rimedio di efficacia superiore alle terapie convenzionali mediche e chirurgiche (Howard et al., 1993). Questi dati ci permettono di avvalorare il potenziale del medicamento nel controllo del processo cicatriziale delle ferite del cavallo, specie in cui lo sviluppo di una reazione cheloidea è spesso frequente e di difficile gestione. Seguono le immagini che testimoniano il decorso di alcune lesioni prese in considerazione in questo studio.

Caso 1: giorni di trattamento 7, 25 (fenomeno dell'emorragia), 40, 150.



Fig.11: giorno 7 (Carnevali et al., 2014)



Fig.12: giorno 25 (Carnevali et al., 2014)



Fig.13: giorno 40 (Carnevali et al., 2014)

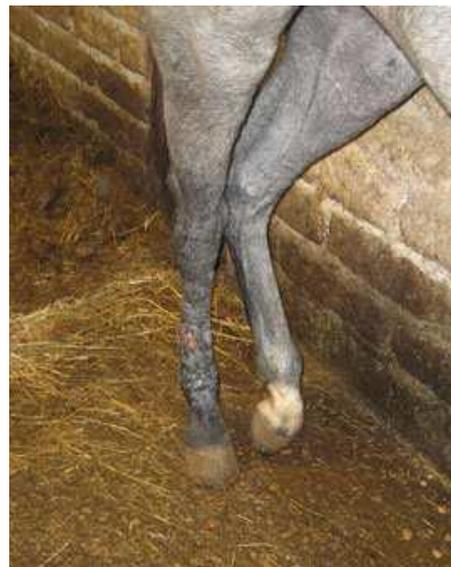


Fig.14: 5 mesi (Carnevali et al., 2014)

Caso 2: giorni di trattamento 1-15-21-60.



Fig.15: giorno 1 (Carnevali et al., 2014)



Fig.16: giorno 15 (Carnevali et al., 2014)

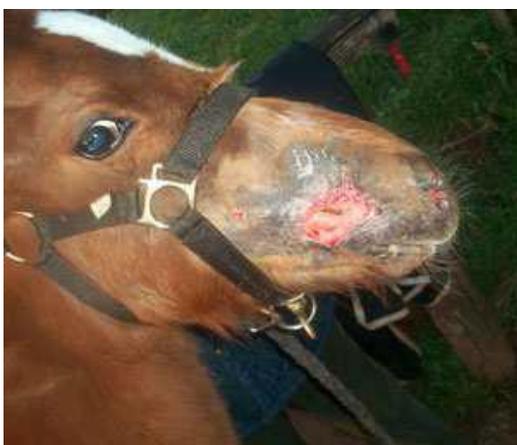


Fig.17: giorno 21 (Carnevali et al., 2014)

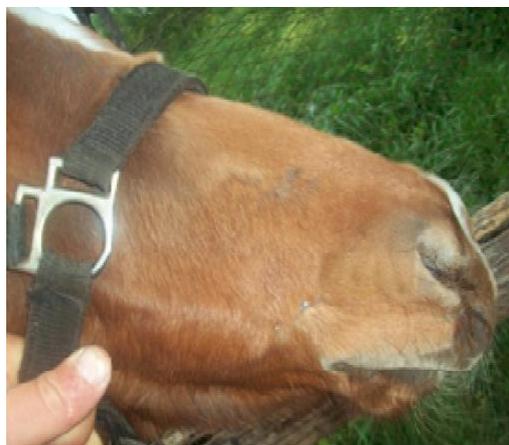


Fig.18: giorno 60 (Carnevali et al., 2014)

Recentemente è stato effettuato uno studio preliminare, retrospettivo, senza controllo, riguardo l'utilizzo di one VET nel trattamento delle piodermiti del cane, diventato successivamente oggetto della tesi "*One VET: una miscela di fitoterapici per la terapia delle piodermiti del cane: studio preliminare*".

Il trattamento d'elezione delle piodermiti, come apprendiamo dalla letteratura, si basa sulla somministrazione sistemica di antibiotici per lunghi periodi, anche dopo la scomparsa della sintomatologia clinica, accompagnata dall'uso topico di disinfettanti (Ihrke, 1986; Fourrier et al., 1988; Harvey, 1996; Paradis et al., 2001). Pochissimi autori (Scott et al., 2006) riportano della risoluzione terapeutica in meno di 40 giorni (in questo articolo è riportato l'uso dell'Orbifloxacina).

E' noto, tuttavia, come l'utilizzazione prolungata di antibiotici porti alla selezione di ceppi di germi resistenti, difficili da debellare, in un circolo vizioso che

comporta un progressivo aggravamento delle condizioni cliniche dei pazienti che vanno incontro a recidive sempre più gravi e irrisolvibili (Bergan, 1981; Noble et al., 1992; Quinn et al., 1994; Lloyd et al., 1996; Lloyd et al., 1999; Werckenthin et al., 2001; Holm et al., 2002; Rantala et al., 2004; Loeffler et al., 2007). Questa selezione riguarda sia l'agente eziologico delle piodermiti, vale a dire *Staphylococcus* spp (*intermedius*, *aureus*, ecc.) (Noble et al., 1992; Pak et al., 1999), sia la flora microbica saprofita normalmente residente nell'intestino, specificamente *Escherichia coli*, ma anche *Klebsiella*, *Enterococchi*, *Pseudomonas* e *Serratia* (Hirsh et al., 1980; Monaghan et al., 1981; Van Belkum et al., 1996). La selezione di ceppi resistenti ha una gravissima ricaduta non solo in campo veterinario, ma anche in campo umano, dove la diffusione di ceppi Gram-negativi multi-resistenti sta diventando un problema di difficile soluzione e grande preoccupazione sociale (Donskey , 2004; Paterson et al., 2005; Ben-Ami et al., 2006; Rossi et al., 2006; Lee et al., 2006; Schwaber et al., 2006; Pop-Vicas et al., 2008).

La possibilità di risolvere le patologie sostenute da batteri, come le piodermiti, senza indurre antibiotico resistenza è fortemente auspicabile ma di difficile realizzazione, vista la diffusione della patologia e l'assenza di alternative all'utilizzazione degli antibiotici (Pop-Vicas et al., 2008).

Il medicamento one VET sembrerebbe rispondere a queste esigenze terapeutiche, in tempi rapidi e inferiori rispetto a quelli osservati con i trattamenti convenzionali, senza ripercussioni sullo sviluppo di batteri resistenti. In questo studio è stato osservato un abbattimento della carica microbica sostenuta da *Staphylococcus aureus* (parzialmente resistente), senza utilizzare la terapia antibiotica, sistemica o locale.

L'effetto antimicrobico era stato già evidenziato in medicina umana, in uno studio del 2007, condotto presso una clinica di Lucca, quando il medicamento MIX 557 era ancora in fase di sperimentazione. In questo caso il trattamento di un'ulcera cronica, infetta da oltre un milione e mezzo di Unità Facenti Colonia (UFC) di *S. aureus* multiresistente, in tre giorni ha portato ad una riduzione drastica e duratura della carica microbica, arrivando a valori pari a 4.000 Unità Facenti Colonie (UCF), che corrispondono ad una normale "colonizzazione" della superficie lesa.

La diminuzione della carica batterica è stata accompagnata anche dalla riduzione del dolore, causato dalla persistenza dell'inflammazione, a dimostrazione che il controllo della carica batterica permette alla lesione di procedere più velocemente dalla fase infiammatoria verso la fase di granulazione (Mosti & Iabichella, 2007).

Un'esperienza simile è stata ripetuta nel 2011 in una paziente con ulcera a gambaleto persistente da oltre 17 anni e colonizzata, da oltre due anni, da *Acinetobacter baumannii* e *calcoaceticus*, entrambi multi-resistenti. Il trattamento con il medicamento *IPrimary Wound Dressing*® ha determinato una variazione della popolazione batterica, residente sull'ulcera, che da multiresistente è diventata sensibile a tutti gli antibiotici, dopo un mese di trattamento topico. Questo cambiamento ha consentito di poter eseguire il trapianto di cute sull'intera ulcera, con un successo di attecchimento del 100% (Carnevali et al., 2011).

Läuchli nel 2012 ha condotto uno studio su 105 pazienti reclutati in diversi ospedali della Svizzera. I soggetti, con un'età media di 54 anni, presentavano ferite eterogenee per eziologia e decorso, quali: ulcere, piaghe da decubito, ferite traumatiche, ferite post-chirurgiche ed ulcere diabetiche del piede. In seguito al trattamento con *IPrimary Wound Dressing*®, per un tempo medio di due mesi, si sono ottenuti i seguenti risultati:

- ~ chiusura completa delle lesioni in 63 casi su 105;
- ~ incremento nella velocità di formazione del tessuto di granulazione nel 54% dei soggetti trattati;
- ~ facile rimozione della crosta dal letto della ferita;
- ~ riduzione dei fenomeni di aderenza tra il tessuto di granulazione e gli eventuali bendaggi applicati.

Gli autori concordano nel dichiarare l'effettiva efficacia del medicamento nell'induzione dei fenomeni di guarigione. Tuttavia, i dati più sorprendenti, sono stati raccolti, sempre da Läuchli et al. (2012), nel trattamento di ferite del cranio, conseguenti all'escissione chirurgica di masse neoplastiche, con esposizione del tessuto osseo. La guarigione, di questo tipo di lesione, per seconda intenzione

rappresenta solitamente una sfida, a causa della scarsa e lenta produzione di tessuto di granulazione nel suddetto distretto anatomico; come conseguenza, è spesso necessario procedere attraverso la creazione di flap o innesti cutanei a spessore parziale. Tuttavia queste tecniche, oltre a risultare costose, sono sconsigliate nei pazienti anziani per i rischi anestesilogici connessi. Anche in questo studio l'uso del *1 Primary Wound Dressing*® ha dato ottimi risultati in termini di incremento della velocità e formazione del tessuto di granulazione. Seguono le immagini di alcuni casi trattati.



Fig. 19: aspetto della lesione a 40 giorni dall'intervento, inizio del trattamento (a); aspetto della lesione dopo 3 settimane di trattamento (b); cicatrizzazione completa in 8 settimane (c). (Läuchli, 2012).



Fig. 20: giorni di trattamento 0-7-14-98 (Läuchli, 2012).

Nella tesi “*IPrimary Wound Dressing® per il trattamento delle lesioni acute*” Master in “Gestione delle lesioni cutanee Wound Care” è stato analizzato il decorso di 59 lesioni di diversa natura, dimostrando l’efficacia del trattamento *IPrimary Wound Dressing®* senza l’utilizzo di agenti disinfettanti/antimicrobici, spesso causa di danno al tessuto di granulazione neoformato. I dati più sorprendenti riguardano la risoluzione delle abrasioni da asfalto e delle deiscenze chirurgiche. Nel primo caso parliamo di lesioni che guariscono solitamente in 4 settimane con un trattamento iniziale che prevede l’utilizzo di disinfettanti, segue lo sviluppo di un’escara che rimane adesa al letto della ferita fino a completa epitelizzazione. Con l’applicazione del protocollo *IPrimary Wound Dressing®* questo tipo di lesione si risolve in 7-10 giorni senza crosta di copertura. Degno di nota è il caso di un paziente (BA-67-M) che presentava deiscenza laparotomica completa con sventramento. L’applicazione del medicamento direttamente sulle superfici da accostare in fase di ricostruzione plastica determina una guarigione della ferita per prima intenzione, senza necessità di applicare drenaggi e senza recidiva dei fenomeni di deiscenza (Tesi Master, Di Venanzio, 2014).

Infine, *IPrimary Wound Dressing®* è stato utilizzato efficacemente nel trattamento delle ustioni di secondo grado, senza necessità di associare antimicrobici/disinfettanti istolesivi, determinando così la guarigione delle lesioni nei tempi fisiologici di tre settimane e riducendo il dolore di base e quello percepito alla medicazione, con notevole sollievo dei pazienti trattati (Mainetti and Carnevali, 2013).

La casistica riportata ci permette di riconoscere nel MIX 557 (*IPrimary Wound Dressing®/one VET*) un presidio fitoterapico adeguato alla gestione di ferite importanti, con un decorso senza complicazioni, anche in assenza di adeguate condizioni igienico-sanitarie. Se questo è vero per la veterinaria, lo è ancora di più per la medicina umana, dove il medicamento ha dimostrato il suo potenziale nella guarigione di lesioni acute e croniche con risultati uguali, e spesso superiori, ai presidi attualmente esistenti.

6. PARTE SPERIMENTALE

Lo studio oggetto del presente elaborato è stato frutto della collaborazione tra il parco canile E.N.P.A (località Collestrada, PG), diretto dalla prof.ssa Paola Matrigali Tintori, il Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Perugia e la Dott.ssa Fiorella Carnevali, primo ricercatore presso il dipartimento Biorad-Rab del Centro Ricerche Enea Casaccia, responsabile della fornitura del medicamento denominato one VET e dell'elaborazione dei dati raccolti.

Lo studio aveva lo scopo di verificare l'efficacia del presidio fitoterapico nel trattamento delle ferite acute e croniche del cane, secondo il protocollo ALL in ONE che prevede one VET come unico dressing primario, senza uso di disinfettanti/antimicrobici, anche in condizioni igienico-sanitarie disagiate, proprio come quelle riscontrate nel presente studio.

6.1 MATERIALI E METODI

L'arruolamento dei soggetti da trattare è stato effettuato previa valutazione clinica da parte del Dott. Luca Massaroni (veterinario interno alla struttura E.N.P.A) e della Dott.ssa Maria Beatrice Conti (Ricercatore presso il Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Perugia), che hanno selezionato lesioni acute e croniche, di origine traumatica e non. Prerogativa di inclusione nello studio è stata l'assenza di trattamenti antibiotici e/o cortisonici effettuati nelle tre settimane precedenti l'inizio del trattamento.

6.1.1 Reclutamento e raccolta dati dei pazienti

Nel presente studio sono state trattate 17 ferite in 6 cani.

Due dei soggetti individuati, giunti presso il canile da circa 4 mesi, mostravano paresi del treno posteriore ed erano caratterizzati dalla presenza di lesioni connesse a questa condizione debilitante, ovvero piaghe da decubito e ferite

traumatiche da sfregamento, per un totale di 4 lesioni riscontrate nel caso 1, Nino, e 5 lesioni riscontrate nel caso 2, Nico.

I casi 3 e 5 presentavano ferite traumatiche da grattamento da almeno 3 mesi, conseguenti ad una reazione allergica alle pulci, mentre il caso 4 mostrava una lesione da grattamento e/o leccamento compulsivo, probabilmente causati dallo stress ambientale.

Infine sul caso 6, positivo verso Leishmania, abbiamo evidenziato ferite traumatiche persistenti da molto tempo (circa 6 mesi) probabilmente legate alla malattia parassitaria in atto che ha portato a morte l'animale due mesi dopo la fine del nostro studio.

Per ogni soggetto arruolato è stata compilata una scheda di registrazione dove sono state riportate informazioni riguardo:

- ~ segnalamento;
- ~ motivo della visita;
- ~ anamnesi dermatologica attuale e pregressa;
- ~ descrizione e localizzazione della/e lesione/i;
- ~ eventuali trattamenti antiparassitari eseguiti in precedenza;
- ~ dieta dell'animale;
- ~ protocollo terapeutico effettuato (con data di inizio e fine trattamento);
- ~ tamponi microbiologici effettuati.

Di seguito è riportato il modello su cui sono stati registrati i dati durante la prima visita e le successive visite di controllo.

Medico Veterinario :

DATA:

DATI IDENTIFICATIVI CANE

NOME

SESSO

RAZZA

DATA DI NASCITA/ETÀ

ANIMALE STERILIZZATO QUANDO

SE FEMMINA , HA CALORI NORMALI?

GRAVIDANZE?

NOME PRORIETARIO

INDIRIZZO:

TEL.

MOTIVO DELLA VISITA

ANAMNESI DERMATOLOGICA REMOTA

DESCRIZIONE E LOCALIZZAZIONE DELLE LESIONI (INDICARE ANCHE IL RIFERIMENTO FOTOGRAFICO)

LOTTA CONTRO PULCI E ZECHE	
	PRODOTTO
DATA ULTIMO TRATTAMENTO ANTIPARASSITARIO	
FREQUENZA CON CUI VIENE LAVATO L'ANIMALE UTILIZZATO	PRODOTTO
PARASSITI VISIBILI	
DIETA DELL'ANIMALE	
PROTOCOLLO TERAPEUTICO:	
DATA TAMPONI MICROBIOLOGICI	
DATA PROSSIMO CONTROLLO	

Tab.1: modello della scheda identificativa del paziente

Dopo l'identificazione del soggetto si è passati all'individuazione anatomica della lesione e successiva tolettatura mediante lavaggio con acqua di fonte. Non è stato possibile effettuare la rasatura della cute peri-lesionale che avrebbe facilitato la valutazione clinica sia dell'estensione della lesione, sia dell'evoluzione del processo cicatriziale.

6.1.2 Classificazione delle lesioni

Come accennato in precedenza, dei 6 cani reclutati, 2 risultavano colpiti da paresi del treno posteriore e come conseguenza mostravano piaghe da decubito e ferite da sfregamento. Queste ultime legate sia al trascinamento del posteriore a terra, sia allo sfregamento degli arti paralizzati contro le cinghie dei carrellini su cui venivano spesso posizionati per favorire la deambulazione dell'animale.

Nei restanti soggetti, invece, sono state evidenziate lesioni di origine traumatica legate alla compulsione al grattamento e al lambimento, causata da ectoparassitosi (allergia da pulci) o alterazioni comportamentali (stress ambientale). In questi casi abbiamo evidenziato l'insorgenza di complicazioni batteriche secondarie con sviluppo di dermatite pio-traumatica (hot spot).

Le lesioni trattate sono state pertanto classificate nelle seguenti categorie:

- ~ PIAGHE DA DECUBITO: localizzate prevalentemente nella regione ischiatica e tarsale;
- ~ FERITE TRAUMATICHE DI VARIA NATURA: tra cui ferite lacero-abrasive dovute al contatto e trascinamento degli arti a terra, autotraumatismi da grattamento e lambimento, dermatiti pio-traumatiche.

6.1.3 Protocollo di trattamento delle lesioni

Le lesioni sono state trattate quotidianamente (1 trattamento al giorno, sempre alla stessa ora) con il dispositivo medico one VET come unico dressing primario, senza uso di disinfettanti o antimicrobici locali, anche in condizioni igienico-sanitarie difficili, come quelle riscontrate sia nei soggetti impossibilitati a deambulare, i quali venivano talvolta ritrovati sporchi di feci e di urina, sia in quelli affetti da leishmaniosi, che notoriamente ostacola la cicatrizzazione delle lesioni cutanee (McMahon-Pratt & Alexander, 2004)

Il protocollo del trattamento è stato il seguente:

- ~ Lavaggio della ferita con Soluzione Salina per rimuovere l'eventuale sporcizia ed essudato superficiale;
- ~ Asciugatura della superficie lesa con garze sterili;

- ~ Applicazione di one VET in quantità sufficiente a coprire la lesione;
- ~ Applicazione, quando possibile, e per almeno 20 minuti, del collare elisabetiano per assicurarsi che il paziente non asporti via il prodotto dalla ferita mediante lambimento.

In nessun caso è stato possibile proteggere le lesioni con fasciatura e pertanto sono state lasciate scoperte per tutta la durata del trattamento. Nella figura che segue sono rappresentati i dispositivi utilizzati per il protocollo di medicazione.



Fig. 1: dispositivi utilizzati per la medicazione.

L'immagine che segue, mostra la modalità d'uso del prodotto presa dal foglietto illustrativo di *1 Primary Wound Dressing*®, equivalente di oneVET in medicina umana.

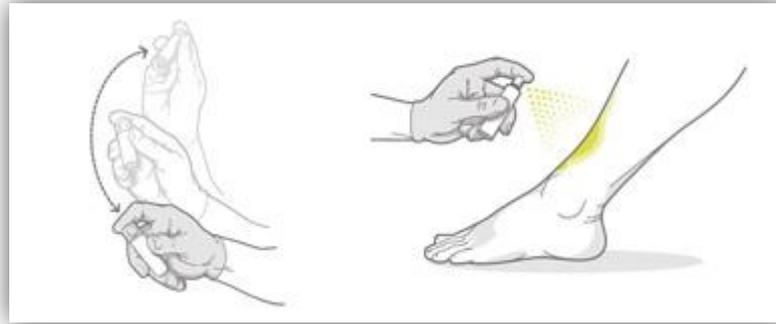


Fig. 2: modalità di applicazione del prodotto.

I trattamenti si sono susseguiti fino a completa riepitelizzazione della ferita.

6.1.4 Raccolta dati

Documentazione fotografica

Ogni lesione è stata fotografata mediante fotocamera digitale con inserimento di un riferimento metrico (righello di 5-10 cm di lunghezza) all'interno del campo (in almeno una foto per lesione), con attenzione a porre il righello sullo stesso piano della ferita, senza coprirlo, per permettere, in seguito, di calcolarne le dimensioni effettive, senza distorsioni. La documentazione fotografica è stata raccolta ogni sette giorni per ogni lesione di ciascun caso.

Una volta acquisite, le immagini digitali sono state processate mediante software Autocad 2005 in dotazione all'ENEA per il calcolo delle dimensioni della lesione (area in cm²).

Di seguito si riporta l'immagine del programma Autocad in esecuzione: dopo aver selezionato la foto della lesione da valutare, si utilizza la funzione *polilinea chiusa* per tracciare il perimetro della ferita, che sarà utilizzato dal software per ricavare il valore dell'area iniziale.

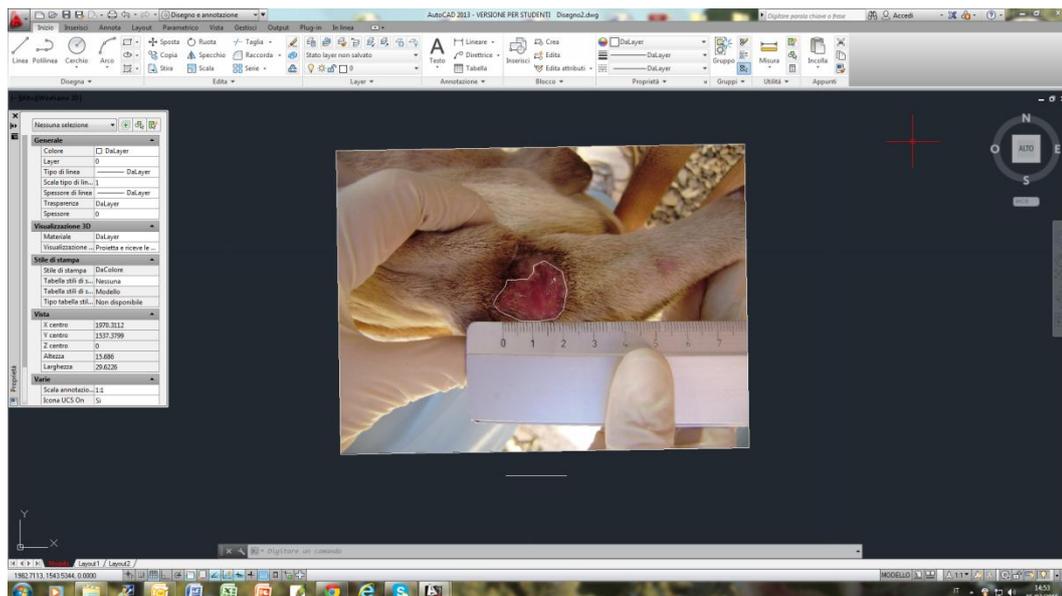


Fig. 3: immagine della lesione importata in Autocad e profilo tracciato mediante polilinea chiusa per il calcolo dell'area iniziale (AI).

Tamponi

Ad ogni visita, e prima di eseguire qualunque trattamento, è stato prelevato un tampone dalla superficie della ferita per realizzare l'esame colturale e relativo antibiogramma. Ciò allo scopo di identificare la/e specie batteriche presenti sulla lesione e l'eventuale antibiotico-resistenza (sviluppata in seguito ai progressi trattamenti antibiotici subiti).

Questa procedura è stata ripetuta ogni sette giorni per ogni paziente e, quando possibile, per ogni lesione, fino ad epitelizzazione avvenuta.

Da tutti i dati raccolti sono stati estrapolati i seguenti parametri:

- ~ La misurazione dell'estensione iniziale di ogni lesione di seguito denominata **Area Iniziale (AI)** in cm² e le dimensioni della lesione intermedie fino alla epitelizzazione;
- ~ Il tempo di risoluzione della lesione con epitelizzazione senza attendere la comparsa della copertura pilifera (**Time To Heal = TTH**);
- ~ Valutazione del tasso di epitelizzazione secondo la formula di Stashak (1991) di seguito denominata **Stashak Epitelialization Rate (SER)** che

corrisponde al calcolo del raggio dell'area iniziale diviso per il tempo di guarigione ($\sqrt{AI/\pi}/TTH$), calcolabile solo a guarigione avvenuta;

~ Informazioni relative alla **colonizzazione batterica** e relativo antibiogramma, correlate al decorso clinico di ogni lesione.

6.2 Risultati

Nel presente studio sono state trattate 17 lesioni in 6 soggetti (specie canina) reclutati nel Parco Canile E.N.P.A. loc. Collestrada. L'incongruenza tra il numero dei pazienti e quello delle lesioni è giustificata dal fatto che alcuni di essi riportavano più ferite distribuite in diversi distretti anatomici. La persistenza delle lesioni era per tutti superiore a quattro mesi circa, pur non essendo stato possibile risalire alla precisa data di comparsa.

Nella tabella 2 sono riportati tutti i dati relativi ad ogni singola ferita trattata.

Nella tabella 3, invece, sono riportati i dati mediati per tutte le lesioni che ogni paziente portava su di sé.

Caso	N. lesioni	Data inizio trattamento	Data fine trattamento	TTH (days)	Area iniziale	$\sqrt{(AI/T)}/TTH$ cm/day	Categoria ferite
Nino	1	27-9-14	1-11-14	35	1,53	0,02	decubito
	2	27-9-14	18-10-14	21	2,44	0,04	decubito
	3	27-9-14	1-11-14	35	1,48	0,02	traumatica
	4	4-10-14	8-11-14	35	6,65	0,04	traumatica
Nico	5	27-9-14	1-11-14	35	12,64	0,06	traumatica
	6	27-9-14	11-10-14	14	0,68	0,03	decubito
	7	27-9-14	8-11-14	42	5,77	0,03	decubito
	8	4-10-14	1-11-14	28	4,01	0,04	traumatica
	9	18-10-14	1-11-14	14	1,27	0,05	traumatica
UC3	10	27-9-14	11-10-14	14	14,40	0,15	traumatica
	11	27-9-14	11-10-14	14	10,47	0,13	traumatica
UA8	12	27-9-14	11-10-14	14	1,02	0,04	traumatica
Bingo	13	4-10-14	8-11-14	35	2,90	0,03	traumatica
	14	18-10-14	8-11-14	21	3,72	0,05	traumatica
M6	15	27-9-14	8-11-14	42	6,98	0,04	traumatica
	16	27-9-14	1-11-14	35	5,61	0,04	traumatica
	17	4-10-14	1-11-14	28	10,15	0,06	traumatica

Tab. 2: elenco dei casi trattati e corrispettivi dati rilevati (data inizio/fine trattamento; TTH; Area Iniziale, SER tasso di epitelizzazione, tipo di lesione)

Paziente	N.	N. lesioni	TTH(days)	Area iniziale Media e Dev st	$\sqrt{(AI/[])/TTH}$ cm/day
Nino	1	4	31,50±7,00	3,02±2,46	0,03±0,01
Nico	1	5	26,60±12,52	4,87±4,81	0,04±0,01
UC3	1	2	14,00±0,00	12,43±2,78	0,14±0,02
UA8	1	1	14	1,0177	0,04
Bingo	1	2	22,87±9,90	5,17±0,58	0,05±0,02
M6	1	3	35,00±7,00	7,58±2,33	0,05±0,02
Totale	6	17	27,18±10,47	5,39±4,29	0,05±0,04

Tab. 3: Elenco dei casi trattati riuniti per paziente e relativi dati ottenuti

Di seguito si riporta la descrizione anamnestica e fotografica di ogni singolo soggetto, il decorso delle lesioni trattate e i dati raccolti durante il decorso cicatriziale comprensivi dei risultati microbiologici (tipo di batterio riscontrato) e relativo antibiogramma.

CASO 1: NINO

FOTO



RAZZA METICCIO

SESSO MASCHIO INTERO

ETÀ 5 ANNI C.A

LOTTA VS PULCI E ZECCHIE SI, FIPRONIL

LESIONI
1-REGIONE ISCHIATICA SX
2-TARSO POSTERIORE DX
3-SUP.DORSALE METATARSO POST.DX
4-FALAGI ARTO POST.DX

TEMPO DI INSORGENZA 4 MESI circa

RISOLUZIONE TUTTE E 4 LE LESIONI HANNO AVUTO UN ESITO POSITIVO

TERAPIA ANTIBIOTICA NO

NOTE 1-PARESI POST-TRAUMATICA DEL TRENO POSTERIORE

DECORSO DELLE LESIONI:

LESIONE	Giorno 0 27-sett-14	Giorno 7 04-ott-14	Giorno 14 11-ott-14
1- REGIONE ISCHIATIC A SX			
	Giorno 21 18-ott-14	Giorno 28 25-ott-14	Giorno 35 01-nov-14
			
2-TARSO DX	Giorno 0 27-sett-14	Giorno 7 04-ott-14	Giorno 14 11-ott-14
			
	Giorno 21 18-ott-14		
			
3- SUP.DORS. METATAR SO DX	Giorno 0 27-sett-14	Giorno 7 04-ott-14	Giorno 14 11-ott-14
			



Sfruttando le foto raccolte ogni sette giorni, per ogni lesione, è stato possibile effettuare la misurazione progressiva dell'Area della ferita, mediante Autocad. I dati ottenuti sono riportati nella tabella che segue.

Caso 1: Nino				
Lesione	Regione Ischiatica sx	Tarso dx	Metatarso dx	Falange post dx
Giorni	Area cm2	Area cm2	Area cm2	Area cm2
0	1,5291	2,4407	1,4762	6,648
7	1,4168	0,5687	0,5984	2,1775
14	0,6189	0,0069	0,5848	1,65
21	0,7442	Guarito	0,3069	0,8701
28	0,0501		0,2894	0,3396
35	Guarito		0,1496	Guarito
42			Guarito	

Tab.4: dati relativi al calcolo dell'area della lesione per ogni ferita e per tutta la durata del trattamento.

Le tabelle che seguono riportano i dati sulla valutazione della popolazione microbica presente sulle ferite, e relativo antibiogramma, ricavati da tamponi eseguiti ogni sette giorni su tutte le lesioni.

Caso 1: NINO Lesione ischiatrica	S. aureus	S. pseudin.	S. aureus	S. pseudin.	S. pseudint.
	Giorno 0 27/09/2014	Giorno 7 04/10/2014	Giorno 14 11/10/2014	Giorno 21 18/10/2014	Giorno 28 25/10/2014
CEFADROXIL	-	I	S	S	S
AMOXICILLINA/AC .CLAV	-	R	R	S	S
AC. FUSIDICO	-	S	R	R	R
CEFOVECINA	-	R	I	I	N.D
MUPIROCINA	-	I	R	I	I
LINCOMICINA	-	R	R	R	R
GENTAMICINA	-	I	S	S	S
DOXICICLINA	-	S	R	S	R
CEFTAZIDIME	-	I	S	I	R
PRADOFLOXACIN	-	S	R	I	R
SPIRAMICINA	-	R	R	I	N.D
SULPHAMESSOZAL O	-	R	R	S	R

Tab. 5: risultati del tampone microbiologico e relativo antibiogramma, lesione 1 caso 1.

Caso 1: NINO Lesione 2: regione tarso dx	S. aureus	S. pseudint.	S. pseudint.	RIEPIT.
	Giorno 0 27/09/2014	Giorno 7 04/10/2014	Giorno 14 11/10/2014	Giorno 21 18/10/2014
CEFADROXIL	S	R	S	-
AMOXICILLINA/AC.CLAV	S	R	S	-
AC. FUSIDICO	R	S	R	-
CEFOVECINA	I	R	R	-
MUPIROCINA	I	I	I	-
LINCOMICINA	I	R	R	-
GENTAMICINA	I	R	I	-
DOXICICLINA	R	I	I	-
CEFTAZIDIME	R	R	R	-
PRADOFLOXACIN	R	S	R	-
SPIRAMICINA	R	R	R	-
SULPHAMESSOZALO	R	R	R	-

Tab.6: risultati del tampone microbiologico e relativo antibiogramma, lesione 2 caso 1.

Caso 1: NINO Lesione 3: metatarso dx sup. dorsale	S. aureus	S. aureus	S. pseudint.	S. pseudint.	S. pseudint.
	Giorno 0 27/09/2014	Giorno 7 04/10/2014	Giorno 14 11/10/2014	Giorno 21 18/10/2014	Giorno 0 27/09/2014
CEFADROXIL	-	I	S	I	I
AMOXICILLINA/ AC.CLAV	-	S	S	S	S
AC. FUSIDICO	-	R	R	R	R
CEFOVECINA	-	S	R	R	N.D
MUPIROCINA	-	R	I	I	I
LINCOMICINA	-	R	R	R	R
GENTAMICINA	-	I	I	S	S
DOXICICLINA	-	S	I	I	I
CEFTAZIDIME	-	R	R	R	R
PRADOFLOXACIN	-	S	R	R	R
SPIRAMICINA	-	S	R	I	N.D
SULPHAMESSOZALO	-	S	R	I	R

Tab.7: risultati del tampone microbiologico e relativo antibiogramma, lesione 3 caso 1.

Lesione 4: interdigitale arto post dx	S.aureus	Pseudomonas	S.pseudint.	S.pseudint.	S. aureus	S.pseudint.
	Giorno 0 04/10/14	Giorno 0 04/10/14	Giorno 7 11/10/14	Giorno 14 18/10/14	Giorno 21 25/10/14	Giorno 28 1/11/14
CEFADROXIL	S	-	S	R	S	S
AMOXICILLINA/ AC.CLAV	S	-	S	S	S	S
AC. FUSIDICO	R	-	R	R	R	R
CEFOVECINA	I	-	I	R	N.D	N.D
MUPIROCINA	R	-	I	I	I	R
LINCOMICINA	I	-	I	R	R	R
GENTAMICINA	I	-	R	R	S	S
DOXICICLINA	S	-	S	R	I	I
CEFTAZIDIME	R	-	I	R	R	R
PRADOFLOXACIN	S	-	R	R	R	R
SPIRAMICINA	S	-	R	I	N.D	N.D
SULPHAMESSOZALO	S	-	R	R	R	R

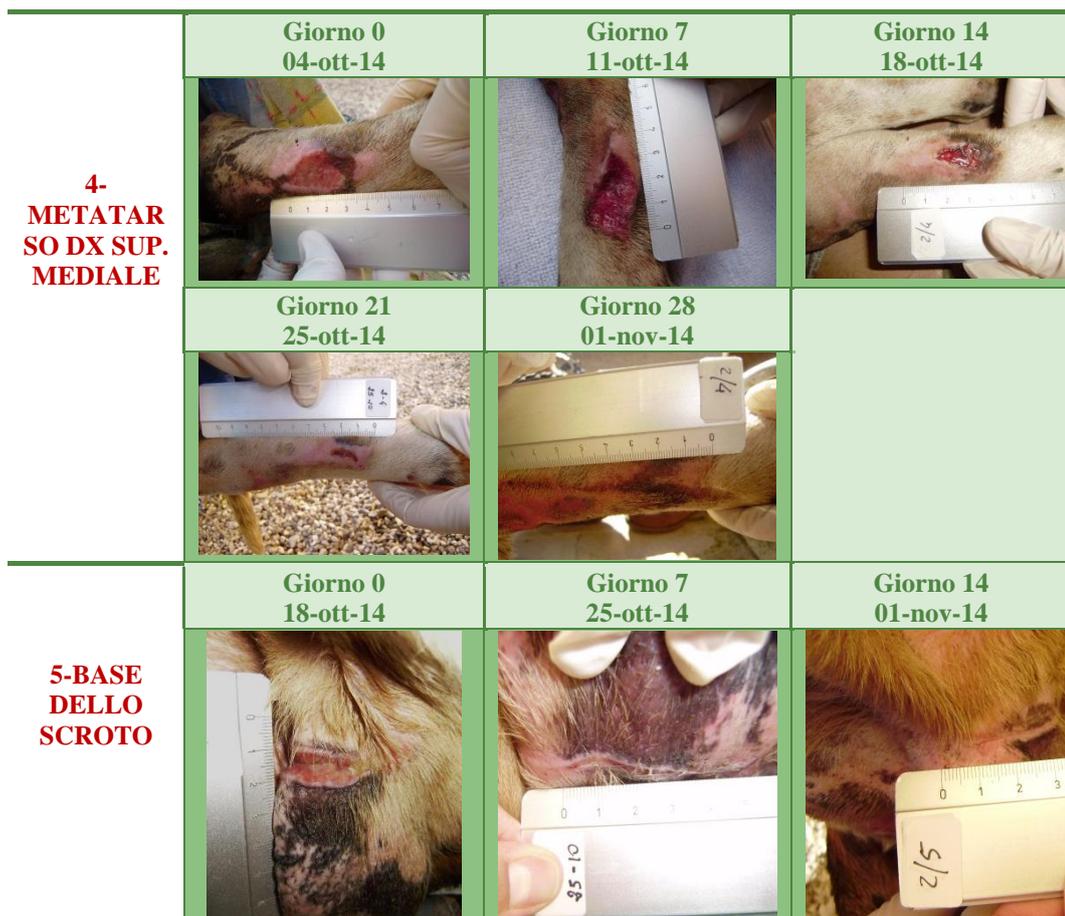
Tab. 8: risultati del tampone microbiologico e relativo antibiogramma, lesione 4 caso 1.

CASO 2: NICO

FOTO	
RAZZA	METICCIO
SESSO	MASCHIO INTERO
ETÀ	6 ANNI C.A
LOTTA VS PULCI E ZECHE	SI, FIPRONIL
LESIONI	1-METATARSO POST DX SUP.LATERALE 2-REGIONE ISCHIATICA DX 3-ARTICOLAZIONE TARSO METATARSICA ARTO SX 4-METATARSO POST DX SUP.MEDIALE 5-BASE DELL'P SCROTO
TEMPO DI INSORGENZA	4 MESI circa
RISOLUZIONE	1-SI 2-SI 3-PEGGIORAMENTO LEGATO ALLA PERSISTENZA DELL'AGENT CAUSALE 4-SI
TERAPIA ANTIBIOTICA	IL 15-OTT-14 INIZIA LA TERAPIA ANTIBIOTICA PER UNA CONCOMITANTE PATOLOGIA GASTRO-INTESTINALE
NOTE	1-PRESI POSRT-TRAUMATICA DEL TRENO POSTERIORE 2-LE FERITE SONO SPESSO IMBRATTATE DALLE FECI DELL'ANIMALE CHE NON CONTROLLA IL RIFLESSO DELLA DEFECAZIONE E DELLA MINZIONE.

DECORSO DELLE LESIONI:

LESIONE	Giorno 0 27-sett-14	Giorno 7 04-ott-14	Giorno 14 11-ott-14
1- METATAR SO SUP.LATE RALE			
	Giorno 21 18-ott-14	Giorno 28 25-ott-14	Giorno 35 01-nov-14
			
	2- REGIONE ISCHIATIC A DX	Giorno 0 27-sett-14	Giorno 7 04-ott-14
			
3- ARTICOLA Z. TARSO- METATAR SICA SX		Giorno 0 27-sett-14	Giorno 7 04-ott-14
			
	Giorno 21 18-ott-14	Giorno 28 25-ott-14	Giorno 35 01-nov-14
			
Giorno 42 08-nov-14			
			



Sfruttando le foto raccolte ogni sette giorni per ogni lesione, è stato possibile effettuare la misurazione progressiva dell'Area della ferita, mediante Autocad. I dati ottenuti sono riportati nella tabella che segue.

Caso 2: Nico					
Lesione	Metatarso dx	Regione ischiatica dx	Artic. Tarso-metatarsica sx	Metatarso dx	Base dello scroto
Giorni	Area cm2	Area cm2	Area cm2	Area cm2	Area cm2
0	12,6416	0,6754	5,774	4,0051	1,265
7	n.d.	0,2769	5,9322	3,0912	n.d
14	n.d.	0,3806	3,7267	1,2838	guarito
21	n.d.	guarito	3,8311	0,5611	
28	n.d		4,3827	guarito	
35	1,1346		4,0601		
42	guarito		4,4479		
49			non guarito		

Fig. 9: dati relativi al calcolo dell'area della lesione per ogni ferita e per tutta la durata del trattamento.

Le tabelle che seguono riportano i dati riguardanti la valutazione della popolazione microbica presente sulle ferite, e relativo antibiogramma, ricavati da tamponi eseguiti ogni sette giorni su tutte le lesioni.

Caso 2: NICO Lesione 1: parte esterna metatarso dx	S.pseudint	E.coli	S.pseudint	E.coli	S.pseudint	Pseudomonas
	Giorno 0 27/09/2014	Giorno 0 27/09/14	Giorno 7 04/10/2014	Giorno 7 04/10/14	Giorno 14 11/10/2014	Giorno 14 11/10/2014
CEFADROXIL	R	-	R	R	-	R
AMOXICILLIN A/AC.CLAV	R	-	R	R	-	R
AC. FUSIDICO	R	-	R	R	-	R
CEFOVECINA	R	-	R	R	-	I
MUPIROCINA	R	-	R	R	-	R
LINCOMICINA	R	-	R	R	-	R
GENTAMICINA	R	-	I	S	-	S
DOXICICLINA	S	-	I	S	-	R
CEFTAZIDIME	R	-	R	I	-	I
PRADOFLOXAC IN	R	-	R	S	-	R
SPIRAMICINA	R	-	R	R	-	R
SULPHAMESSO ZALO	R	-	R	S	-	S

Tab. 10-a: risultati del tampone microbiologico e relativo antibiogramma, lesione 1 caso 2.

Continuo Lesione 1: parte esterna metatarso dx	S. pseudint.	Klebsiella	S. pseudoint.	S. aureus
	Giorno 21 18/10/2014	Giorno 21 18/10/2014	Giorno 28 25/10/2012	Giorno 35 01/11/2014
CEFADROXIL	R	R	R	R
AMOXICILLINA/AC.CLAV	R	R	R	R
AC. FUSIDICO	R	R	R	R
CEFOVECINA	R	I	N.D	N.D
MUPIROCINA	R	R	R	R
LINCOMICINA	R	R	R	R
GENTAMICINA	R	S	R	I
DOXICICLINA	R	R	R	I
CEFTAZIDIME	R	R	R	R
PRADOFLOXACIN	R	R	R	R
SPIRAMICINA	R	R	N.D	N.D
SULPHAMESSOZALO	R	R	R	R

Tab. 10-b: continuo risultati del tampone microbiologico e relativo antibiogramma, lesione 1 caso 2.

Caso 2: NICO Lesione 2: regione ischiatrica dx	S. pseudint.	E.coli	E.coli	S. pseudint.	S. pseudint.	Pseudom onas
	Giorno 0 27/09/2014	Giorno 0 27/09/14	Giorno 7 04/10/14	Giorno 7 04/10/2014	Giorno 14 11/10/2014	Giorno 14 11/10/2014
CEFADROXIL	-	-	R	R	S	-
AMOXICILLI NA/AC.CLAV	-	-	I	R	R	-
AC. FUSIDICO	-	-	R	R	R	-
CEFOVECINA	-	-	R	R	R	-
MUPIROCINA	-	-	R	R	I	-
LINCOMICIN A	-	-	R	R	R	-
GENTAMICIN A	-	-	S	I	I	-
DOXICICLIN A	-	-	S	R	R	-
CEFTAZIDIM E	-	-	I	R	I	-
PRADOFLOX ACIN	-	-	S	R	R	-
SPIRAMICIN A	-	-	R	R	R	-
SULPHAMESS OZALO	-	-	S	I	R	-

Tab. 11:risultati del tampone microbiologico e relativo antibiogramma, lesione 2 caso 2.

Caso 2: NICO Lesione 3:art. tarso-metatarsica sx	E.coli	S. pseudint.	S. pseudint.	E.coli	S. pseudoint.
	Giorno 0 27/09/2014	Giorno 0 27/09/2014	Giorno 7 04/10/2014	Giorno 7 04/10/14	Giorno 14 11/10/2014
CEFADROXIL	R	-	R	-	I
AMOXICILLINA/AC. CLAV	I	-	R	-	R
AC. FUSIDICO	R	-	R	-	R
CEFOVECINA	I	-	R	-	R
MUPIROCINA	R	-	R	-	R
LINCOMICINA	R	-	R	-	R
GENTAMICINA	S	-	R	-	S
DOXICICLINA	S	-	R	-	I
CEFTAZIDIME	S	-	R	-	I
PRADOFLOXACIN	S	-	R	-	R
SPIRAMICINA	R	-	R	-	R
SULPHAMESSOZAL O	S	-	R	-	R

Tab. 12-a: risultati del tampone microbiologico e relativo antibiogramma, lesione 3 caso 2.

Continuo Lesione 3:art. tarso- metatarsica sx	Pseudomonas	S pseudoint	S Pseudoint	S Aureus
	Giorno 14 11/10/14	Giorno 21 18/10/2014	Giorno 28 25/10/2014	Giorno 35 01/11/2014
CEFADROXIL	-	R	R	R
AMOXICILLINA/AC.CLAV	-	R	R	R
AC. FUSIDRICO	-	R	R	R
CEFOVECINA	-	R	N.D	N.D
MUPIROCINA	-	R	R	R
LINCOMICINA	-	R	R	R
GENTAMICINA	-	R	I	R
DOXICICLINA	-	R	R	R
CEFTAZIDIME	-	R	R	R
PRADOFLOXACIN	-	R	R	R
SPIRAMICINA	-	R	N.D	N.D
SULPHAMESSOZALO	-	R	R	R

tab.12-b: continuo risultati del tampone microbiologico e relativo antibiogramma, lesione 3 caso 2.

Caso 2: NICO Lesione 4: metatarso dx lato interno	E.coli	S. pseudint.	S. pseudint.	Pseudomo	S. pseudint.
	Giorno 0 04/10/2014	Giorno 0 04/10/2014	Giorno 7 11/10/2014	Giorno 7 11/10/2014	Giorno 14 18/10/2014
CEFADROXIL	R	R	R	-	R
AMOXICILLINA/ AC. CLAV	I	S	R	-	R
AC. FUSIDICO	R	R	R	-	R
CEFOVECINA	R	R	R	-	R
MUPIROCINA	R	R	R	-	R
LINCOMICINA	R	R	R	-	R
GENTAMICINA	I	I	R	-	R
DOXICICLINA	I	I	R	-	R
CEFTAZIDIME	I	R	R	-	R
PRADOFLOXACIN	S	R	R	-	R
SPIRAMICINA	R	R	R	-	R
SULPHAMESSOZ ALO	S	R	R	-	R

Tab. 13: risultati del tampone microbiologico e relativo antibiogramma, lesione 4 caso 2.

Caso 2: NICO Lesione 5: base dello scroto	S. aureus	Klebsiella	S. pseudint.
	Giorno 0 18/10/2014	Giorno 0 18/10/2014	Giorno 7 25/10/2014
CEFADROXIL	R	R	R
AMOXICILLINA/AC.CLAV	R	R	R
AC. FUSIDICO	R	R	R
CEFOVECINA	R	R	ND
MUPIROCINA	R	R	I
LINCOMICINA	R	R	R
GENTAMICINA	R	S	R
DOXICICLINA	R	R	R
CEFTAZIDIME	R	R	R
PRADOFLOXACIN	I	R	R
SPIRAMICINA	R	R	ND
SULPHAMESSOZALO	R	R	R

Tab.14: risultati del tampone microbiologico e relativo antibiogramma, lesione 5 caso 2.

CASO 3: UC3 DOGO ARGENTINO

<p>FOTO</p>	
<p>RAZZA SESSO ETÀ</p>	<p>DOGO ARGENTINO MASCHIO INTERO 5 ANNI C.A</p>
<p>LOTTA VS PULCI E ZECHE</p>	<p>IL TRATTAMENTO, EFFETTUATO UN MESE PRIMA DEL RECLUTAMENTO (FIPRONIL) HA PERSO D'EFFICACIA ED È PRESENTE UN'INFESTAZIONE DA PULCI</p>
<p>LESIONI</p>	<p>1-REGIONE FRONTALE DELLA TESTA 2-ZAMPA POST.DX</p>
<p>TEMPO DI INSORGENZA</p>	<p></p>
<p>RISOLUZIONE</p>	<p>1-SI 2-SI</p>
<p>TERAPIA ANTIBIOTICA</p>	<p>NO</p>
<p>NOTE</p>	<p>1-PRESENZA DI ALLERGIA DA PULCI, LESIONE DA GRATTAMENTO</p>

DECORSO DELLE LESIONI:

LESIONE	Giorno 0 27-sett-14	Giorno 7 04-ott-14	Giorno 14 11-ott-14
1- REGIONE FRONTAL E (TESTA)			
2-ZAMPA POST DX			

Sfruttando le foto raccolte ogni sette giorni per ogni lesione, è stato possibile effettuare la misurazione progressiva dell'Area della ferita, mediante Autocad. I dati ottenuti sono riportati nella tabella che segue

Caso 3: UC3 Dogo Argentino		
Lesione	Regione frontale	Zampa post.dx
Giorni	Area cm2	Area cm2
0	14,4013	10,4673
7	10,106	n.d
14	1,3665	n.d
21	Guarito	Guarito
28		
35		
42		

Tab. 15: calcolo dell'area iniziale nelle ferite

Le tabelle che seguono riportano i dati riguardanti la valutazione della popolazione microbica presente sulle ferite, e relativo antibiogramma, ricavati da tamponi eseguiti ogni sette giorni su tutte le lesioni.

Caso 3: UC3 Lesione 1: testa	S. aureus	S aureus.	S aureus.
	Giorno 0 27/09/2014	Giorno 7 04/10/2014	Giorno 14 11/10/2014
CEFADROXIL	-	S	S
AMOXICILLINA/AC.CLAV	-	S	S
AC. FUSIDICO	-	S	R
CEFOVECINA	-	S	R
MUPIROCINA	-	I	R
LINCOMICINA	-	I	R
GENTAMICINA	-	S	R
DOXICICLINA	-	S	R
CEFTAZIDIME	-	I	R
PRADOFLOXACIN	-	S	R
SPIRAMICINA	-	I	R
SULPHAMESSOZALO	-	S	R

Tab.16: risultati del tampone microbiologico e relativo antibiogramma, lesione 1 caso 3

Caso 3: UC3 Lesione 2: zampa post dx	S. aureus	S aureus.	S aureus.
	Giorno 0 27/09/2014	Giorno 7 04/10/2014	Giorno 14 11/10/2014
CEFADROXIL	S	-	S
AMOXICILLINA/AC.CLAV	S	-	S
AC. FUSIDICO	R	-	R
CEFOVECINA	S	-	R
MUPIROCINA	R	-	R
LINCOMICINA	R	-	R
GENTAMICINA	I	-	I
DOXICICLINA	I	-	R
CEFTAZIDIME	R	-	R
PRADOFLOXACIN	R	-	R
SPIRAMICINA	R	-	R
SULPHAMESSOZALO	R	-	R

Tab. 17: risultati del tampone microbiologico e relativo antibiogramma, lesione 2 caso 3.

CASO 4: UA8 PITBULL

FOTO	
RAZZA SESSO ETÀ	<p>PITBUL FEMMINA 3 ANNI C.A</p>
LOTTA VS PULCIE ZECCHE	<p>SI, FIPRONIL</p>
LESIONI	<p>1-COSCIA SX</p>
TEMPO DI INSORGENZA	<p></p>
RISOLUZIONE	<p>1-SI</p>
TERAPIA ANTIBIOTICA	<p>NO</p>
NOTE	<p>IL SOGGETTO MOSTRA IPERATTIVITÀ, LA LESIONE È DA GRATTAMENTO E MORDICCHIAMENTO PROBABILMETE LEGATA A FATTORI STRESSOGENI.</p>

DECORSO DELLE LESIONI:

LESIONE	Giorno 0 27-sett-14	Giorno 7 04-ott-14	Giorno 14 11-ott-14
1-COSCIA SX			

Sfruttando le foto raccolte ogni sette giorni per ogni lesione, è stato possibile effettuare la misurazione progressiva dell'Area della ferita, mediante Autocad. I dati ottenuti sono riportati nella tabella che segue

Lesione	Coscia sx
Giorni	Area cm2
0	1,0177
7	0,6546
14	0,3718
21	Guarito

Tab. 18: dati relativi al calcolo dell'area della lesione per ogni ferita e per tutta la durata del trattamento.

Le tabelle che seguono riportano i dati riguardanti la valutazione della popolazione microbica presente sulle ferite, e relativo antibiogramma, ricavati da tamponi eseguiti ogni sette giorni su tutte le lesioni.

Caso 4: UA8 Lesione 1: coscia sx	S. aureus	S aureus.	S aureus.
	Giorno 0 27/09/2014	Giorno 7 04/10/2014	Giorno 14 11/10/2014
CEFADROXIL	S	I	S
AMOXICILLINA/AC.CLAV	S	S	S
AC. FUSIDICO	R	S	R
CEFOVECINA	I	S	R
MUPIROCINA	I	I	I
LINCOMICINA	R	I	R
GENTAMICINA	I	R	I
DOXICICLINA	S	S	S
CEFTAZIDIME	R	R	R
PRADOFLOXACIN	R	R	R
SPIRAMICINA	R	S	R
SULPHAMESSOZALO	R	S	R

Tab. 19: risultati del tampone microbiologico e relativo antibiogramma, lesione 1 caso 4.

CASO 5: BINGO

FOTO



RAZZA METICCIO
SESSO MASCHIO INTERO
ETÀ 5 ANNI C.A

LOTTA VS PULCIE ZECCHIE IL TRATTAMENTO, EFFETTUATO UN MESE PRIMA DEL RECLUTAMENTO (FIPRONIL) HA PERSO D'EFFICACIA ED È PRESENTE UN'INFESTAZIONE DA PULCI

LESIONI 1-METATARSO DX
2-COSCIA DX

TEMPO DI INSORGENZA

RISOLUZIONE 1-SI, MA L'ANIMALE TENDE SEMPRE A MORDICCHIARSI LA PARTE
2-SI

TERAPIA ANTIBIOTICA

NO

NOTE NON È STATO POSSIBILE IMPORRE IL COLLARE ELISABETTIANO A CAUSA DEI POSSIBILI PROBLEMI CHE SI SAREBBERO CREATI CON GLI ALTRI CANI DEL RECINTO.

DECORSO DELLE LESIONI:

LESIONE	Giorno 0 04-ott-14	Giorno 7 11-ott-14	Giorno 14 18-ott-14
1- METATAR SO DX			
	Giorno 21 25-ott-14	Giorno 28 01-nov-14	Giorno 35 08-nov-14
			
2-COSCIA DX	Giorno 0 18-ott-14	Giorno 7 25-ott-14	Giorno 14 01-nov-14
			
	Giorno 21 08-nov-14 		

Sfruttando le foto raccolte ogni sette giorni per ogni lesione, è stato possibile effettuare la misurazione progressiva dell'Area della ferita, mediante Autocad. I dati ottenuti sono riportati nella tabella che segue.

Caso 5: Bingo		
Lesione	Metatarso dx	Coscia dx
Giorni	Area cm2	Area cm2
0	2,8989	3,7186
7	n.d.	2,531
14	n.d.	1,617
21	n.d.	Guarito
28	n.d.	
35	n.d.	
42	Guarito	

Tab. 20: dati relativi al calcolo dell'area della lesione per ogni ferita e per tutta la durata del trattamento.

Le tabelle che seguono riportano i dati riguardanti la valutazione della popolazione microbica presente sulle ferite, e relativo antibiogramma, ricavati da tamponi eseguiti ogni sette giorni su tutte le lesioni.

Caso 5: BINGO Lesione 1: metatarso dx	S. pseudint.	S aureus.	Negativo	S. pseudint.	S. pseudint.
	Giorno 0 04/10/2014	Giorno 7 11/10/2014	Giorno 14 18/10/2014	Giorno 21 25/10/2014	Giorno 28 01/11/2014
CEFADROXIL	S	S	-	S	S
AMOXICILLINA/ AC.CLAV	S	S	-	S	S
AC. FUSIDICO	S	R	-	R	R
CEFOVECINA	S	R	-	ND	ND
MUPIROCINA	R	I	-	R	R
LINCOMICINA	R	R	-	R	R
GENTAMICINA	S	I	-	R	R
DOXICICLINA	S	S	-	R	R
CEFTAZIDIME	R	R	-	R	R
PRADOFLOXACIN	S	R	-	R	R
SPIRAMICINA	I	R	-	ND	ND
SULPHAMESSOZAL O	I	R	-	R	R

Tab. 21: risultati del tampone microbiologico e relativo antibiogramma, lesione 1 caso 5.

Caso 5: BINGO Lesione 2: coscia dx	S. pseudint.	S. pseudint.	S. pseudint.
	Giorno 0 18/10/2014	Giorno 7 25/10/2014	Giorno 14 01/11/2014
CEFADROXIL	S	S	S
AMOXICILLINA/AC.CLAV	S	S	S
AC. FUSIDICO	R	R	R
CEFOVECINA	R	ND	ND
MUPIROCINA	R	R	R
LINCOMICINA	R	R	R
GENTAMICINA	S	I	R
DOXICICLINA	S	I	I
CEFTAZIDIME	R	R	R
PRADOFLOXACIN	R	R	R
SPIRAMICINA	R	ND	ND
SULPHAMESSOZALO	I	R	R

Tab. 22: risultati del tampone microbiologico e relativo antibiogramma, lesione 2 caso 5.

CASO 6: M6

FOTO



RAZZA

METICCIO

SESSO

FEMMINA

ETÀ

7 ANNI C.A

LOTTA VS PULCI E ZECHE

SI, FIPRONIL

LESIONI

1-COSCIA ZAMPA POST SX

2-COSCIA ZAMPA POST DX

3-METATARSO DX

TEMPO INSORGENZA

DI

RISOLUZIONE

1-LENTA GUARIGIONE NON COMPLETAMENTE AVVENUTA

2-LENTA GUARIGIONE NON COMPLETAMENTE AVVENUTA

3-PERSISTENZA DELLE CAUSE DEL TRAUMA

TERAPIA ANTIBIOTICA

NO

NOTE

1-LEISHMANIA NON TRATTATO

2-NON È STATO POSSIBILE IMPORRE IL COLLARE ELISABETTIANO A CAUSA DEI POSSIBILI PROBLEMI CHE SI SAREBBERO CREATI CON GLI ALTRI CANI DEL RECINTO.

DECORSO DELLE LESIONI:

LESIONE	Giorno 0 27-sett-14	Giorno 7 04-ott-14	Giorno 14 11-ott-14
1- COSCIA POST SX			
	Giorno 21 18-ott-14	Giorno 28 25-ott-14	Giorno 35 01-nov-14
			
	Giorno 42 08-nov-14 		
2-COSCIA ZAMPA DX	Giorno 0 27-sett-14	Giorno 7 04-ott-14	Giorno 14 11-ott-14
			
	Giorno 21 18-ott-14	Giorno 28 25-ott-14	Giorno 35 01-nov-14
			



Sfruttando le foto raccolte ogni sette giorni per ogni lesione, è stato possibile effettuare la misurazione progressiva dell'Area della ferita, mediante Autocad. I dati ottenuti sono riportati nella tabella che segue.

Caso 6: M6			
Lesione	Coscia sx	Coscia dx	Metatarso dx
Giorni	Area cm2	Area cm2	Area cm2
0	6,9767	5,6063	10,1472
7	1,2134	5,0243	n.d
14	6,5302	7,1692	n.d
21	3,3028	7,1465	n.d
28	2,171	5,7078	n.d
35	0,7187	5,5601	n.d
42	5,8747	n.d	n.d
49	Non Guarito	Non Guarito	Non Guarito

Tab. 23: dati relativi al calcolo dell'area della lesione per ogni ferita e per tutta la durata del trattamento.

Le tabelle che seguono riportano i dati riguardanti la valutazione della popolazione microbica presente sulle ferite, e relativo antibiogramma, ricavati da tamponi eseguiti ogni sette giorni su tutte le lesioni.

Caso 6: M6 Lesione 1: zampa post sx	S. pseudint.	S. pseudint.	S. aureus.	S. pseudint.	S. pseudint.	S. aureus.
	Giorno 0 27/09/2014	Giorno 7 04/10/2014	Giorno 14 11/10/2014	Giorno 21 18/10/2014	Giorno 28 25/10/2014	Giorno 35 01/11/14
CEFADROX IL	-	S	S	S	R	S
AMOXICIL LINA/AC.CL AV	-	S	S	R	R	S
AC. FUSIDICO	-	R	R	S	R	R
CEFOVECI NA	-	S	R	R	ND	ND
MUPIROCI NA	-	R	R	R	R	R
LINCOMICI NA	-	S	R	I	R	R
GENTAMIC INA	-	R	I	I	R	R
DOXICICLI NA	-	I	R	S	R	R
CEFTAZIDI ME	-	R	R	I	R	R
PRADOFLO XACIN	-	S	R	R	R	R
SPIRAMICI NA	-	I	R	R	ND	ND
SULPHAME SSOZALO	-	I	R	S	R	R

Tab. 24: risultati del tampone microbiologico e relativo antibiogramma, lesione 1 caso 6.

Caso 6: M6 Lesione 2: zampa post dx	S. pseudoint	S aureus.	S pseudoint.	S pseudoint	S pseudoint
	Giorno 0 27/09/2014	Giorno 7 04/10/2014	Giorno 14 11/10/2014	Giorno 21 18/10/2014	Giorno 28 25/10/2014
CEFADROXIL	S	S	S	S	R
AMOXICILLINA/AC.CLAV	S	R	S	S	R
AC. FUSIDICO	R	R	R	S	R
CEFOVECINA	I	R	R	I	ND
MUPIROCINA	I	R	I	R	R
LINCOMICINA	I	R	R	I	R
GENTAMICINA	I	S	S	I	R
DOXICICLINA	S	S	R	S	R
CEFTAZIDIME	R	I	R	I	R
PRADOFLOXACIN	R	S	R	R	R
SPIRAMICINA	R	I	I	R	ND
SULPHAMESOZALO	R	I	R	I	R

Tab. 25: risultati del tampone microbiologico e relativo antibiogramma, lesione 2 caso 6.

Caso 6: M6 Lesione 3: metatarso dx	S. aureus	S. pseudint.	S. pseudint.	S. pseudint.
	Giorno 0 04/10/2014	Giorno 7 11/10/2014	Giorno 14 18/10/2014	Giorno 21 25/10/2014
CEFADROXIL	S	S	S	I
AMOXICILLINA/AC.CLAV	R	S	S	R
AC. FUSIDICO	R	R	S	R
CEFOVECINA	R	I	I	ND
MUPIROCINA	R	I	R	R
LINCOMICINA	R	R	I	R
GENTAMICINA	S	I	S	R
DOXICICLINA	S	R	S	R
CEFTAZIDIME	I	R	I	R
PRADOFLOXACIN	S	R	R	R
SPIRAMICINA	I	R	R	ND
SULPHAMESOZALO	I	R	I	R

Tab. 26: risultati del tampone microbiologico e relativo antibiogramma, lesione 3 caso 6.

6.3 Discussione e Conclusioni

Dai dati ottenuti e riportati nelle tabelle emerge che, a seguito di trattamento giornaliero con one VET, tredici delle diciassette lesioni reclutate, pari al 76,47%, sono giunte a guarigione completa, mentre quattro lesioni (23,52%) non sono guarite.

In particolare, la lesione 3 (articolazione tarso-metatarsica arto sx) del caso 2-Nico, non è guarita per persistenza dell'agente causale (cinghia del carrellino) e le tre lesioni del caso sei, per positività del soggetto alla Leishmania, peraltro non trattata, che notoriamente ostacola la progressione del processo cicatriziale (Mc-Mahon-Pratt & Alexander, 2004). Infatti, nel caso 6 di questo studio abbiamo osservato che dopo una iniziale diminuzione dell'area per epitelizzazione dai margini, le lesioni tornavano alle dimensioni iniziali a causa della erosione dell'epitelio neoformato (vedi tabella 23). Questo effetto è legato non solo all'attività patogena del protozoo, ma anche alla ridotta capacità di risposta immunitaria dell'ospite a seguito del progredire della malattia, che pertanto, non consente la cicatrizzazione delle lesioni cutanee (Mc-Mahon-Pratt & Alexander, 2004). A testimonianza della gravità della patologia in atto, riferiamo che il soggetto N. 6 è deceduto a distanza di due mesi dalla fine della sperimentazione.

Nelle 13 lesioni venute a guarigione a seguito del trattamento con one Vet, è stato possibile evidenziare una rapida ed efficace riduzione delle dimensioni iniziali, come dimostrato dal **tempo di guarigione (TTH) pari a 27,18 ± 10,47** giorni (vedi Tabella 3) e dal calcolo della velocità di cicatrizzazione che risulta essere pari a **0,05±0,04 cm/day** (vedi Tabella 3).

Quest'ultimo dato non può essere confrontato con altri dati simili, non essendoci in letteratura studi riguardo la velocità di cicatrizzazione nel cane. Questa, tuttavia, è stata valutata nel cavallo (Stashak 1991), per le ferite del tronco non complicate da infezioni o dallo sviluppo di cheloidi, e risulta essere di 0,02 cm/day; la velocità da noi riscontrata nel cane, utilizzando la stessa formula

indicata dall'autore (**Stashak Epitelialization Rate (SER)**)= $(\sqrt{\text{Area Iniziale}/\pi})/\text{TTH}$), è risultata di poco più alta, portandoci ad ipotizzare una intrinseca velocità di guarigione tipica di specie (cane vs cavallo). Nello studio condotto nella specie ovina (Fiore, 2010; Franchini et al., 2010), la velocità di cicatrizzazione delle exeresi cutanee di 6 cm di diametro, calcolate con la formula di Stashak (1991) e trattate con lo stesso medicamento utilizzato nel nostro studio, è risultata essere di 0.06 cm/day nelle lesioni guarite in 4 settimane e 0.04 cm/day in quelle guarite in 6 settimane. Questo range di valori è simile a quello da noi ottenuto, dimostrando una maggiore similitudine nella velocità di cicatrizzazione tra specie (cane vs ovino) a parità di trattamento.

Le 13 lesioni sono guarite in un tempo medio (**TTH**) di **27,18 ± 10,47** giorni (Tabella 3) che risulta essere tre volte inferiore al loro tempo di persistenza (4 mesi circa).

Possiamo attribuire il lungo tempo di persistenza a diversi fattori:

- ~ persistenza dell'agente causale (cinghie del carrellino, sfregamento degli arti a terra, compulsione al grattamento);
- ~ presenza di una carica microbica superficiale non contrastata da alcun trattamento locale o sistemico (le lesioni venivano saltuariamente trattate con acqua di fonte e clorexidina) e continuamente rinnovata e mantenuta a causa delle precarie condizioni igienico sanitarie in cui versavano gli animali. In particolare, uno dei due soggetti con paresi del treno posteriore (caso 2- Nico) trascinava spesso gli arti su superfici imbrattate dalle sue stesse deiezioni (per mancato controllo del riflesso della defecazione/minzione e per continui problemi gastrointestinali);

Gli esami microbiologici, effettuati sui tamponi delle ferite, hanno messo in evidenza una contaminazione da parte dei germi più comunemente presenti sulla cute del cane (*Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus aureus*) o da germi di origine fecale come *Escherichia coli*, *Klebsiella*, o ambientali come *Pseudomonas aeruginosa*. Questi dati, in associazione al tempo di persistenza

delle lesioni (quattro mesi), almeno per quanto riguarda le ferite traumatiche (vedi Tabella 2), depongono a favore del concetto di “colonizzazione critica” (notevole sviluppo di flora batterica con adesione ai tessuti e lieve reazione tissutale infiammatoria superficiale senza segni clinici di infezione) che non consente il normale svolgimento e completamento del processo cicatriziale (Dow et al., 1999; Drosou et al., 2003; Atiyeh et al., 2009).

Il trattamento con one VET ha determinato, sin dai primi giorni, la riduzione continua della superficie iniziale della lesione, accompagnata dal riempimento delle cavità dovute a perdita di sostanza, con formazione di tessuto di granulazione sano e ben vascolarizzato che ha poi consentito l’epitelizzazione dai margini della ferita stessa. Tutto ciò, nonostante i tamponi microbiologici, effettuati ogni sette giorni a partire dal giorno 0, abbiano continuato a mostrare la presenza di batteri problematici, in quanto a patogenicità ed antibiotico resistenza (vedi risultati tabelle tamponi microbiologici e antibiogramma). La maggior parte delle popolazioni batteriche riscontrate era costituita da germi multiresistenti, portandoci a presupporre che gli animali avessero subito nella loro vita diversi cicli di trattamenti antibiotici, responsabili di questa selezione verso la multiresistenza, come è ben noto in letteratura, specialmente nei cani che hanno subito trattamenti antibiotici per patologie cutanee (piodermi) o per altre malattie infettive (Werckenthin et al., 2001; Ihrke et al., 2005; Scott et al., 2006; Pop-Vicas et al., 2008). Inoltre gli esami colturali hanno messo in evidenza popolazioni batteriche spesso diverse, che si susseguivano in un continuo turnover (vedi le tabelle specifiche di ogni caso).

In base alla letteratura riportata sul medicamento (vedi capitolo 5) e ai risultati ottenuti in questo studio, si ipotizza che one VET, applicato quotidianamente sul letto della ferita, riesca ad ostacolare l’azione anti-cicatrizzante delle colonie batteriche contaminanti, riuscendo contemporaneamente a limitarne l’attecchimento, nonostante altre popolazioni di batteri possano continuamente approdare sulle lesioni a causa del forte inquinamento ambientale. Il continuo turnover delle diverse popolazioni batteriche, depone a favore dell’effetto barriera meccanica esercitata dagli acidi grassi (FFAs) (Drake et al., 2008; Desbois, 2010) presenti nel medicamento, che formano un film oleoso sulla superficie delle

lesioni consentendo il progredire del processo cicatriziale (Lauchli et al., 2012). Ricordiamo che la presenza dei FFAs permette anche il sequestro dei radicali liberi (lipoperossidazione) che continuamente si formano durante il processo cicatriziale, consentendo il regolare svolgimento dei fenomeni metabolici e salvaguardando le cellule vive ed attive, responsabili della risposta immunitaria e riparativa (Desbois, 2010). L'effetto antimicrobico meccanico su lesioni traumatiche con tempi di persistenza superiori al tempo di guarigione era già stato dimostrato in altri studi (Mainetti e Carnevali, 2012; Di Venanzio, 2014) dove le ferite valutate, precedentemente trattate con disinfettanti istolesivi, sono giunte a guarigione in tempi fisiologici senza nessun altro ausilio terapeutico se non il dressing secondario (bendaggio) per la gestione dell'essudato (garze, idrofibre, ecc.).

Nel caso specifico delle dermatiti piotraumatiche, la persistenza delle lesioni è generalmente attribuita alla colonizzazione critica/infezione da parte di Staphylococchi specie specifici (come lo *S. pseudintermedius*), che vivono da saprofiti sulla cute del cane diventando patogeni in condizioni di infiammazione cutanea indotta da diverse cause (es. allergiche) e complicata dall'azione traumatizzante del grattamento compulsivo. Nei casi da noi trattati, one VET si è dimostrato risolutivo, come già dimostrato nella citata tesi sulle piodermi del cane (Salvatori, 2014).

L'avvenuta guarigione della maggior parte delle lesioni trattate in questo studio dimostra chiaramente come il medicamento sia un dispositivo con caratteristiche di ALL-IN-ONE in grado di sostituire i presidi disinfettanti/antimicrobici comunemente, e spesso erroneamente, utilizzati nella fase di *wound cleansing* (Sibbald et al., 2000; Atiyeh et al., 2009), anche in condizioni igienico sanitarie scadenti o in presenza di forti contaminazioni ambientali, come quelle di questo studio. I disinfettanti/antimicrobici, infatti, se applicati non adeguatamente diluiti sui tessuti vivi, o applicati durante la fase di granulazione, indipendentemente dalla diluizione, inducono effetti citotossici soprattutto verso fibroblasti, cheratinociti, macrofagi e leucociti, ritardando la cicatrizzazione (Lineaweaver et al., 1985; Cooper et al., 1991; Sibbald et al., 2000; Atiyeh et al., 2009; Cardile et al., 2014).

Il vantaggio del protocollo one Vet, è dunque quello di evitare effetti istolesivi, legati all'uso di altre molecole, limitando al contempo l'attecchimento dei batteri contaminanti. Questo era già stato evidenziato in alcuni studi rispetto alla capacità del medicamento (già MIX 557) di ridurre la contaminazione/colonizzazione critica del letto della ferita, riducendo il dolore nelle ulcere croniche e consentendo l'attecchimento di trapianti autologhi (Mosti et al., 2007; Carnevali et al., 2011).

In conclusione, come per la medicina umana, il protocollo ALL-IN-ONE di one VET si conferma capace di risolvere, senza uso di disinfettanti antimicrobici o antibiotici sistemici, le lesioni cronicizzate e trattate inadeguatamente, in cui la colonizzazione critica rappresenta un impedimento alla guarigione.

Questo approccio ribalta completamente le certezze granitiche che vedevano obbligatorio l'uso di antibiotici e disinfettanti per ottenere la completa sterilizzazione e quindi la guarigione della lesione. Il protocollo ALL-IN-ONE di one VET sta portando ad un cambio di paradigma rispetto al trattamento locale delle ferite, con il vantaggio di diminuire la selezione di ceppi multiresistenti, non richiedendo l'uso di antibiotici, in un'epoca in cui il problema dell'antibioticoresistenza sta assumendo proporzioni non trascurabili tanto che non si fa ricerca per nuove molecole, perché lo sviluppo della resistenza in tempi rapidi non consente alle aziende di rientrare nei costi di investimento e gli antibiotici veramente efficaci sono ridotti a pochissime unità che si contano sulle dita di una mano.

BIBLIOGRAFIA

Abraham Z., Bhakuni D.S., Garg H.S., Goel A.K., Mehrotra B.N., Patnaik G.K. 1986. Screening of Indian plants for biological activity: Part XII. *Indian J Exp Biol.* Jan;24(1):48-68;

Akers M., Denbow M. 2013. Anatomy and physiology of domestic animals, second edition, Wiley Blackwell; p: 123;

Aladakatti R.H., Ahmed R.N., Ahmed M., Ghosesawar M.G. 2001. Sperm parameters changes induced by *Azadirachta indica* in albino rats. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*, 12(1): 69-76;

Albert D., Zundorf I., Dingermann T., Muller E.W., Steinhilber D., Werz O. 2002. Hyperforin is a dual inhibitor of cyclooxygenase-1 and 5-lipoxygenase. *Biochemical Pharmacology*, 64: 1767-1775;

Alvarez O.M., Mertz, P.M., Eaglstein W.H. 1983. The effect of occlusive dressings on collagen synthesis and re-epithelialization in superficial wounds. *J Surg Res.* 35: 142–148;

Ankrom M., Bennett R., Springle S. 2005. Pressure-related deep tissue injury under intact skin and the current pressure ulcer staging system. *Adv. Skin Wound Care*; 18 (1): 35-42;

Arumugam A., Agullo P., Boopalan.T., Nandy S., Lopez R., Gutierrez C., Narayan M., Rajkumar L. 2014. Neem leaf extract inhibits mammary carcinogenesis by altering cell proliferation, apoptosis, and angiogenesis, *Free Radic. Res.* 15 26–34;

Atiyeh B.S., Dibo S.A. Hayek S.N. 2009. Wound cleansing, topical antiseptics and wound healing. *I. Wound J:* 6, 420-430;

Azari O., Mahdi Molaei M. Hojabri R. 2010. Differences in second-intention wound healing of distal aspect of the limb between Caspian miniature horses and donkeys: macroscopical aspects. *Comp Clin Pathol* on line publications ©Springer-Verlag London Limited-2010 DOI 10.1007/s00580-010-1166-3;

Badani L., Deolankar R.P., Kulkarni M.M., Nagsampgi B.A. and Wagh U.V. 1987. Biological activities and Medicinal Properties of Neem (*Azadiracta indica*). Indian, *J Malariol*; 24 :111–7;

Bandyopadhyay U., Biswas K., Chatterjee R., Bandyopadhyay D., Chattopadhyay I., Ganguly C. K., and Banerjee R. K. 2002. Gastroprotective effect of Neem (*Azadirachta indica*) bark extract: Possible involvement of H⁺-K⁺-ATPase inhibition and scavenging of hydroxyl radical. *Life sciences*, 71(24), 2845-2865;

Bansal C., Scott R., Stewart D., Cockerell C.J. 2005. Decubitus ulcers: a review of the literature. *Int J Dermatol*;44:805-10;

Barnes J., Linda A. Anderson L.A, Phillipson J.D. 2001. St John's wort (*Hypericum perforatum* L.) : a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *Pharmacy and Pharmacology*, 53: 583-600;

Baxter C.B., Vogelnest L.J. 2008. Multifocal popular deep bacterial pyoderma in a Boxer dog caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Australian veterinary journal* 86 (11): 435-39;

Beerhues L. 2006. Hyperforin. *Phytochemistry* 67: 2201-2207;

Beghelli V., Bortolami R., Callegari E. Anatomia e fisiologia degli animali domestici, II Edizione 2006, Edagricole; p: 615-623;

Ben-Ami R., Schwaber M.J., Navon-Venezia S., Schwartz D., Giladi M., Chimelnistky I., Leavit A., Carmeli Y. 2006. Influx of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae into the hospital. *Clin Infect Dis* 42: 925–934;

Bergan T. 1981. Pharmacokinetics of tissue penetration of antibiotics. *Rev Infect Dis* 3:45-66;

Bhanwara S., Khosala P., Seth S., Srivastava R.K.A. 2000. Study of hypoglycaemic effects of *Azadirachta indica* (Neem) in normal and alloxan diabetic rabbits. *Ind. J. Physiol. Pharmacol.* 44: 69-74;

Birgit R.H., Rest J., Seewald W. 2004. A prospective study of the clinical findings, treatment and histopathology of 44 cases of pyotraumatic dermatitis. *Veterinary Dermatology* 15: 369-376;

Biswas K., Chattopadhyay I., Banerjee R.K. and Bandyopadhyay U. 2002. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). *current science*, Vol. 82, N.11, 10:1336-1345;

Black J., Baharestani M., Cuddigan J. 2007. National pressure Ulcer Advisory Panel's updated pressure ulcer staging system. *Dermatol Nurs*; 19: 343-349;

Blackwell A., Evans K.A., Strang R.H.C. 2004. Toward development of neem-based repellents against the Scottish Highland biting midge *Culicoides impunctatus*, *Medicine And Veterinary Entomology* 18: 449-452;

Bodeker G., Burford G. 2002. Neem in health care: an overview. World Neem Conference;

Brahmachari G. 2004. Neem-An Omnipotent Plant: A Retrospection. *ChemBioChem* 5: 408-421;

Brambilla R. Definizione di ferite infette e di infezione dei tessuti molli complicate (SSTI- SSTIc). 2010 II° Convegno Interregionale AIUC Sez. Lombardia Triveneto. Padova 15-17 aprile;

Bratka-Robia C.B., Egerbacher M., Helmriech M., Mitteregger G., Benesch M., Bamberg E. 2002. Immunohistochemical localization of androgen and oestrogen receptors in canine hair follicles. *Veterinary Dermatology* 13:113-18;

Breckenridge A. 2000. Important interactions between St John's wort (*Hypericum perforatum*) preparations and prescribed medicines. <http://www.open.gov.uk> (accessed 29 February 2000);

Butler P.D, Longaker M.T and Yang G.P. 2008. Current progress in keloid research and treatment. *J. Am. Coll. Surg* 206: 731-741;

Cardile A.P., Sanchez C.J., Hardy S.K., Romano D.R., Hurtgen B.J., Wenke J.C., and Akers K.S. 2014. Dakin solution alters macrophage viability and function. *Journal of Surgical Research*, 192(2), 692-699;

Carnevali F., 2007. Healing remedy based on both Neem (*Azadirachta indica*, (A. Juss) and St. John's Wort *Hypericum perforatum*, L.) for treating infected and/or complicated wounds. *Proceedings World Neem Conference*, Coimbatore (India);

Carnevali F., Capizzi R., Sturla M. and van der Esch S.A. 2011. Case report: Wound Bed Preparation Prior to Skin Grafting, On a Multi-Resistant Bacterial Contaminated, 17 Years Old Leg Ulcer, Using a Patented Topical Remedy Mix Oil. Ewma Congress, Bruxelles;

Carnevali F., Argentieri M., Ippedico G., Minniti C.A., Amodio L., Mellano L., van der Esch S.A. 2014. Managing Horse Wounds Either Presenting or not

with Exuberant Granulation Tissue Using an Innovative Wound Dressing: a Retrospective Non-Controlled Study. *Journal of Animal and Veterinary Sciences* 1(2): 6-16;

Charles V. and Charles S.X. 1992. The use and efficacy of *Azadirachta indica* ADR ('Neem') and *Curcuma longa* ('Turmeric') in scabies. A pilot study. *Tropical and geographical medicine*, 44(1-2), 178-181;

Chattopadhyay R.R. 1996. Possible mechanism of antihyperglycemic effect of *Azadirachta indica* leaf extract. Part IV. *General Pharmacology: The Vascular System*, 27(3), 431-434;

Chattopadhyay R.R. 1998. Possible biochemical mode of anti-inflammatory action of *Azadirachta indica* A. Juss. in rats. *Indian journal of experimental biology*, 36(4), 418-420;

Chattopadhyay R.R. 1999. A comparative evaluation of some blood sugar lowering agents of plant origin. *Journal of ethnopharmacology*, 67(3), 367-372;

Cochrane C.A., Pain R. and Knottenbelt D.C. 2003. In-vitro wound contraction in the horse: differences between body and limb wounds. *Wounds*, 15(6): 175-181;

Collier M. and Moore Z. 2006. "Etiology and risk factors" In: Romanelli M (ed) *Science and Practice of Pressure Ulcer Management* Springer Verlag (ISBN 10:1-85233-839-3):27–36;

Cooper M.L, Laxer J.A, Hansbrough J.F. 1991. The cytotoxic effects of commonly used topical antimicrobial agents on human fibroblasts and keratinocytes. *J Trauma* 31(6):775-84;

Cox D.A., Kunz S., Cerletti N., McMaster G.K., Burk R.R. 1992. Wound healing in aged animals--effects of locally applied transforming growth factor beta 2 in different model systems. *EXS* ;61:287-95;

Dall'Agnol R., Ferraz A., Bernardi A. P, Albring D., Nör C., Sarmiento L., Lamb L., Hass M., Von Poser G., Schapoval E.E.S. 2003. Antimicrobial activity of some Hypericum species. *Phytomedicine* 10: 511–516;

David S.N. 1969. *Anti- pyretic of neem oil and its constituent. Mediscope* 12: 25-27;

De Cristofaro A., Rotundo G., Germinara G.S., Tenaglia F. 2001. Controllo della mosca delle olive con prodotti di origine vegetale. *Quaderni E.R.S.A. MOLISE*, 5: 15-55;

Dealey C. The care of wounds. A guide for nurses, 3rd Ed 2005, Oxford: Blackwell Publishing;

Desbois A.P., Smith V.J. 2010. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied microbiology and biotechnology* 85(6): 1629-1642;

Dhar R., Zhang K., Talwar G. P., Garg S., and Kumar N. 1998. Inhibition of the growth and development of asexual and sexual stages of drug-sensitive and resistant strains of the human malaria parasite Plasmodium falciparum by Neem (Azadirachta indica) fractions. *Journal of ethnopharmacology*, 61(1), 31-39;

Di Carlo G., Borelli F., Izzo A.A. 2001. St'john's wort: prozac from the plant kindom. *TIPS* 22: 292-7;

Dikmen M., Öztürk Y., Sagratini G., Ricciutelli M., Vittori S., Maggi F. 2011. Evaluation of the wound healing potentials of two subspecies of Hypericum

perforatum on cultured NIH3T3 fibroblasts. *Phytotherapy Research* 25(2): 208-214;

Divakar M.C., Rao S.B., Nair G.R.N., Hisham A.J. 2001. The role of fatty acid on the ulcer healing property of the nimbidine fraction of the neem oil. *J. med aromatic plant sci* 23: 404-8;

Di Venanzio M. Tesi Master in “Gestione delle lesioni cutanee Wound Care” anno accademico **2013/2014** Facoltà di Medicina e Psicologia Dipartimento di Scienze Medico-Chirurgiche e di Medicina Traslazionale; “1 PRIMARY WOUND DRESSING® PER IL TRATTAMENTO DELLE LESIONI ACUTE”. Relatore: Dott. M.Palombi, correlatore: Dott.ssa F.Carnevali;

Donskey C.J. 2004. The role of the intestinal tract as a reservoir and source for transmission of nosocomial pathogens. *Clin Infect Dis*, 39: 219–226;

Dow G., Browne A., Sibbald R.G. 1999. Infection in chronic wounds: Controversies in diagnosis and treatment. *Ost/Wound Manag* 45(8):23-40;

Drake D.R., Brogden K.A., Dawson D.V. and Wertz P.W. 2008. Thematic review series: skin lipids. Antimicrobial lipids at the skin surface. *Journal of lipid research* 49(1): 4-11;

Drosou A., Falabella A., Kirsner R.S. 2003. Antiseptic on Wounds: an area of Controversy. *Wounds*, 15, 149-166;

Ducharme-Desjarlais M., Cèleste C.J., Lapault E. and Theoret C.L. 2005. Effect of silicone-containing dressing on exuberant granulation tissue formation and wound repair in horses. *Am J Vet Res* 66: 1133-1139;

Duran N., Song P.S. 1986. Hypericin and its photodynamic action. *Photochem. Photobiol.* 43: 677±680;

EWMA Document. 2010. Outcomes in controlled and comparative studies on non-healing wounds: recommendations to improve the quality of evidence in wound management. *Journal of Wound Care*, 19, 6, 239-268);

Falanga V., Saap L.J. and Ozonoff A. 2006. Wound bed score and its correlation with healing of chronic wounds. *Dermatologic Therapy*, 19, 383-390;

Fiore S. Tesi di laurea anno accademico 2009/2010, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli studi di Bari; “EFFICACIA DEL COMPOSTO BREVETTATO “MIX 557” NELLA RIPARAZIONE DELLE FERITE CUTANEE: STUDIO SPERIMENTALE SU OVINO”. Relatore Dott.ssa D.Franchini, correlatore Dott.ssa F.Carnevali;

Flanagan M. 2003. Improving accuracy of wound measurement in clinical practice. *Ostomy Wound Managemet*, 49,10,28-40;

Fleischer W., Reimer K. 1997. Povidone-iodine in antisepsis: State of the art. *Dermatology* 195(Suppl 2):3-9;

Fossum T. Chirurgia dei piccoli animali, 4° ed. italiana a cura di Aldo Vezzoni, Edra, Ottobre 2013;

Foster A., Foil C. Manual of Small Animal Dermatology. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association; 2003, pp:159-60;

Fourrier P., Carlotti D.N., Magnol J.P. 1988. Les pyodermites superficielles. *Pratique medicale et chirurgi cale de l’Animal de Compagnie*, 23: 473-84;

Fowler D., Williams J.M. Manual of Canine and Feline Wound Management and Reconstruction. BSAVA Editore;1999, pp:6-12;

Franchini D., Rossi G., Fiore S., van der Esch S.A., Carnevali F. 2010. Efficacia del composto brevettato "ene 48211be/2008" nella riparazione delle ferite cutanee: studio sperimentale su ovino. 17° Congresso Nazionale Società Italiana di Chirurgia Veterinaria, Olbia 22-24 giugno;

Gallo R.L., Murakami M., Ohtake T., Zaiou M. 2002. Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. *J. Allergy Clin. Immunol.* 110: 823–831;

Gary R., Chapman P. and Contreras-Ruiz. J. 2006. The Role of Bacteria in Pressure Ulcers In: Romanelli M (ed) *Science and Practice of Pressure Ulcer Management Springer Verlag* (ISBN 10:1-85233-839-3): 139-162);

Gaster B. and Holroyd J. 2000. St'john's wort for depression. *Arch intern medicine* 160: 152-6;

Ghamsari S.M., Azari O., Dehghan M.M. 2007. Similarities of second intention wound healing between TB and Caspian miniature horses: macroscopical aspects. *10th Annual Scientific Meeting*, November 15, Berlin, Germany, pp 31;

Griffeth G. C., Morris D. O., Abraham J. L., Shofer F. S. and Rankin S. C. 2008. Screening for skin carriage of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* in dogs with healthy and inflamed skin. *Veterinary Dermatology*, 19: 142–149;

Guardabassi L., Schwarz S., & Lloyd D. H. 2004. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria Review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(2), 321-332;

Gupta S.C., Prasad S., Reuter S., Kannappan R., Yadav V.R., Ravindran J., Hema P.S., Chaturvedi M.M, Nair M., Aggarwal B.B. 2010. Modification of cysteine 179 of IkappaBalpha kinase by nimbolide leads to down-regulation of

NF-kappaB-regulated cell survival and proliferative proteins and sensitization of tumor cells to chemotherapeutic agents, *J. Biol. Chem.* 285 35406–35417;

Hanahan D., Weinberg R.A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell* 144 646–674;

Hao F., Kumar S., Yadav N., Chandra D. 2014. Neem components as potential agents for cancer prevention and treatment. *Biochimica et Biophysica Acta* 1846(1): 247–257;

Harvey R.G. 1996. Tylosin in the treatment of canine superficial pyoderma. *Vet Rec*, 139,185-187;

Holm B.R., Petersson U., Morner A., Bergstrom K., Franklin A., Greko C. 2002. Antimicrobial resistance in staphylococci from canine pyoderma: a prospective study of first-time and recurrent cases in Sweden. *Vet. Rec.*, 151, 600-605;

Howard R.D., Stashak T.S., Baxer G.M. 1993. Evaluation of occlusive dressing for management of full-thickness excisional wounds on distal portion of the limbs of horses. *Am J Vet Res* 54, 2150-2154;

Hubner A.T. 2003. Treatment with *Hypericum perforatum* L. does not trigger decreased resistance in *Staphylococcus aureus* against antibiotics and Hyperforin. *Phytomedicine* 10: 206–208;

Hunt E.J., Lester C.E., Lester E.A., and Tackett R L. 2001. Effect of St. John's wort on free radical production. *Life sciences*, 69(2), 181-190;

Ihrke P.J. 1986. Antibacterial therapy in dermatology. Kirk RW, ed. *Current Veterinary Therapy Lx*. Philadelphia: Saunders, 18, 35-39;

Ihrke J.P. 2005. Management challenges in canine pyoderma. *The North America Veterinary Conference*;

Hirsh D.C., Ling G.V., Ruby A.L. 1980. Incidence of R-plasmids in fecal flora of healthy household dogs. *Antimicrob. Agents Chemother*, 17, 313-315;

Isacchi B., Bergonzi M.C, Carnevali F., Van Der Esch S.A., Vincieri F.F, Bilia A.R. 2007. Analysis and stability of the constituent of St. John's wort oils prepared with different methods. *Journal of Pharmaceutica and Biomedical Analysis* 45: 756-761;

Istikoglou C.I, Mavreas V., Geroulanos G. 2010. History and therapeutic properties of *Hypericum Perforatum*, from antiquity until today. *Psychiatriki* 21: 332–338;

Jackson M.M., Mahon C. 2009. Topical Antiseptics in Healthcare. Posted on: Saturday 30 July 2005. http://www.redorbit.com/news/science/191895/topical_antiseptics_in_healthcare/ (accessed 1 April 2009);

Joza N., Susin S.A., Daugas E., Stanford W.L., Cho S.K., Li C.Y., Sasaki T., Elia A.J., Cheng H.Y.M. 2001. Ravagnan, Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death, *Nature* 410 549–554;

Khosla P., Bhanwra S., Singh J., Seth S., Srivastava R.K., 2000. A study of hypoglycaemic effects of *Azadirachta indica* (Neem) in normal and alloxan diabetic rabbits. *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, 44 (1): 69-74;

Kim T.J., Na Y.R., Lee J.I. 2005. Investigation into Basis of Chloramphenicol and Tetracycline Resistance in *Staphylococcus intermedius* Isolates from Cases of Pyoderma in Dogs. *J. Vet. Med. B* 52, 119-124;

Knighton D.R., Silver I.A. and Hunt T.K. 1981. Regulation of wound-healing angiogenesis—effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. *Surgery* 90: 262–270;

Kurilov I.N., Ryzhak G.A. 2009. Effect of peptide bioregulator on healing of excision wounds in old animals. *Bull Exp Biol Med Dec*;148(6):915-9;

Läuchli S. 2012. 1 Primary Wound Dressing®: clinical experience. A novel wound dressing, formulated from natural oils, promotes effective healing, protects periwound skin and leads to an impressive induction of granulation tissue, even in deep wounds. *THE* 1-3;

Läuchli S., Hafner J., Wehrmann C., French L. E. and Hunziker T. 2012. Post-surgical scalp wounds with exposed bone treated with a plant-derived wound therapeutic. *Journal of Wound Care* 21(5): 228-233;

Lavagna S.M., Secci D., Chimenti P., Bonsignore L., Ottaviani A., Bizzarri B. 2001. Efficacy of Hypericum and Calendula oils in the epithelial reconstruction of surgical wounds in childbirth with caesarean section. *Il Farmaco* 56: 451–453;

Lee S.Y., Kotapati S., Kuti J.L., Nightingale C.H. and Nicolau D.P. 2006. Impact of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species on clinical outcomes and hospital costs: a matched cohort study. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 27, 1226–1232;

Lepault E., Cèleste C., Dorè M., Martineau D. and Theoret C. 2005. Comparative Study on Microvascular Occlusion and Apoptosis in Body and Limb Wounds in the Horse. *Wound Rep Reg*, 13, 520-529;

Lineaweaver W., Howard R., Soucy D. 1985. Topical antimicrobial toxicity. *Arch Surg* 120(3):267-70;

Lloyd D.H, Lamport A.I, Feeney C.1996. Sensitivity to antibiotics amongst cutaneous and mucosal isolates of canine pathogenic staphylococci in the UK. *Vet. Dermatol*, 7:171-175;

Lloyd D.H., Lamport A.L., Noble W.C., Et Al. 1999. Fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus intermedius*. *Veterinary Dermatology*, 10, 249-51;

Loeffler A., Linek M., Moodley A., Guardabassi L., Sung, J.M.L., Winkler M., Weissand R., Lloyd D.H. 2007. First report of multiresistant, *mecA*-positive *Staphylococcus intermedius* in Europe: 12 cases from a veterinary dermatology referral clinic in Germany. *Veterinary Dermatology*, 18, 6, 412-421;

Lomagno P., Lomagno R.C. 1979. Activity of *Hypericum perforatum* oil in the treatment of the bed sores in old people. *Fitoterapia* 50: 201-205;

M/S Botanical Indian Laboratories Private Ltd., 2002. New Delhi. Antiseptic 99(1), 12-12;

Madhu D.C. and Nair G.R.N. 2001. Antiulcer, antibacterial and spermicidal activities of salannin. *Indian drugs*, 38(12), 629-632;

Mainetti S. and Carnevali F. 2013. An experience on pediatric burn wounds treated with a plant-derived wound therapeutic. *JWC*, 22, 12: 681-689;

Manikandan P., Ramalingam S.M., Vinothini G., Ramamurthi V.P., Singh I.P., Anandan R., Gopalakrishnan M., Nagini S. 2012. Investigation of the chemopreventive potential of neem leaf subfractions in the hamster buccal pouch model and phytochemical characterization, *Eur. J. Med. Chem.* 56 271–281;

Margaret A., Fonder B.S., Gerald S., Lazarus M.D., David A. And Cowan M.D. 2008. Treating the chronic wound: a practical approach to the care of non-healing wounds and wound care dressing. *J. Am. Acad: Dermatol.*, 58, 185-206;

Martínez-Poveda B., Quesada A.R., Medina M.A. 2005. Hyperforin, a bioactive compound of St. John's Wort, is a new inhibitor of angiogenesis targeting several key steps of the process. *International Journal of Cancer*, Dec 10;117(5):775-80;

Mason I., Lloyd D.H., 1989. The role of allergy in the development of canine pyoderma. *Journal Of Small Animal Practice*, 30:216-18;

Maurer A., Johne A., Bauer S., Brockmosler J., Donath F., Roots I., Langheinrich M., Husbner W.D. 1999. Interaction of St John's wort extract with phenprocoumon [abstract]. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*55: A22;

McDonnell G., Russell A.D. 1999. Antiseptics and disinfectants: Activity, action and resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 12(1):147-79;

McMahon-Pratt D. and Alexander J. 2004. Does the Leishmania major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease. *Immunological Reviews*, 201: 206-224;

Medleau L., Hnilica K.A. *Dermatologia Del Cane Del Gatto Atlante A Colori E Guida Alla Terapia*”, Seconda edizione 2007, Elsevier Masson, p.31;

Miller C.B., Wilson D.A., Keegan K.G, Kreger J.M., Adelstein E.H. and Ganjam V.K. 2000. Growth characteristics of fibroblasts isolated from the trunk and distal aspect of the limb of horses and ponies. *Vet Surg*, 29:1-7;

Monaghan C., Tierney U., Colleran E. 1981 .Antibiotic resistance and R-factors in the fecal coliform flora of urban and rural dogs. *Antimicrob. Agents Chemother*, 19, 266-270;

Morris D.O., Rook K.A., Shofer F.S. and Rankin S.C. 2006. Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003–04). *Veterinary Dermatology*, 17: 332–337;

Mosti G. and Iabichella M.L. 2007. Skin Ulcer Treatment by MIX 557 Therapy. Abstract 90, EWMA Congress, Glasgow;

Müller W.E. 2003. Current St. John's research from mode of action to clinical efficacy. *Pharmacological Research* 47: 101-109;

Murty K.S., Rao D.N., Rao D.K. and Murty L.B.G. 1978. A preliminary study on the hypoglycemic and antihyperglycemic effects of *azadirachta indica*. *Indian Journal of Pharmacology*. 10:247-250;

Mustapha M., Bukar-Kolo Y.M., and Gulani Y.A.G.I.A. 2014. Review on Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Dogs and Cats. *Int. J. Anim. Veter. Adv*, 6(2), 61-73;

Nara T., Yasui T., Fujimori O., Meyer W., and Tsukise A. 2011. Histochemical properties of sialic acids and antimicrobial substances in canine anal glands. *European journal of histochemistry*: EJH, 55(3);

Niedner R. 1997. Cytotoxicity and Sensitization of Povidone-Iodine and other frequently used anti-infective agents. *Dermatology*, 195 (Suppl 2), 89-92;

Noble W.C., Kent L.E. 1992. Antibiotic resistance in *Staphylococcus intermedius* isolated from cases of pyoderma in the dog. *Vet. Dermatol.* 3,71-74;

NORM-VET 2002. 2003. Consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in Norway. ISSN15022307. [Online.

http://www.vetinst.no/Arkiv/Zoonosesenteret/NORM_NORM_VET_2002.pdf (7 May 2004, date last accessed);

Okpako D.T. 1977. Prostaglandin synthetase inhibitory effect of Azadirachta Indica. *Journal of West African Science Association* 22: 45;

Orhan I.E., Kartal M., Gülpinar A.R., Yetkin G., Orlikova B., Diederich M. 2014. Inhibitory effect of St. John' s Wort oil macerates on TNF α -induced NF- κ B activation and their fatty acid composition. *Journal of Ethnopharmacology* 155 (2): 1086-1092;

Öztürk N., Korkmaz S., & Öztürk Y. 2007. Wound-healing activity of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) on chicken embryonic fibroblasts. *Journal of ethnopharmacology*, 111(1): 33-39;

Padoa E. Anatomia Comparata Dei Vertebrati Diciottesima Edizione 2002 Milano Feltrinelli Editore, p.127;

Paradis M., Abbey L., Baker B., Coyne M., Hanningan M., Joffe D., Pukay B., Trettien A., Waisglass S., Wellington J. 2001. Evaluation of clinical efficacy of marbofloxacin (zeniquin) tablets for treatment of canine pyoderma: an open clinical trial. *Veterinary Dermatology* 12, 163-169;

Pak I.S., Han H.R., Shimizu A. 1999. Characterization of methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* isolated from dogs in Korea. *J. Vet. Med. Sci.*, 61, 1013-1018;

Paterson D.L., Rossi F., Baquero F., Hsueh P.R., Woods G.L., Satishchandran V., Snyder A., Harvey C. M., Teppler H., Dinubile M.J., and Chow J.W. 2005. In vitro susceptibilities of aerobic and facultative Gram-negative bacilli isolated from patients with intraabdominal infections worldwide: the 2003 Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). *J. Antimicrob. Chemother.* 55, 965–973;

Pop-Vicas A., Strom J., Stanley K. and D'Agata E.M.C. 2008. Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria among Patients Who Require Chronic Hemodialysis. *Clin J Am Soc Nephrol*, 3, 752-758;

Priyadarsini R.V., Murugan R.S., Sripriya P., Karunakaran D., Nagini S.. 2010. The neem limonoids azadirachtin and nimbolide induce cell cycle arrest and mitochondriamediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells, *Free Radic. Res.* 44 624–634;

Proksch E., Brandner J. M., and Jensen J.M. 2008. The skin: an indispensable barrier. *Experimental dermatology* 17(12), 1063-1072;

Quinn P.J., Carter M.E., Markey B., Carter G.R. 1994. Staphylococcus species. In *Clinical Veterinary Microbiology*. Mosby-Year Book Europe, London, UK, 118–126;

Rantala M., Lahti E., Kuhalampi J., Pesonen S., Järvinen A.K., Saijonmaa-Koulumies L., Honkanen-Buzalski T. 2004. Antimicrobial resistance in Staphylococcus spp., Escherichia coli and Enterococcus spp. in dogs given antibiotics for chronic dermatological disorders, compared with non-treated control dogs, *Acta vet. scand*, 45, 37-45;

Ricci E., Cavicchioli A., Romanelli M. 2006. Conservative Management of Pressure Ulcers” In: Romanelli M (ed) *Science and Practice of Pressure Ulcer Management* Springer verlag (ISBN 10:1-85233-839-3): 111–118;

Roby C.A., Anderson G.D., Kantor E., Dryer D.A., Burstein A.H. 2000. St John's wort: effect on CYP3A4 activity. *Clin. Pharmacol. Ther.* 67: 451±457;

Romanelli M. The use of systemic and topical agents for wound healing. in: V. Falanga (Ed.) Cutaneous wound healing. Martin Dunitz Ltd, London; 2001: 357–368;

Rossi F., Baquero F., Hsueh P.R., Paterson D.L., Bochicchio G.V., Snyder T.A., Satishchandran V., Mccarroll K., Dinubile M.J., And Chow J.W. 2006. In vitro susceptibilities of aerobic and facultatively anaerobic Gram negative bacilli isolated from patients with intra-abdominal infections worldwide: 2004 results from SMART (Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends). *J. Antimicrob. Chemother.*, 58, 205–210;

Roy M.K., Kobori M., Takenaka M., Nakahara K., Shinmoto H., Tsushida T. 2009. Inhibition of colon cancer (HT-29) cell proliferation by a triterpenoid isolated from *Azadirachta indica* is accompanied by cell cycle arrest and up-regulation of p21, *Planta Med.* 72 (2006) 917–923;

Salvatori S. Tesi di laurea anno accademico **2012/2013**, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Perugia; “one VET: UNA MISCELA DI FITOTERAPICI PER LA TERAPIA DELLE PiodermITI DEL CANE: STUDIO PRELIMINARE”. Relatore: Dott.ssa Giorgia Della Rocca, correlatore Dott.ssa Fiorella Carnevali;

Schempp C.M., Kirkin V., Simon-Haarhaus B., Kersten A., Kiss J., Termeer C.C., Gilb B., Kaufmann T., Borner C., Sleeman J.P., Simon J.C. 2002. Inhibition of tumour cell growth by hyperforin, a novel anticancer drug from St. John's wort that acts by induction of apoptosis. *Oncogene* 14;21(8):1242-50;

Schempp C.M., Winghofer B., Muller K., Schulte-Mönting J., Mannel M., Schopf E., Simon J.C. 2003. Effect of oral administration of *Hypericum perforatum* on skin erythema and pigmentation induced by UVB, UVA, Visible Light and Solar Simulated Radiation. *Phytotherapy Research* 17, 141-146;

Schempp C.M., Windeck T., Hezel S., Simon J.G. 2013. Topical treatment of atopic dermatitis with St. John's wort cream – a randomized, placebo controlled, double blind half-side comparison. *Phytomedicine* 10, Supplement IV; pp. 31–37;

Schreml S., Szeimies R.M., Prant L., Karrer S., Landthaler M. and Babilas P. 2010. Oxygen in acute and chronic wound healing. *British Journal of Dermatology*, 163, 257-268;

Schultz G.S., Sibbald R.G., Falanga V., Ayello.A, Dowsett C., Harding K., Romanelli M., Stacey M.C., Teot L., Vanscheidt W. 2003. Wound bed preparation a systematic approach to wound management wound repair and regeneration, 11 (suppl): S1-S28;

Schultz G., Dowsett C. 2012. Wound Bed Preparation Revisited. *Wounds Internationa* Vol.3, Issue 1, pp: 25-29;

Schumacher M., Cerella C., Reuter S., Dicato M., Diederich M. 2011. Anti-inflammatory, pro-apoptotic, and anti-proliferative effects of a methanolic neem (*Azadirachta indica*) leaf extract are mediated via modulation of the nuclear factor- κ B pathway, *Genes Nutr.* 6 149–160;

Schwaber M.J., Navon-Venezia S., Kaye K.S., Ben-Ami R., Schwartz D., Carmeli Y. 2006. Clinical and economic impact of bacteremia with extended-spectrum-beta-lactamaseproducing *Enterobacter*. *Antimicrob Agents Chemother*, 50, 1257–1262;

Schwarz S., Roberts C., Werckenthin Y.P., Lange C., 1998. Tetracycline resistance in *Staphylococcus* Spp. From domestic animals. *Vet. Microbiol.* 63, 217-227;

Scott D.W., Miller W.H., Griffin C.E. 2001. *Small Animal Dermatology*, 6th edn. Philadelphia: W.B.Saunders 1104-5;

Scott D.W., Peters J., Miller W. H. 2006. Efficacy of orbifloxacin tablets for the treatment of superficial and deep pyoderma due to *Staphylococcus intermedius* infection in dogs, *Can Vet J.* 47(10): 999;

Sentürk S., Özel E., Sen A. 2005. Clinical Efficacy Of Rifampicin For Treatment Of Canine Pyoderma, *ACTA VET. BRNO*, 74: 117-122;

Shah M.P., Sheth U.K., Bhide N.K. and Shah M.J. 1958. Clinical trials with parenteral sodium nimbinate in a new diuretic. *Indian Journal of Medical Sciences*, 12:150;

Shai A., Avrin V., Zvulunov A. and Dinstein I. 2007. Scaled Healing Assessment Index: a novel method for measuring the degree of wound bed preparation. *Skin Research and Technology*, 13, 227-235;

Shaker A. Seddiek, Hanamen F. Khater, Mohamed M.El-Shorbagy, Ali M. 2013. The acaricidal efficacy of aqueous neem extract and ivermectin against *Sarcoptes scabiei* var. *cuniculi* in experimentally infested rabbits. *Parasitol Res* 112, 2319–2330;

Sharma N.N. and Saksena P.K. 1959. Sodium nimbinate. In-vitro study of its spermicidal action. *Ind J Med Res*, 13, pp. 1038–1040;

Seaman S. 2002. Dressing selection in chronic wound management. *J Am Podiatr Med Assoc.* 92: 24–33;

Sibbald R.G., Chapman P. And Contreras-Ruiz J. 2006. “The role of bacteria in pressure ulcers” In: Romanelli M. (ed) *Science and Practice of Pressure Ulcer Management Springer Verlag* (ISBN 10:1-85233-839-3):139 – 162;

Siddiqui S. 1942. *Curr Sci*; 11:278–279;

Sosa S., Pace R., Bornancin A., Morazzoni P., Riva A., Tubaro A., Della Loggia R. 2006. Topical anti-inflammatory activity of extract compounds from *Hypericum perforatum* L. *Journal of Pharmacy and pharmacology* 59: 1-7;

Srivastava P., Yadav N., Lella R., Schneider A., Jones A., Marlowe T., Lovett G., O'Loughlin K., Minderman H., Gogada R., Chandra D. 2012. Neem oil limonoids induces p53-independent apoptosis and autophagy, *Carcinogenesis* 33 2199–2207;

Stashak T.S. 1991. Principles of wound healing. In: Stashak TS ed. *Equine Wound Management*. First Edition pp 1-18;

Stojadinovic A., Carlson J.W., Schultz G.S., Davis T.A. 2008. Elster EA Topical advances in wound care *Gynecologic Oncology* 111 (2008) S70–S80;

Subaprija R., Nagini S. 2005. Medicinal properties of Neem leaves: a review. *Currency Medicinal Chemical - Anti Cancer Agents* 5: 149-156;

Sudhir K.P., Debasis M., Goutam G. And Panda C.S. 2010. Biological action and medicinal properties of various constituent of *Azadirachta indica* (Meliaceae) an Overview. *Annals of Biological Research* 1 (3) :24-34;

Susin S.A., Lorenzo H.K, Zamzami N., Marzo I., Snow B.E., Brothers G.M., Mangion J., Jacotot E., Costantini P., Loeffler M., Larochette N., Goodlett D.R., Aebersold R., Siderovski D.P., Penninger J.M., Kroemer G., 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor, *Nature* 397: 441–446;

SVARM 2002. (2003). Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring. ISSN 1650-6332. [Online.] <http://www.sva.se/pdf/svarm2002.pdf> (7 May 2004, date last accessed);

Taylor D.M. 1999. Inactivation of unconventional agents of the transmissible degenerative encephalopathies. In: Russell AD, Hugo WB, Ayliffe GAJ (eds). Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization, Third Edition. Oxford, England: Blackwell Science;

Theodoret C.L and Wilmink J.M. 2008. Treatment of Exuberant Granulation Tissue, In: Stashak TS ed. Equine Wound Management. Second Edition (2008) pp 445-462;

Theoret C.L, Barber S.M, Moyana T.N and Gordon J.R. 2001. Expression of transforming growth factors β 1, β 3 and basic fibroblast growth factor in full-thickness skin wounds of equine limbs and thorax. *Vet Surg* 30,269-277;

Thomas D.R. 2006. Prevention and treatment of Pressure Ulcer. *J. Am. Dir.Assoc.* 2006, 7, 46-59; 15; 17;

Thomas G.W., Rael L.T., Bar-Or R., Shimonkevitz R., Mains C.V., Slone D.S., Craun M.L. and Bar-Or D. 2009. Mechanisms of delayed wound healing by commonly used antiseptics. *J. Trauma*, 66, 1, 82-90;

Tidjani M.A., Dupont C. and Depierre J. 1989. Azadirachta indica stem bark extract--Anti-inflammatory activity. *Planta Medica Phytother.* 23, 4, 259-266;

van Belkum A., Van Den Braak N., Thomassen R., Verbrugh H., Endtz H. 1996. Vancomycin-resistant enterococci in cats and dogs. *Letter to the Editor. Lancet*, 348,1038-1039;

van der Esch S.A., Carnevali F. Cristofaro M., 2007. Mix 557: A topical Remedy with repellent, biocidal and healing properties for treating Myiasis both in Mammal as in Human. *Proceeding EWMA*,Glasgow: http://ewma.org/fileadmin/user_upload/EWMA/pdf/conference_abstracts/2007/or_al/o89.pdf;

van Waes C. 2007. Nuclear factor-kappaB in development, prevention, and therapy of cancer, *Clin. Cancer Res.* 13 1076–1082;

Varma G.S., Miracles of neem tree. *Rasayan Pharmacy*, New Delhi;

Vasconez L.O., Schneider W.J., Jurkiewicz M.J. 1977. Pressure sores. *Curr Probl Surg*, 62, 83-89;

Werckenthin C., Cardoso M., Martel J.L., Schwarz S. 2001. Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particular reference to bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus* and canine *Staphylococcus intermedius*. *Review article. Vet. Res.*, 32,341-362;

Wilmink J.M and van Weren R. 2004. Differences in wound healing between horses and ponies: application of research results to the clinical approach of equine wounds. *Clin Tech Equine Pract*, 3, 123-133;

Wilmink J.M. .2009. Chronic Exuberant Granulation Tissue-Any difference with “Regular” proud Flesh.*Large Animal: Equine- NAVC Conference* 18-19;

Wilkinson G.T. 1989. “*Atlante di dermatologia del cane e del gatto*” UTET, , pp: 537-538;

Wingate K.V., Torres S.M., Silverstein K.A., Hendrickson J.A., and Rutherford M.S. 2009. Expression of endogenous antimicrobial peptides in normal canine skin. *Veterinary dermatology* 20(1), 19-26;

Winter G.D. 1962. Formation of the scab and the rate of epithelialisation of superficial wounds in the skin of domestic pig. *Nature* 193: 293;

Whitney J., Philips L., Aslam R., Barbul A., Gottrup F., Gould L., Robson M.C., Rodeheaver G. Thomas D. And Scotts N. 2006. In Guideline for the treatment of pressure ulcers. *Wound Repair and Regeneration*, 663-679;

Zhang Y., Xu J., Yin Z., Jia R., Lu Y., Yang F., Du Y., Zi G., Zou P., Lv C., Hu T., Liu S., Shu G. 2010. Isolation and identification of the antibacterial active compound from petroleum ether extract of neem oil. *Fitoterapia* 81: 747-750;

Zorzi L. 2010. Convegno Interregionale AIUC, Padova 17 Aprile.

SITOGRAFIA

<http://www.ecoindia.com;>

www.agraria.org;

http://www.apss.tn.it/public/allegati/DOC_269029_0.pdf;

[http://slideplayer.it/slide/567597/;](http://slideplayer.it/slide/567597/)

www.arsiam.it 2010;

[http://www.centroveterinariofioranese.blogspot.it/2013/03/perche-i-cani-non-odorano-mai-di-sudore.html;](http://www.centroveterinariofioranese.blogspot.it/2013/03/perche-i-cani-non-odorano-mai-di-sudore.html)

www.anatomypic.com;

www.coloradoskinadvein.com;

<http://www.notonlyblack.it;>

[http://neem.teanifty.com/neem/files/9.Dr.S.%20Andrew%20Van%20Der%20Esch.pdf;](http://neem.teanifty.com/neem/files/9.Dr.S.%20Andrew%20Van%20Der%20Esch.pdf)

[www.analsurgicalcenter.com.](http://www.analsurgicalcenter.com)