

Attività battericida di alcuni acidi nei confronti di microrganismi coinvolti nell'etiopatogenesi dell'acne

Bactericidal activity of some acids towards microorganisms involved in etiopathogenesis of acne

Summary

Acne vulgaris is a chronic inflammatory pathology of the pilo-sebaceum unit and one of the most diffused dermatologic illnesses: in fact at least 50% of the people between the 13 and the 30 years is affected. Bacteria as *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* have an important role in etiopathogenesis of acne. Peeling is a method that employs chemical substances whose action of removal the most superficial layers of the epidermis and it is frequently used to aid the treatment of acne. The action of peelings develops its on three foreheads: keratolytic effect to reduce the follicular hyperkeratosis, anti-inflammatory and antibacterial action. We have appraised the bactericidal activity of some acids for peeling: glycolic, tri-cloroacetic, salicylic, pyruvic, azelaic and mandelic.

Tri-cloroacetic and pyruvic acids showed a strong bactericidal activity with all the concentrations used in the tests. Also the activity of glycolic acid was excellent, while azelaic acid had a good bactericidal activity with low concentrations, for *P.acnes*, but clearly less towards *Staphylococci*. Mandelic acid showed the smaller bactericidal activity toward all microorganisms, but a strong bacteriostatic activity was confirmed.

Lanzafame P. Bactericidal activity of some acids towards microorganisms involved in etiopathogenesis of acne. *Trends Med* 2011; 11(4):191-199.

©2011 Pharma Project Group srl. ISSN: 1594-2848

Key words:
acne
peeling
bacterial activity


Introduzione

L'acne volgare è una patologia infiammatoria cronica dell'unità pilosebacea a patogenesi multifattoriale, che insorge abitualmente, ma non esclusivamente, nell'adolescenza e si caratterizza per la formazione di comedoni spesso associati ad altre lesioni infiammatorie, quali papule, pustole, noduli, con possibile evoluzione in esiti cicatriziali. È la condizione patologica con la più alta incidenza cumulativa nella popolazione generale. L'incidenza di tale patologia varia, a seconda dei lavori pubblicati in base alla popolazione analizzata (età, differenze razziali) e ai metodi di valutazione. Secondo alcuni autori, l'incidenza sarebbe del 91% nei maschi e del 79% nelle femmine durante l'adole-

scenza, del 3% nei maschi e del 12% nelle femmine, in età adulta; altri autori riportano invece un'incidenza del 55% nei maschi e del 45% nelle femmine tra i 14 ed i 16 anni, altri lavori ancora riportano un'incidenza del 29% nei ragazzi e del 16% nelle ragazze di età compresa tra i 16 ed i 20 anni²¹. White riporta un'incidenza pari a 85% degli adolescenti maschi, 80% adolescenti femmine, 8% tra 25-34 anni e 3% tra 35-44 anni di età²⁷.

Fisiopatogenesi dell'acne

L'acne è una malattia geneticamente determinata, scatenata da una molteplicità di agenti eziologici che determinano le lesioni (specialmente quelle in-

 **Paolo Lanzafame**
U.O. Microbiologia e Virologia -
Azienda Provinciale per i Servizi
Sanitari - Provincia autonoma di Trento
Ospedale S. Chiara
L. go Medaglie d'Oro, 9
38123 Trento

fiammatorie) attraverso la mediazione di numerosi meccanismi patogenetici. E' quindi un processo a patogenesi multifattoriale, in cui da un punto di vista fisiopatologico, si riconoscono quattro momenti eziopatogenetici fondamentali, noti da tempo:

1. Disturbo di cheratinizzazione dell'epitelio follicolare caratterizzato da iperproliferazione dei cheratinociti dell'infrainfundibulo^{3,4}, aumento della coesione cellulare e quindi mancata desquamazione dei corneociti⁵ con conseguente ostruzione follicolare e formazione di microcomedoni (comedogenesi), processo che si verifica solo nei follicoli sebacei e non in quelli terminali;
2. Iperseborrea da aumentata attività delle ghiandole sebacee. La produzione di sebo a livello delle ghiandole sebacee è controllata dagli ormoni androgeni. Tali ghiandole iniziano ad aumentare di volume, sotto lo stimolo androgenico, approssimativamente all'età di 7-8 anni, con conseguente incremento della produzione di sebo. A conferma di questo, lo sviluppo di acne nel periodo prepuberale è strettamente associato ad innalzamento dei livelli sierici di deidroepiandrosterone solfato (DHEAS), precursore del testosterone^{6,7}; i pazienti affetti da deficit di recettori per gli androgeni non sviluppano acne e l'iperplasia e il carcinoma dell'ovaio o del surrene, che comportano un eccesso di androgeni, sono spesso associati allo sviluppo dell'acne⁸. Il metabolismo degli androgeni nei cheratinociti e nei sebociti dell'unità pilo sebacea ha inizio con la trasformazione del DHEA in androstenedione quindi in testosterone

tramite l'azione di due enzimi citoplasmatici, la 3 β -idrossisteroide-deidrogenasi e la 17 β -idrossisteroide-deidrogenasi. Il testosterone viene convertito in diidrotestosterone (DHT) ad opera della 5 α -reductasi, e quest'ultimo ormone rappresenta il prodotto finale e più importante del metabolismo androgenico coinvolto nella stimolazione dell'attività secretoria sebacea. Un'iperattività della 5 α -reductasi tipo I presente nella ghiandola sebacea, o comunque l'attività degli androgeni, può determinare anche l'aumento dell'attività seborea. Testosterone e DHT esplicano la loro azione legandosi a recettori citoplasmatici, formano un complesso che entra nel nucleo e legandosi ad alcuni siti specifici del DNA, facilita la trascrizione di alcuni geni che stimolano la proliferazione cellulare e la produzione di lipidi da parte delle cellule sebacee²². E' stato ipotizzato che anche gli estrogeni circolanti abbiano un ruolo importante nel regolare la produzione di sebo, in quanto possono agire direttamente, con un effetto opposto a quello degli androgeni nel contesto della ghiandola sebacea, oppure indirettamente inibendo la produzione degli androgeni a livello delle gonadi con un meccanismo di feed-back negativo sul rilascio di gonadotropine. Sembra invece che il progesterone a dosi molto elevate possieda un'attività sebotrofica, portando ad un aggravamento dell'acne in fase premenstruale e nel I trimestre di gravidanza. Altri progestinici, quali il ciproterone acetato, hanno un effetto inibitorio, "antiandrogeno", e possono, quindi, essere im-

piegati a scopo terapeutico^{15,23}.

3. Colonizzazione e attività del *Propionibacterium acnes*, che trova un pabulum favorevole nell'ambiente anaerobio e ricco di sebo del microcomedone. Tale batterio è dotato di proprietà immunostimolanti ed è in grado di produrre diverse sostanze in grado di giocare un ruolo nella patogenesi dell'acne: ialuronidasi, proteasi, lipasi e fattori chemiotattici per neutrofili, linfociti e macrofagi^{18,20}. In particolare è capace di produrre una lipasi extracellulare che idrolizza i trigliceridi del sebo a glicerolo, utilizzato come substrato per la crescita dei batteri, e acidi grassi liberi i quali possono contribuire alla formazione del comedone e indurre l'infiammazione attraverso la stimolazione a produrre citochine pro-infiammatorie. Gli altri enzimi prodotti agiscono alterando l'integrità dei cheratinociti e della parete follicolare con amplificazione del processo infiammatorio.
4. Infiammazione e conseguentemente reazioni immunologiche follicolari e perifollicolari, la cui durata ed entità sono variabili da soggetto a soggetto a seconda di:
 - a. fattori immunologici individuali:
 - i. tipizzazione HLA
 - ii. attività fagocitaria
 - b. risposta immunitaria individuale verso *P. acnes*.

L'infiltrato è inizialmente mononucleato, costituito in prevalenza da linfociti T helper CD4+, in sede perivascolare e periduttale, associati a cellule di Langerhans. Questi dati, insieme alla segnalazione di titoli elevati di anticorpi anti *P. acnes*, rilevati in pazienti con acne severa, suggeriscono un coinvolgimento sia

dell'immunità cellulo-mediata che di quella umorale nella patogenesi delle lesioni acneiche di tipo infiammatorio²⁰. Gli antigeni batterici stimolano infatti i linfociti B a produrre anticorpi, i quali sarebbero in grado di attivare il complemento. Questo, in realtà, può essere attivato anche direttamente, mediante la via alternativa, dai frammenti di peptidoglicani e polisaccaridi rilasciati dal *P. acnes*. L'attivazione del complemento determina la formazione di C5a, potente fattore chemiotattico per i neutrofili⁸, questi sono richiamati nei siti di infiammazione anche dai fattori chemiotattici batterici e dalla selectina E, la cui espressione da parte delle cellule endoteliali dei microvasi del derma è indotta dalle citochine. Inoltre risulta molto importante per la migrazione dei neutrofili, ma anche dei linfociti e dei monociti, l'espressione su tali cellule delle $\alpha 2$ -integrine LFA-1 e CR3, in grado di legarsi alle calmoduline (CAM) endoteliali (ICAM-1 ed ICAM-2), espresse dall'endotelio vascolare. L'espressione di ICAM-1 a livello endoteliale normalmente bassa, può essere indotta dalle citochine liberate dai macrofagi sotto lo stimolo dei frammenti di membrana di *P. acnes*^{17,18}.

Negli ultimi anni si sono compresi meglio i meccanismi fisiopatogenetici che portano all'estrinsecazione di questi 4 momenti e che sono quindi capaci di determinare sia la lesione ritenuta iniziale dell'acne, ossia il comedone, che le lesioni infiammatorie. L'IL1 α , citochina proinfiammatoria proveniente da linfociti e cheratinociti, gioca un ruolo importante nei processi di ipercheratinizzazione: rilasciata in seguito a variazioni nel tasso di secrezione o composizione del sebo è in grado di indurre l'iper-

cheratinizzazione dei cheratinociti infundibulari, oltre che dare inizio ai processi infiammatori^{8,18}. Un altro fattore che si ritiene coinvolto nel processo di cheratinizzazione del follicolo pilosebaceo è l'idratazione dell'epitelio pilosebaceo, un cambiamento della quale potrebbe giustificare il peggioramento premenstruale.

Recentemente si è anche riscoperto il ruolo dell'acido linoleico, messo in correlazione con l'acne per la prima volta nel 1976 quando furono evidenziati livelli più bassi di tale acido grasso essenziale nei lipidi cutanei di pazienti acneici. L'aumentata produzione di sebo è infatti caratterizzata da modificazioni anche qualitative ed in particolare, da una riduzione dell'acido linoleico. Infatti le cellule sebacee indifferenziate dello strato basale ricevono parte dei lipidi necessari alla sintesi del sebo, incluso l'acido linoleico, per diffusione dai vasi del derma. Quando nella cellula differenziata inizia la sintesi di sebo, cessa la possibilità di assumere altri lipidi dal circolo ematico. I sebociti hanno quindi a disposizione la stessa quantità di acido linoleico sia che producano piccole quantità di sebo, sia che ne producano grosse quantità, come accade nei pazienti acneici. Questo spiega perché, in tali pazienti, la quantità di acido linoleico nel sebo è diminuita¹¹. L'acido linoleico è in grado di inibire l'enzima 5 α reduttasi tipo I, che quindi in caso di diminuzione dell'acido linoleico può avere un'attività maggiore. Il deficit di acido linoleico comporta anche una ridotta disponibilità di acidi grassi essenziali per l'epitelio follicolare con conseguente alterazione dell'integrità della parete ed aumento della permeabilità. L'aumentata permeabilità della

parete follicolare determina a sua volta un aumento del flusso di acqua dal derma verso il lume del follicolo con conseguente aumento della concentrazione di sostanze nutritive per i batteri e quindi aumento della loro proliferazione²⁰. Quindi la diminuzione dell'acido linoleico nel sebo, svolge un ruolo sia nell'ipercheratinizzazione dell'infrainfundibulo che nel favorire la proliferazione di *P. acnes* e conseguentemente i processi infiammatori.

La riduzione della "funzione barriera" della parete del follicolo, da deficit di acido linoleico è inoltre responsabile di un aumento della tensione di ossigeno, che stimola il *P. acnes* a produrre porfirina. Quest'ultima interagisce con l'ossigeno molecolare e determina la produzione di specie reattive dell'ossigeno e di radicali liberi che danneggiano i cheratinociti adiacenti¹⁰.

Negli ultimi anni si è poi posta molta attenzione ai Toll-like receptors (TLR), proteine transmembrinarie espresse sulla superficie di molte cellule tra cui i cheratinociti, capaci di riconoscere specifiche proteine di membrana di numerosi microorganismi con conseguente attivazione di una risposta immunitaria. In particolare è stato evidenziato che *P. acnes* è in grado di attivare il TLR-2, espresso da cheratinociti e sebociti del follicolo pilosebaceo, nonché dalle cellule infiammatorie infiltranti il follicolo pilosebaceo nei soggetti affetti da acne, con successiva attivazione di un fattore di trascrizione che regola l'iperproduzione e rilascio di citochine proinfiammatorie, come IL-12 e IL-8²². Il ruolo svolto dai microorganismi infundibulari nella patogenesi dell'acne rimane controverso. *P. acnes*, un difterioide pleomorfo anaerobio, Gram positivo, è il microorganismo predominante a

livello infundibulare. E' assente nei soggetti sani tra 11 e 20 anni, mentre è presente a una concentrazione di 114800 batteri/cm² nei soggetti della stessa età affetti da acne. *P. acnes* presenta un'attività lipasica che è responsabile della trasformazione degli acidi grassi esterificati non comedogenici in acidi grassi liberi comedogenici. Nell'infundibulo sono presenti altri microrganismi anch'essi dotati di attività lipasica quali *Propionibacterium granulosum*, un micrococco coagulasi negativo, *Pitirosporium ovale* (*Malassezia furfur*), un micete, e infine alcuni stafilococchi, *Staphylococcus epidermidis* e, in misura minore, *Staphylococcus aureus*, presenti nella porzione superficiale del follicolo.

P. acnes rimane il principale imputato nella patogenesi dell'acne. Infatti alcuni esperimenti hanno dimostrato che una sospensione di *P. acnes* vitale iniettata all'interno di una cisti procura la rottura della cisti stessa ed un'importante infiammazione dei tessuti circostanti⁵. Al contrario l'infiammazione è moderata se gli stessi microrganismi iniettati in cisti non sono vitali o se vengono iniettati direttamente nel derma, confermando così che l'azione infiammatoria viene esercitata dagli acidi grassi liberi conseguenti all'azione della lipasi del *P. acnes*. L'attività infiammatoria di *P. acnes* è conseguenza anche della capacità di produrre altri enzimi come proteasi e ialuronidasi e secernere un fattore chemiotattico all'interno dei comedoni. Questo fattore di basso peso molecolare, dializzabile e che non ha bisogno del complemento per la sua attivazione riesce ad uscire dal follicolo e ad attivare i leucociti polimorfonucleati. Questi, entrando nel follicolo, fagocitano il

microrganismo provocando la liberazione di enzimi idrolitici con conseguente danno all'epitelio follicolare. *P. acnes* è capace inoltre di attivare il complemento sia per la via classica che alternativa, contribuendo così ad accentuare la risposta infiammatoria. Molto importante è anche la risposta immunitaria dell'ospite. Il titolo degli anticorpi circolanti contro *P. acnes* è elevato in pazienti con acne grave, che questi anticorpi abbiano un effetto diretto non è dimostrato ma si è visto che la liberazione delle idrolasi lisosomiali dai leucociti polimorfonucleati da parte di *P. acnes* è anticorpo anti-*Propionibacterium*-dipendente. E' possibile inoltre un'azione della risposta cellulosa mediata come evidenziato da risultati positivi con skin-test effettuati utilizzando sospensioni di *P. acnes*, dall'aumento della trasformazione linfocitaria in vitro dopo esposizione agli antigeni di *P. acnes* dei linfociti prelevati da sangue periferico di soggetti con acne grave nodulocistica e un aumento della migrazione dei leucociti di soggetti con grave acne dopo esposizione agli antigeni di *P. acnes*^{14,16}.

Terapia dell'acne

Ciascuno dei 4 momenti eziopatogenetici fondamentali dell'acne può rappresentare il target di un trattamento specifico. Attualmente sono in commercio una notevole quantità di presidi terapeutici sia per uso locale che generale con azioni diverse rivolte verso l'uno e/o l'altro dei fattori eziopatogenetici dell'acne. La terapia combinata rappresenta l'approccio terapeutico più indicato e più comunemente utilizzato. Nel 2003 la "Global Alliance to Improve Outcomes in Acne" ha elaborato e pubblicato

un algoritmo terapeutico che prevede un protocollo terapeutico diverso a seconda della forma clinica di acne e del grado di severità, utilizzando farmaci topici e/o sistemici di prima e di seconda scelta²⁴. Poco tempo dopo una seconda Consensus Conference (Siviglia 2003), tenuta dallo stesso gruppo di esperti, ha stabilito le linee guida per la terapia antibiotica sistemica dell'acne, considerando il meccanismo d'azione, l'efficacia e gli effetti collaterali di tutti gli antibiotici comunemente utilizzati per il trattamento dell'acne^{1,12}.

Utilizzo dei peeling chimici nella terapia dell'acne

La pelle è un organo dinamico. Ogni giorno lo strato corneo elimina, attraverso un meccanismo fisiologico, un numero infinito di cellule cheratinizzate e, contemporaneamente, a livello dello strato basale dell'epidermide nuove cellule si generano e iniziano la loro risalita verso lo strato corneo. Il peeling chimico (*peel* = pelare) serve ad accelerare questo rinnovamento attraverso l'uso di un agente chimico applicato sulla superficie cutanea. Queste sostanze sono in grado, attraverso la rimozione delle cellule morte dello strato corneo, di stimolare il turnover cellulare e indurre una reazione infiammatoria a livello del derma con stimolazione alla produzione di collagene e sostanza fondamentale².

Le modificazioni istologiche indotte dai peeling chimici possono essere distinte in cinque stadi:

1. Stadio dell'infiammazione e della coagulazione: dopo l'applicazione dell'agente esfoliante si verifica l'elaborazione di fattori solubili della coagulazione che determinano l'attivazione del siste-

ma delle chinine e del complemento.

2. Stadio della riepitelizzazione: dopo l'iniziale necrosi determinata dalla sostanza chimica esfoliante, un ruolo importante è svolto dall'iniziale migrazione dei cheratinociti indenni dai margini della ferita e dall'epitelio delle strutture annessiali che si trovano alla base della lesione. Questo è un evento diretto che inizia entro le prime ventiquattro ore dopo il peeling senza che necessariamente vi sia un incremento della proliferazione cellulare. I cheratinociti che si portano a coprire la base della lesione scivolano su una matrice di fibronectina che favorisce l'adesione cellulare tra i cheratinociti stessi.
3. Stadio del tessuto di granulazione: nel secondo o terzo giorno dopo il peeling inizia la formazione del tessuto di granulazione che si mantiene fino al momento in cui si completa la riepitelizzazione. Ruolo predominante nella genesi del tessuto di granulazione è svolto dai fibroblasti che producono collagene, elastina, glicosaminoglicani (che concorrono a mantenere un'ottimale idratazione cutanea) e proteasi come le collagenasi, fondamentali nella fase di rimodellamento dermico.
4. Stadio della neoangiogenesi: fibroblasti e macrofagi, una volta migrati nella sede di lesione, liberano fattori di crescita per la neoangiogenesi. Questo è un punto fondamentale nel decorso post-peeling: infatti la ripresa del flusso ematico apporta ossigeno e nutrienti, essenziali nella ricostituzione di epidermide e derma.
5. Stadio del rimodellamento del collagene: contemporanea-

mente alla formazione del tessuto di granulazione inizia il rimodellamento del collagene da parte delle collagenasi e il riarrangiamento delle fibre elastiche che prosegue a lungo, anche dopo l'avvenuta riepitelizzazione. Questo processo è essenziale per definire la struttura della pelle dopo il peeling^{9,13}.

La costante e drammatica richiesta da parte del paziente acneico di una rapida risoluzione delle lesioni attive e non, ha portato ad utilizzare schemi di trattamento sempre diversi ma soprattutto più rapidi ed efficaci ed è per questo che l'utilizzo dei peeling può essere utile in questa patologia.

La scelta dei peeling nell'acne deve considerare le diverse fasi della malattia e questo permette un miglioramento in tempi brevi ed un'elevata compliance da parte dei pazienti. Il meccanismo d'azione dei peeling nell'acne è determinato da tre fattori: un'azione cheratolitica e comedolitica, un'azione antiinfiammatoria ed antimicrobica ed un'azione stimolante il fibroblasto e la collagenogenesi. Le variabili da considerare in ogni peeling sono: la concentrazione della sostanza, la quantità utilizzata e l'intervallo tra un trattamento e l'altro. Tutte queste condizioni possono essere sfruttate per rendere il peeling più specifico per ogni paziente¹⁹.

Scopo dello studio

Scopo dello studio è analizzare l'attività battericida degli acidi più frequentemente utilizzati come supporto alla terapia dell'acne al fine di verificare la capacità delle singole sostanze utilizzate nei peeling ad esercitare una azione di *killing* batterico verso i microorganismi coinvolti

nell'eziopatogenesi dell'acne e valutare quale di queste può avere un migliore supporto alla terapia farmacologica antiacne nella comune pratica ambulatoriale

Materiali e metodi

Collezionamento dei ceppi microbici:

Per lo studio sono stati raccolti 20 ceppi di *Propionibacterium acnes*, 20 di *Staphylococcus epidermidis* e 20 di *Staphylococcus aureus* da lesioni cutanee acneiche papulo-pustolose o da follicoliti del viso, del cuoio capelluto e del tronco. 8 tra i ceppi di *S. aureus* e 13 tra i ceppi di *S. epidermidis* erano ceppi meticillino-resistenti. La meticillino-resistenza è dovuta alla modifica del sito bersaglio dei beta-lattamici. Nei ceppi meticillino-resistenti viene codificata una nuova *penicillin binding protein*, la PBP2a, dotata di bassa affinità per i beta lattamici, la proteina è codificata da un gene transposonico: il gene *mecA*, la cui espressione è controllata da vari altri geni sia transposonici che cromosomici e plasmidici. Questa complessa organizzazione è responsabile di alcune caratteristiche degli stafilococchi meticillinoresistenti: l'eteroresistenza, la costante produzione di beta-lattamasi e soprattutto la resistenza a numerose altre classi di antibiotici: chinoloni, aminoglicosidi, tetracicline, macrolidi. La meticillino-resistenza conferisce resistenza, *in vivo*, a tutti i farmaci beta-lattamici, compresi i carbapenemici. I campioni biologici sono stati ottenuti dopo accurata disinfezione e detersione cutanea con una soluzione alcoolica di clorexidina e con soluzione fisiologica sterile per eliminare i residui del disinfettante, le lesioni sono state punte per mezzo di

una microlance sterile ed il materiale caseoso e/o purulento è stato raccolto per mezzo di un tampone sterile in cotone (Copan Italia).

Il materiale così raccolto è stato sottoposto ad esame colturale in atmosfera aerobia ed anaerobia per 5 giorni, le piastre con i terreni di coltura inoculati sono state osservate quotidianamente e le colonie microbiche sviluppate sono state identificate per mezzo di test biochimici e sottoposte ai test di antibioticosensibilità. Per gli stafilococchi l'identificazione e gli antibiogrammi, con tecnica di microdiluzione in brodo, sono stati eseguiti con i pannelli Combo PBC21 ed analizzati con il sistema automatico Microscan WA 96 (Siemens Health Care), i ceppi di *Propionibacterium acnes* sono stati identificati con il sistema manuale API-ANIDENT (BioMérieux) ed i test di sensibilità sono stati eseguiti con tecniche di diffusione in agar ed E-Test (BioMérieux). I ceppi batterici sono stati quindi conservati in glicerolo a -80 °C fino al momento di esecuzione delle prove di batteriocidia degli acidi.

Preparazione delle soluzioni degli acidi: Le soluzioni degli acidi sono state preparate a partire dalle sostanze madri disidratate, acquistati dal commercio (Sigma Aldrich), con purezze superiori al 97%. Le diluizioni sono state variabili a seconda del preparato utilizzando concentrazioni di uso clinico. Tutti i preparati disidratati sono stati portati in soluzione utilizzando acqua distillata sterile per preparazioni iniettabili (Laboratori Diaco Biomedical s.p.a.) ad eccezione dell'acido salicilico per il quale la soluzione è stata preparata diluendo la sostanza madre in alcool 70%.

Le diluizioni sono state preparate sia per diluizione a raddoppio dalla soluzione a maggiore concentrazione, sia direttamente attraverso pesata su bilancia analitica. Per tutte le soluzioni è stato misurato il pH con pHmetro automatico (Mettler). Le diluizioni preparate ed utilizzate sono state.

- *Acido glicolico:* 70% - 50% - 35% - 25% - 12%; il pH di tutte le soluzioni è stato di 0,7
- *Acido tricloroacetico (TCA):* 50% - 30% - 20% - 10%; il pH di tutte le soluzioni è stato di 1,3
- *Acido piruvico:* 60% - 40% - 20% - 10%; il pH di tutte le soluzioni è stato di 2,4
- *Acido salicilico:* 30% - 20% - 10% - 5% - 3%; il pH di tutte le soluzioni è stato di 1,6
- *Acido mandelico:* 70% - 50% - 30% - 20%; il pH di tutte le soluzioni è stato di 3,2
- *Acido azelaico:* 20% - 10% - 5%; il pH di tutte le soluzioni è stato di 3,5

Esecuzione dei test: I test per la valutazione dell'attività battericida delle diverse soluzioni degli acidi in esame sono stati allestiti in accordo alle norme UNI-EN 1040 per la valutazione dell'attività battericida di disinfettanti ed antisettici^{25,26}, con adattamento della metodica per esecuzione in micropiastre piuttosto che in provetta.

A partenza dai ceppi batterici congelati sono state allestite 3 successive sub-colture microbiche su terreno Trypticase Soy Agar (TSA) per avere colonie pure e non più vecchie di 24 h di incubazione. Ogni ceppo batterico è stato quindi testato, dalla terza sub-coltura, con ogni singola soluzione dei diversi acidi.

Sospensione batterica: Le colonie di ogni ceppo batterico sono

state sospese in 10 mL di acqua distillata sterile per preparazioni iniettabili (Laboratori Diaco Biomedical s.p.a.) ad una torbidità di 0,5 McFarland, corrispondente a circa 1×10^8 cellule batteriche/mL. La soluzione è stata quindi trasferita in una fiasca sterile da 100 mL contenente 5g di biglie di vetro e posta in agitazione su Vortex per 3 minuti. La sospensione è stata quindi riaspirata ed un'aliquota diluita 1:100, 1:1000 e 1:10000 e quindi ognuna di queste diluizioni coltivate su TSA per la conta delle Ufc (unità formanti colonia)/mL.

Procedura del test: 10 µL di sospensione batterica sono state dispensate, con pipetta automatica calibrata multicanale, in ogni pozzetto delle micropiastre sterili con fondo a U a 96 pozzetti (Eppendorf), ad eccezione dei pozzetti utilizzati come controllo di sterilità. 90 µL delle soluzioni di acidi a diversa concentrazione sono stati dispensati in duplicato nei pozzetti con la sospensione batterica, ad eccezione dei pozzetti utilizzati come controllo di crescita, e nei pozzetti utilizzati come controllo di sterilità. Nei pozzetti utilizzati come controllo di crescita al posto della soluzione acida sono stati dispensati 90 µL di acqua distillata sterile, mentre nei pozzetti utilizzati come controllo di sterilità sono stati dispensate solo le soluzioni di acido. Ogni test è stato allestito in modo tale da potere effettuare la valutazione dell'attività battericida dopo i seguenti tempi di contatto tra le soluzioni degli acidi in esame e le sospensioni batteriche: 1 minuto, 5 minuti, 10 minuti, 15 minuti, 20 minuti, 30 minuti. Allo scadere del tempo di contatto previsto in ogni pozzetto, anche dei controlli, sono stati dispen-

sati 200 µL di soluzione sterile di sodio bicarbonato 8,4%, con azione di neutralizzante e lasciata a contatto per 5 minuti, quindi 100 µL del contenuto di ogni singolo pozzetto sono stati inoculati su piastre di TSA e Agar Sangue (le soluzioni contenenti i ceppi di *P. acnes*) e incubate in adeguata atmosfera (aria e CO₂) a 37 °C per 24 ore. Tutta la procedura descritta è stata effettuata in una stanza con temperatura controllata di 20±1 °C.

Dopo 24 ore di incubazione si è proceduta alla valutazione delle crescite microbiche e gli eventuali microrganismi sviluppati sono stati identificati con le stesse modalità di identificazione dei ceppi batterici selezionati per lo studio.

Risultati

I risultati delle prove di batteriocidia sono riportati, di seguito, per ogni singolo acido in esame. La carica batterica della soluzione di partenza era di 10⁸ ufc/mL. **Acido glicolico:** I test di batteriocidia sono stati effettuati con le seguenti concentrazioni: 70% - 50% - 35% - 25% - 12%. Non si è avuta crescita batterica fino alla concentrazione del 25% compresa, mentre alla concentrazione del 12% si è avuta una carica batterica residua di 100 u.f.c/mL di *S. aureus* e *S. epidermidis* per 14 e 17 ceppi rispettivamente, con una riduzione di un milione di volte la carica batterica di partenza. La minima concentrazione battericida (MBC) per gli stafilococchi è risultata corrispondente alla concentrazione 25%, mentre per *P. acnes* ≤12%. Tra i ceppi di *S. aureus* e *S. epidermidis* per i quali si è avuta crescita batterica alle concentrazioni del 12% di acido glicolico 6 del primo e 12 del secondo sono risultati essere meticillino-resistenti.

Acido tricloroacetico (TCA): I test di batteriocidia sono stati effettuati con le seguenti concentrazioni: 50% - 30% - 20% - 10%. Non si è avuta crescita batterica con alcuna delle concentrazioni utilizzate. La minima concentrazione battericida (MBC) è risultata corrispondente ad una concentrazione ≤10% per tutte le specie batteriche esaminate.

Acido piruvico: I test di batteriocidia sono stati effettuati con le seguenti concentrazioni: 60% - 40% - 20% - 10%. Non si è avuta crescita batterica con alcuna delle concentrazioni utilizzate. La minima concentrazione battericida (MBC) è risultata, per tutti i microrganismi in esame, la concentrazione ≤10%.

Acido salicilico: I test di batteriocidia sono stati effettuati con le seguenti concentrazioni: 25% - 30% - 20% - 10% - 5% - 3%. Non si è avuta crescita batterica fino alla concentrazione del 10% compresa, mentre alla concentrazione del 5% si è avuta una carica batterica residua, per 4 ceppi di *S. epidermidis*, di 10 ufc/mL, con una riduzione di circa dieci milione di volte la carica batterica di partenza, ed alla concentrazione del 3% una carica batterica residua di 200 ufc/mL per *S. epidermidis*, con una riduzione di circa un milione di volte la carica batterica di partenza, di 50 u.f.c/mL per 3 ceppi di *P. acnes* e di 10 ufc/mL per 2 ceppi di *S. aureus*, con una riduzione di circa dieci milione di volte la carica batterica di partenza. Tutti i ceppi di stafilococco cresciuti nelle due diverse concentrazioni sono risultati essere ceppi meticillino-resistenti. La minima concentrazione battericida (MBC) è risultata corrispondente alla concentrazione 10% per *S. epidermidis* e 5% per *S. aureus* e *P. acnes*.

Acido mandelico: I test di batteriocidia sono stati effettuati con le seguenti concentrazioni: 70% - 50% - 30% - 20%. Non si è avuta crescita batterica fino alla concentrazione del 50% compresa, mentre alla concentrazione del 30% si è avuta una carica batterica residua di 50 ufc/mL, con una riduzione di circa dieci milione di volte la carica batterica di partenza, ed alla concentrazione del 20% una carica batterica residua di 300 ufc/mL, con una riduzione di circa un milione di volte la carica batterica di partenza. La crescita batterica ad entrambe le concentrazioni si è registrata per tutte le specie e tutti i ceppi di microrganismi in esame senza significative differenze. La minima concentrazione battericida (MBC) è risultata corrispondente alla concentrazione 50% per tutti i microrganismi.

Acido azelaico: I test di batteriocidia sono stati effettuati con le seguenti concentrazioni: 20% - 10% - 5%. Non si è avuta crescita batterica fino alla concentrazione del 20% compresa, mentre alla concentrazione del 10% si è avuta una carica batterica residua media di 150 ufc/mL dei ceppi di *S. aureus* ed *S. epidermidis*, con una riduzione di circa dieci milione di volte la carica batterica di partenza. 16 dei 20 ceppi di *S. aureus* e 18 dei 20 ceppi di *S. epidermidis* sono cresciuti alla concentrazione del 10%, mentre non si è registrata crescita di *P. acnes*. Alla concentrazione del 5% una carica batterica residua di 2000 ufc/mL è stata rilevata per entrambe le specie stafilococciche, tutti i ceppi hanno presentato crescita, con una riduzione di circa un milione di volte la carica batterica di partenza, mentre per *P. acnes* si è avuta una crescita di circa 200 colonie in 11 ceppi in

esame. La minima concentrazione battericida (MBC) è risultata corrispondente alla concentrazione del 20% per gli stafilococchi e del 5% per *P. acnes*.

Conclusioni

Tra le malattie dermatologiche l'acne è sicuramente una delle più diffuse e frequenti. Almeno il 50% delle persone tra i 13 e i 30 anni, adolescenti e giovani adulti, soffre di questa dermatosi in forma lieve, moderata o grave. Prendendo in considerazione la sola presenza sulla cute di comedoni o di papule e pustole transitorie, l'acne in forma lieve colpisce il 90% dei giovani di molte razze umane. Le lesioni caratteristiche dell'acne sono i comedoni, le papule, i noduli, le pustole, le cisti, fino agli esiti cicatriziali. Il comedone è un accumulo di materiale sebaceo e cheratinico, denso compatto e corneo, nell'infundibulo del follicolo pilosebaceo verso il dotto della ghiandola sebacea, che causa ipercheratinizzazione del follicolo. Questo è il primo evento che mantiene e fa progredire l'acne alle altre fasi e che va combattuto. Con il verificarsi della rottura della parete del comedone e la fuoriuscita del materiale sebaceo, si instaurano i ben noti fenomeni infiammatori, dapprima solo perifollicolari che causano la formazione delle papule, poi con la loro diffusione più in profondità al derma superficiale e medio, compaio-

no i noduli e, successivamente, le raccolte di essudato purulento delle pustole, fino alla confluenza di materiale sebaceo e purulento con la formazioni di cisti. Gli esiti cicatriziali di minore entità si hanno per le lesioni comedoniche, mentre per quelle con flogosi intensa e profonda gli esiti possono essere cicatrici permanenti e con aspetti diversi, in genere depressioni con contorni irregolari, tipo crateriforme, talora anche deturpanti, tipo cicatrici retraenti con epidermide assottigliata e assenza di annessi cutanei. Il peeling è una metodica che impiega sostanze chimiche la cui azione di rimozione degli strati più superficiali dell'epidermide è frequentemente utilizzata come terapia di supporto nel trattamento dell'acne. L'azione dei peeling si svolge su tre fronti: effetto cheratolitico per ridurre l'ipercheratosi follicolare, azione antinfiammatoria e antibatterica.

I batteri svolgono un ruolo importante per lo sviluppo dell'acne. Le principali specie batteriche associate con l'acne sono: *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis* e, in misura minore, *Staphylococcus aureus*. Questi microrganismi sono normali residenti della pelle e dei follicoli piliferi, l'alterato ambiente che si crea all'interno del follicolo pilifero facilita la loro crescita massiva e la riduzione del numero di batteri può ridurre una serie di fattori fisiopatogenetici coinvolti nella genesi dell'acne.

Il lavoro svolto ha confermato l'attività antibatterica svolta dagli acidi che sono utilizzati nel trattamento delle varie forme di acne. Abbiamo valutato la capacità battericida di: acido glicolico, acido tricloroacetico, acido salicilico, acido piruvico, acido azelaico e acido mandelico.

L'acido tricloroacetico e l'acido piruvico hanno presentato una attività battericida forte a tutte le concentrazioni utilizzate nei test. Ottima è stata anche l'attività battericida dell'acido glicolico, mentre l'acido azelaico ha presentato una capacità di batteriocidia ottimale, a basse concentrazioni, per *P. acnes*, nettamente inferiore, invece è risultata la batteriocidia nei confronti degli stafilococchi. L'acido mandelico è stato l'acido con la minore attività battericida verso tutti i microrganismi testati, ma questo è confermato dalla letteratura che evidenzia per questa sostanza una forte attività batteriostatica piuttosto che battericida.

I ceppi di stafilococco meticillino-resistenti si sono dimostrati, come da attese, i microrganismi più resistenti anche nei confronti dell'attività degli acidi in esame, a parte l'acido tricloroacetico e piruvico.

I risultati ottenuti confermano, *in vitro*, l'utilità dell'uso dei peeling chimici nel trattamento dell'acne, dimostrando, in particolare per alcuni di essi, la forte attività antibatterica esplicata come batteriocidia. **TiM**

Bibliografia

1. Ballanger F, Baudry P, N'Guyen JM, et al. Heredity: A Prognostic Factor for Acne. *Dermatology* 2006; 212:145-149.
2. Brody HJ. Chemical peeling and Resurfacing, 1997.

3. Brody HJ, Hailey CW. Medium-depth chemical peeling of the skin: a variation of superficial chemosurgery. *J Dermatol Surg Oncol* 1986; 12:1268-1275.
4. Burke BM, Cunliffe WJ. The assessment of acne vulgaris - the

Leeds technique. *Br J Dermatol* 1984; 111:83-92.

5. Burkhart CG, Burkhart CN, Lehmann PF. Acne: a review of immunologic and microbiologic factors. *Postgrad Med J* 1999; 75: 328-331.

6. **Caputo R, Monti M.** Manuale di dermocosmetologia medica. Pp 919-945 Raffaello Cortina Editore, 1995.
7. **Cordain L, Lindeberg S, Hurtado M, et al.** Acne vulgaris: a disease of Western civilization. *Arch Dermatol* 2002; 138:1584-1590.
8. **Cunliffe WJ, Holland DB, Clark SM, et al.** Comedogenesis: some new aetiological, clinical and therapeutic strategies. *Br J Dermatol* 2000; 142:1084-1091.
9. **Cotellessa C, Peris K, Onorati MT, et al.** The use of chemical peelings in the treatment of different cutaneous hyperpigmentation. *J Dermatol Surg* 1999; 25:450-454.
10. **Downing DT, Stewart ME, Wertz PW, et al.** Essential fatty acids and acne. *J Am Acad Dermatol* 1986; 14:221-225.
11. **Ellis JA, Stebbing M, Harrap SB.** Polymorphism of the androgen receptor gene is associated with male pattern baldness. *J Invest Dermatol* 2001; 116:452-455.
12. **Gollnick H, Cunliffe W, Berson D, et al.** Management of acne. *J Am Acad Dermatol* 2003; 49 (Suppl 1): S1-S37.
13. **Griffin TD, Van Scott EJ.** Improvement of photodamaged skin with alpha-hydroxyacids (AHA): a clinical, histological and ultrastructural study. Congress of Vienna "Dermatology 2000"-Comm 331 p.175, maggio 1993.
14. **Holland KT, Aldana O, Bojar RA, et al.** Propionibacterium acnes and acne. *Dermatology* 1998; 196:67-68.
15. **Imperato-McGinley J, Gautier T, Cai LQ, et al.** The androgen control of sebum production. Studies of subjects with dihydrotestosterone deficiency and complete androgen insensitivity. *J Clin Endocrinol Metabol* 1993; 76:524-528.
16. **Ingham E, Walters CE, Eady EA, et al.** Inflammation in acne vulgaris: failure of skin microorganisms to modulate keratinocyte interleukin 1 α production in vitro. *Dermatology* 1998; 196:86-88.
17. **Kim J, Ochoa MT, Krutzyk SR, et al.** Activation of toll-like receptor 2 in acne triggers inflammatory cytokine responses. *J Immunol* 2002; 169:1535-1541.
18. **Leyden JJ.** New understandings of the pathogenesis of acne. *J Am Acad Dermatol* 1995; 32: 15-25.
19. **Makram M. Al Waiz.** Medium-Depth Chemical Peels in the Treatment of Acne Scars in Dark-Skinned Individuals. *J Dermatol Surg* 2002; 28:383-387.
20. **Oberemok SS, Salita AR.** Acne vulgaris, I: pathogenesis and diagnosis. *Cutis* 2002; 70:101-105.
21. **Schafer T, Nienhaus A, Vieluf D, et al.** Epidemiology of acne in the general population: the risk of smoking. *Br J Dermatol* 2001; 145:100-104.
22. **Stewart ME, Downing DT, Cook JS, et al.** Sebaceous gland activity and serum dehydroepiandrosterone sulphate levels in boys and girls. *Arch Dermatol* 1992; 128:1345-1348.
23. **Thiboutot D, Gilliland K, Light J, et al.** Androgen metabolism in sebaceous glands from subjects with and without acne. *Arch Dermatol* 1999; 135:1041-1045.
24. **Thiboutot D.** Hormones and acne: pathophysiology, clinical evaluation, and therapies. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery* 2001; 20:144-153.
25. **UNI - EN 1040** Chemical disinfectants and antiseptics - Basic bactericidal activity - Test method and requirements (phase 1). CEN 1997.
26. **UNI - EN 1276** Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas - Test method and requirements (phase 2, step 1). CEN 1997.
27. **White MG.** Recent findings in the epidemiologic evidence, classification, and subtypes of acne vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 1998; 39:S34-S37.

Microbiology and **Virology**

Sul prossimo numero



Outbreak da *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente in un reparto di chirurgia vascolare

C. Scarparo, A. Sartor, L. Fanin, L. Lirussi, M. Fiorno