



**UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE**

**FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA**

Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia

**EFFICACIA DELLA TIGECICLINA  
NELLA GUARIGIONE DELLE USTIONI  
INFETTATE DA STAFILOCOCCO AUREO  
METICILLINO-RESISTENTE**

Relatore:

**Chiar.ma Prof.ssa Anna Maria Offidani**

Tesi di Laurea di:

**Edoardo De Simoni**

Correlatore:

**Chiar.ma Dott.ssa Oriana Simonetti**

A.A. 2019-2020

# INDICE

## Introduzione

## Capitolo 1

### *Ustioni*

1. Definizione
2. Epidemiologia
3. Classificazione delle ustioni
- 4.eziopatogenesi
5. Fisiopatologia delle ustioni e delle loro complicanze
  - a. *Danno e risposta infiammatoria locale*
  - b. *Shock e alterazioni emodinamiche*
  - c. *Stato ipermetabolico*
  - d. *Disregolazione della risposta immunitaria e infezioni*
  - e. *Altre complicanze d'organo*
  - f. *Lesioni da trauma*
6. Clinica e diagnosi: *initial assessment e triage*
  - a. *Primary e secondary survey*
  - b. *Valutazione della gravità di una lesione da ustione*
7. Terapia
  - a. *Fase I: initial assessment e triage*
  - b. *Fase II: rianimazione*
  - c. *Fase III: copertura della ferita da ustioni*
  - d. *Fase IV: terapia di supporto*
  - e. *Fase V: riabilitazione*
8. Qualità della vita
9. Prospettive future

## **Capitolo 2**

*Lo studio: efficacia della tigeciclina nella guarigione delle ustioni infettate da stafilococco aureo meticillino-resistente.*

1. Introduzione
2. Metodi
  - a. *Organismi e animali*
  - b. *Farmaci e determinazione della MIC*
  - c. *Preparazione degli inoculi*
  - d. *Protocollo sperimentale*
  - e. *Escissione di biopsie cutanee*
  - f. *Valutazione istologica*
  - g. *Immunoistochimica*
  - h. *Analisi statistica*
3. Risultati
  - a. *Coltura quantitativa dei tessuti asportati*
  - b. *Esame istologico dei tessuti asportati*
  - c. *Valutazioni immunoistologiche*
4. Discussione
5. Conclusioni

## **Bibliografia**

## Introduzione

Un'ustione è un'alterazione indotta da un agente lesivo posto a contatto con un tessuto vivente, per un tempo sufficientemente lungo a produrre un danno tissutale. Essa rappresenta il quarto tipo di trauma più comune al mondo.

La fisiopatologia delle ustioni è complessa: sebbene siano state identificate differenti fasi della risposta dell'ospite a una lesione da ustioni, non è ancora ben compreso come e in quale sequenza questi momenti interagiscano tra di loro. Certo è che gli agenti lesivi (termici, fisici, chimici o elettrici) innescano una risposta infiammatoria prima locale e poi sistemica che è responsabile del danno, e a cui segue il processo di guarigione.

La diagnosi di ustione è ispettiva. Esistono diversi sistemi di classificazione delle ustioni, che valutano la profondità della lesione e la sua estensione: essi guidano l'iter terapeutico.

La terapia delle ustioni include la terapia rianimatoria e di supporto, con fluidoterapia personalizzata, la terapia medica, con antibiotici a uso topico, e la terapia chirurgica, con debridement del tessuto ustionato e necrotico a cui può seguire l'utilizzo di innesti di cute autologa o eterologa, e infine la riabilitazione.

Anche dopo una buona terapia si possono presentare complicanze come cicatrici ipertrofiche e cheloidi a livello locale e disfunzione multiorgano a livello sistemico; occorre anche considerare l'impatto significativo che gli esiti di una ferita da ustione hanno sulla qualità della vita, dal punto di vista fisico e mentale.

L'obiettivo della attuale e futura ricerca in campo medico è perfezionare la gestione di una ferita da ustioni soprattutto a lungo termine; per esempio sul piano del trattamento occorre individuare farmaci che facilitino la guarigione della ferita da ustione e ne favoriscano la *restitutio ad integrum* funzionale ed estetica. In questo solco si inserisce lo studio sperimentale oggetto di questa tesi, che esplora *in vivo* su modelli murini l'efficacia della tige ciclina nel trattamento delle ferite da ustioni infette con *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA).

## **Capitolo 1**

### *Ustioni*

#### **1. Definizione**

Si definisce “ustione” un’alterazione indotta da un agente lesivo posto a contatto con un tessuto vivente, per un tempo sufficientemente lungo a produrre un danno tissutale (Nguyen 2020).

Gli agenti lesivi possono essere termici (fiamma, liquidi o solidi caldi, vapore), fisici (corrente, radiazioni elettromagnetiche) o chimici (alcali come idrossidi o carbonati, acidi, agenti organici come solventi) (Jeschke 2020).

Il chirurgo plastico e il dermatologo si configurano come specialisti di riferimento nella gestione acuta e cronica del paziente ustionato, che può presentare conseguenze meramente locali oppure generalizzate e sistemiche, sino a delineare talora un quadro che si configura come “malattia da ustione”.

Le lesioni da ustioni sono per la maggior parte lievi e non richiedono trattamenti o possono essere curate da qualsiasi operatore sanitario; invece le lesioni gravi vengono trasferite e trattate nei Centri Ustioni: ma anche in questi casi la prognosi migliora se si fornisce un trattamento iniziale rapido e adeguato (Greenhalgh 2019).

#### **2. Epidemiologia**

Le ustioni rappresentano il quarto tipo di trauma più comune al mondo, dopo gli infortuni stradali, le cadute e i trami da violenza interpersonale (Norton 2013, GBD 2015). Causano cicatrici fisiche e psicologiche, influenzando la qualità della vita, la capacità di tornare al lavoro e la successiva mortalità.

Circa 11 milioni di persone in tutto il mondo hanno cercato assistenza medica per le ustioni nel 2004: tra queste è emerso che il rischio di ustioni tende ad aumentare con la riduzione dello stato socioeconomico e che il 90% delle ustioni si verifica in Paesi a basso o medio reddito (WHO 2018).

Ad esempio, il numero di decessi correlati alle ustioni per 100.000 abitanti varia da 14,53 in Costa d'Avorio a 0,02 a Malta; e i decessi dei bambini dovuti a ustioni sono 7-11 volte più alti nei Paesi a basso reddito che in quelli ad alto reddito (Peck 2013).

Secondo il *Burn incidence fact sheet* dell'*American Burn Association* (ABA) nel 2016 sono stati circa 486.000 gli abitanti statunitensi che si sono rivolti al Sistema Sanitario a causa delle ustioni; di questi sono stati ricoverati 40.000, 30.000 dei quali in un centro ustioni.

Negli Stati Uniti si osserva una distribuzione in età bimodale di tutte le lesioni da ustioni, con un primo picco nei bambini piccoli (1–15,9 anni), in cui si riscontra la maggior parte delle lesioni, ovvero il 55% e un secondo nei pazienti in età lavorativa (20–59 anni), che si attesta attorno al 24% (American Burn Association 2019).

Indipendentemente dal Paese, nei bambini le ustioni sono più equamente distribuite tra ragazzi e ragazze, specialmente nei più piccoli (Greenhalgh 2019). Tuttavia, questo rapporto cambia con l'aumentare dell'età: infatti, nella maggior parte dei Paesi, l'incidenza è quasi il doppio negli uomini rispetto alle donne. Un'eccezione a questa tendenza è stata rilevata in Ghana e India, dove tra le donne il tasso di incidenza e di mortalità è fino a tre volte maggiore rispetto agli uomini (Bayuo 2018, Sanghavi 2009).

L'*American Burn Association National Burn Repository 2019* riporta che negli Stati Uniti, nel complesso, le lesioni da ustione sono causate da: fiamma (41%), scottature (31%), agenti chimici (3,5%), energia elettrica (3,6%). La causa più comune tra i pazienti di età superiore ai 5 anni è l'esposizione alle fiamme, invece nei bambini di età inferiore ai 5 anni sono più comuni le ustioni da scottatura.

Il 75% delle ustioni si verifica a casa, il 13% si verifica a lavoro; per quanto riguarda le cause, circa il 95% delle ustioni è accidentale, il 2% è legato ad abusi e l'1% è autoinflitto (American Burn Association 2019).

Inoltre, sempre da questo report, emerge che il 67% delle ustioni è di piccole dimensioni, e occupa meno del 10% della totale superficie corporea, e che la dimensione media delle ustioni è diminuita, soprattutto nei Paesi ad alto reddito, ma nonostante queste statistiche incoraggianti, si verificano ancora grandi ustioni.

Per quanto riguarda la mortalità, negli Stati Uniti, l'ABA nel 2016 ha riportato 3275 decessi correlati a ustioni e inalazione di fumo, di cui 2745 derivanti da incendi residenziali, 310 da incendi relativi a incidenti stradali e 220 da altre cause.

Il numero totale stimato di decessi all'anno in tutti i Paesi a basso e medio reddito è di 180.000 abitanti (Peck 2013). I tassi di mortalità aumentano con l'aumentare delle dimensioni e della profondità dell'ustione, dell'età avanzata e dell'inalazione di fumo (Taylor 2015).

In conclusione, a seconda del *setting*, in alcuni soggetti più vulnerabili le ustioni sono più frequenti, come nei pazienti epilettici (Atwell 2019), e quasi tutte le ustioni sono prevenibili e si sono rivelate altamente efficaci misure semplici come l'installazione di rilevatori di fumo (Greenhalgh 2019).

### 3. Classificazione delle ustioni

Esistono diversi sistemi di classificazione delle ustioni, che prendono in considerazione la profondità della lesione e la sua estensione (Jeschke 2020, Dionigi 2017).

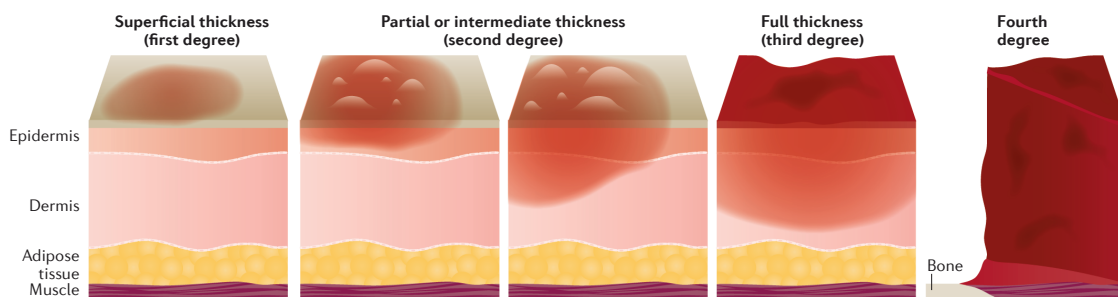
A seconda della profondità, ovvero degli strati di cute e sottocute interessati, si suddividono le ustioni in quattro gradi:

- **ustione di I grado:** interessa l'epidermide ed è rappresentata da un intenso eritema cutaneo dolente e dolorabile legato ai fenomeni vasoattivi scatenati dal trauma. Istologicamente si osservano alterazioni epiteliali a carico degli elementi più superficiali dell'epidermide quali eosinofilia citoplasmatica, picnosi nucleare e congestione vascolare;
- **ustione di II grado:** assume differenti aspetti a seconda della profondità e può essere distinta in superficiale e profonda.
  - L'ustione di II grado superficiale si estende fino al derma superficiale ed è caratterizzata da un roseo eritema e da un flittene, una bolla patognomica delle ustioni di II grado superficiali di dimensioni variabili e contenente un essudato ricco in proteine, formata a causa del distacco dell'epidermide e del derma papillare necrotico dai piani più profondi. Microscopicamente le fibre collagene appaiono frammentate e ri-

gonfie, il derma papillare è necrotico, e attorno ai vasi del derma reticolare compaiono caratteristici infiltrati cellulari di natura flogistica. Si tratta di ustioni estremamente dolorose in quanto si ha l'esposizione delle terminazioni nervose a livello del derma medio e superficiale.

- L'ustione di II grado profondo si estende più in profondità nel derma e si presenta solitamente come un'area di colore biancastro-purpureo. L'epidermide appare omogeneizzata, il derma papillare è distrutto, così come parte di quello reticolare, minime sono invece le reazioni flogistiche perivascolari. E' generalmente poco dolente perché le terminazioni sensitive dermiche vengono distrutte; con l'aumentare dello spessore coinvolto aumenta il rischio di infezione e di cicatrizzazione;
- **ustione di III grado:** interessa la cute a tutto spessore e presenta un colore differente a seconda del tipo di agente ustionante e della sua temperatura. E' caratterizzata dalla formazione di un'escara, lesione patognomonica, che può assumere un aspetto di gangrena secca nella maggioranza dei casi. Da un punto di vista istologico si ha la distruzione di tutta la componente cutanea (tutto spessore) e non è in genere dolorosa a causa di danni alle terminazioni nervose;
- **ustione di IV grado:** si estende ai tessuti sottocutanei più profondi, come muscoli, tendini o ossa, che possono subire perdita di sostanza e carbonizzazione.

I principali aspetti istologici sono: l'omogeneizzazione epidermica e degli annessi cutanei, la necrosi profonda e la trombosi dei vasi sanguigni. E' un'ustione caratterizzata da un quadro clinico molto variabile, che dal punto di vista locale non è in grado di tornare spontaneamente a una *restitutio ad integrum*.



**Fig. 1.** Classificazione delle ustioni a seconda della profondità (da Jeschke 2020, Nature).

Un altro sistema di classificazione, da integrare al precedente, prende in considerazione l'estensione dell'ustione sulla superficie corporea totale (TBSA) e identifica le ustioni come minori o maggiori; per i criteri di quantificazione dell'estensioni si veda dopo.

Un'ustione minore generalmente si estende a meno del 10% della TBSA (ed è soprattutto superficiale per profondità). Al contrario, le dimensioni di un'ustione maggiore non sono ben definite in quanto occorre considerare l'età: deve essere interessato più del 10% della TBSA nei pazienti anziani, più del 20% della TBSA negli adulti e più del 30% di TBSA nei bambini per poter parlare di ustione maggiore.

Oltre alle lesioni cutanee, le ustioni possono essere accompagnate da inalazione di fumo o traumi fisici ad altri organi: bisogna considerare anche queste lesioni per definire correttamente la gravità di un'ustione.

#### **4. Eziopatogenesi**

Come accennato, gli agenti lesivi di un'ustione possono essere termici (fiamma, liquidi o solidi caldi, vapore), fisici (corrente, radiazioni elettromagnetiche) o chimici (alcali come idrossidi o carbonati, acidi, agenti organici come solventi) (Jeschke 2020).

I principali agenti, per frequenza, sono quelli termici e in particolare la fiamma e i liquidi bollenti. Le lesioni termiche possono verificarsi anche a freddo: il congelamento innesca una serie di meccanismi tra cui il danno cellulare diretto dovuto alla cristallizzazione dell'acqua nei tessuti e il danno indiretto da ischemia (secondaria alla vasoparalisi da freddo) e riperfusione. Questi meccanismi causano non solo necrosi cutanea ma anche danni ai tessuti profondi.

Gli agenti chimici causano causticazioni, che possono interessare la cute ma anche gli organi interni; le principali vie di ingresso nell'organismo degli agenti chimici sono l'inalazione, l'ingestione e il contatto con cute e mucose. Le sostanze di uso più frequente sono gli acidi e le basi forti (acido cloridrico, idrossido di sodio), usati nei laboratori come diluenti e conservanti, gli acidi organici (acido formico, acido acetico), usati per allestire preparati, gli aldeidi e i chetoni (come la formaldeide, il principale fissativo usato in anatomia patologica), gli alcoli, gli eteri, gli idrocarburi, usati come solventi. Da un punto di vista istologico, i prodotti chimici alcalini causa-

no una necrosi colliquativa, per cui il tessuto viene trasformato in una massa liquida e viscosa, mentre gli agenti acidi provocano una necrosi coagulativa, in cui l'architettura del tessuto necrotico può essere preservata (Jeschke 2020).

Le ustioni da energia elettrica sono completamente diverse perché possono causare danni ai tessuti profondi di maggiore entità rispetto alla lesione cutanea visibile; il danno tissutale in queste lesioni è correlato al percorso seguito dalla corrente all'interno dell'organismo, al tipo di corrente, e, soprattutto, all'intensità del campo elettrico espressa in Ampere, sebbene per descrivere la corrente che ha causato la lesione si utilizzi spesso la tensione espressa in Volt (Lee 1997). L'energia elettrica causa quasi sempre ustioni di terzo grado, soprattutto in soggetti a rischio (es. chi lavora con energia elettrica ad alta tensione).

E' importante identificare l'agente causale di una lesione da ustioni, perché da esso dipende l'approccio terapeutico.

## **5. Fisiopatologia delle ustioni e delle loro complicanze**

Dopo l'infortunio, viene innescata subito una risposta di stress sistemico e locale che, a differenza della sepsi o di un trauma, non regredisce rapidamente; basti pensare che gravi ustioni determinano una risposta molto complessa e articolata che può durare fino a diversi anni dopo l'insulto iniziale (Greenhalgh 2019).

In generale, immediatamente dopo l'insulto, si attiva una risposta infiammatoria per promuovere il processo di guarigione, inizialmente simile a quella innescata da traumi o interventi di chirurgia maggiore, utile per avviare la riparazione dei tessuti e la guarigione delle ferite.

Tuttavia, nelle gravi ustioni, questo processo infiammatorio può essere esteso e incontrollato, e invece di portare alla guarigione provoca uno stato catabolico generalizzato che paradossalmente ritarda la guarigione. Questa risposta disregolata, sostenuta da alti livelli di citochine, chemochine, proteine della fase acuta, e dal tono ortosimpatico, viene definita risposta ipermetabolica: è associata ad aumento del catabolismo, amplificazione del danno ai tessuti del paziente, aumento dell'incidenza di insufficienza d'organo, infezioni e morte (Jeschke 2008, Guillory 2016).

Si ricorda inoltre che, dopo gravi ustioni, la cascata infiammatoria può essere innescata più volte durante l'iter terapeutico dopo la rianimazione iniziale, ad esempio durante un intervento di chirurgia ricostruttiva o da successive complicanze infettive (Osuka 2014).

Sono numerosi i fattori che contribuiscono a definire l'entità della risposta dell'ospite: la gravità dell'ustione (percentuale di TBSA e profondità dell'ustione), la causa dell'ustione, la temperatura raggiunta dai tessuti, il tempo di esposizione all'agente lesivo, la presenza di una lesione da inalazione concomitante o di altre lesioni traumatiche, l'esposizione a tossine; bisogna considerare anche i fattori correlati al paziente come età, comorbidità, intossicazione da droghe o alcol, e i tempi di arrivo al pronto soccorso.

La fisiopatologia delle ustioni è complessa: sebbene siano stati identificati vari momenti della risposta dell'ospite a una lesione da ustioni, non è ancora ben compreso come e in quale sequenza questi momenti interagiscano tra di loro. La trattazione verterà sulla descrizione dei meccanismi del danno iniziale e locale, e dell'estensione sistemica della risposta infiammatoria a organi e apparati.

#### *a. Danno e risposta infiammatoria locale*

In condizioni fisiologiche, i tegumenti sono in grado – grazie alla protezione di diversi mezzi omeostatici (circolazione del sangue, strato corneo, secrezione sebacea, contenuto tissutale di acqua) – di resistere a temperature sino a 44°C anche per periodi prolungati. A temperature superiori a 40°C si hanno denaturazione proteica e delle membrane cellulari, attivazione di enzimi lisosomiali rilasciati dalle membrane lesionate, perdita di funzione delle pompe Na/K e conseguente riduzione di ATP. Oltre 44°C si ha necrosi cellulare, sino ad arrivare a coagulazione massiva delle proteine tissutali (Dionigi 2017).

In risposta allo stimolo lesivo vengono rilasciate sostanze vasoattive che aumentano la permeabilità vascolare e sono responsabili della formazione di un'area edematosa. L'edema locale raggiunge la massima estensione in 12-24 ore, compromette l'afflusso vascolare e determina un quadro ipossico-ischemico che impedisce l'apporto di ossigeno e nutrienti, favorendo così la perma-

nenza *in situ* di tossici e sostanze ad azione lesiva (di conseguenza a parità di temperatura e durata di esposizione, è la quantità della sostanza ustionante a determinare la gravità della lesione).

In conclusione, questi meccanismi determinano la formazione di tre zone in cui può essere divisa la ferita da ustione:

- la **zona di coagulazione**, centrale, caratterizzata dalla presenza di un'escara formata dalla coagulazione massiva delle proteine tissutali e da tessuto necrotico,
- la **zona di stasi o di ischemia**, caratterizzata da una ridotta perfusione per vasocostrizione del microcircolo: può diventare necrotica ma è potenzialmente salvabile;
- la **zona di iperemia**: è la regione più esterna della ferita, caratterizzata da vasodilatazione mediata da sostanze vasoattive rilasciate in risposta allo stimolo infiammatorio.

Infine, si ha un'area edematosa circostante la zona ustionata sostenuta da un aumento di permeabilità vascolare.

Il grado di danno cellulare è variabile a seconda della zona e del tempo trascorso dall'esposizione all'agente lesivo: basti pensare che nelle prime 24 ore prevalgono i meccanismi di autofagia, e che nelle 24-48 ore successive quelli di apoptosi (Jeschke 2020).

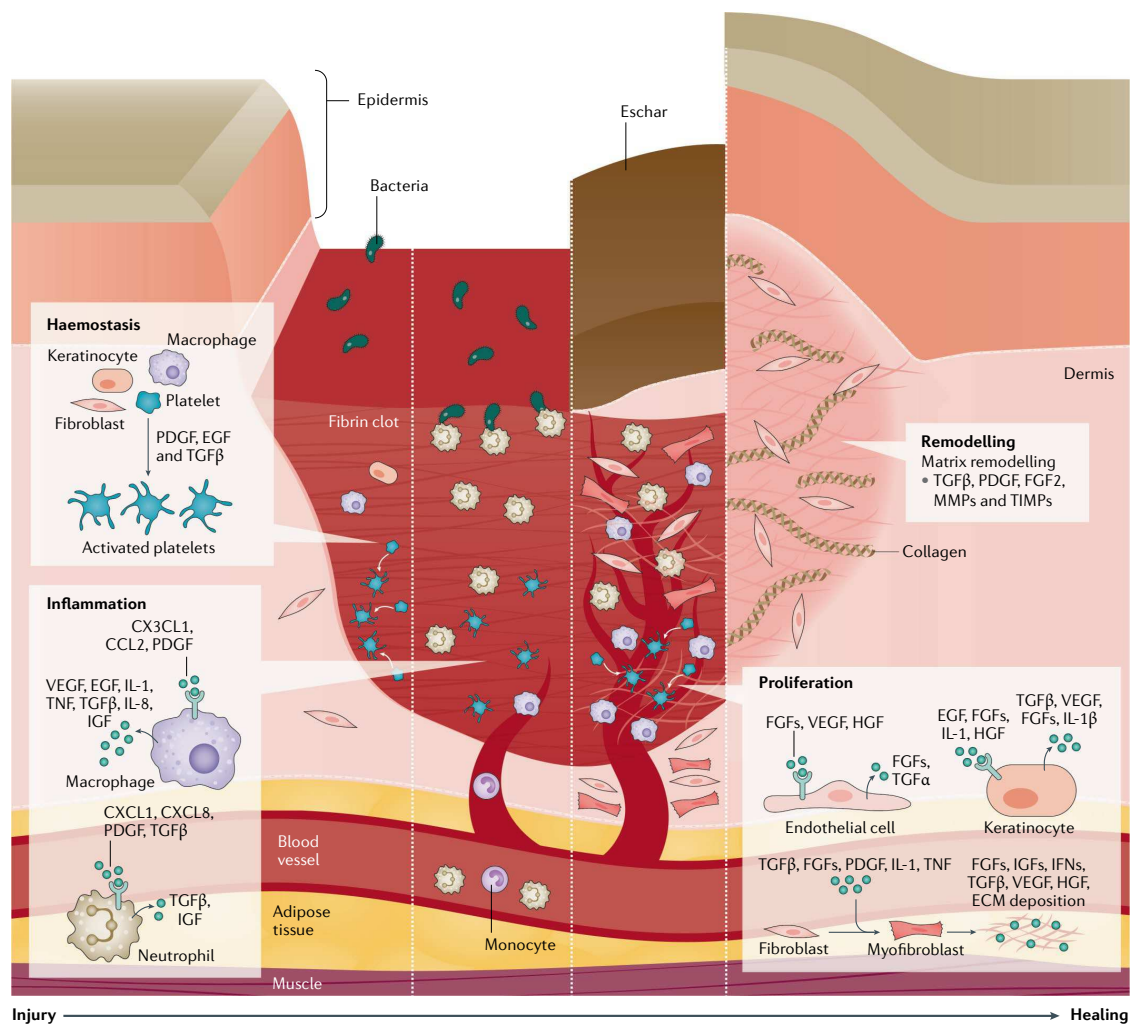
La risposta infiammatoria, che si estrinseca dopo la vasodilatazione con l'arrivo nel tessuto lesso di neutrofili e monociti, serve naturalmente a degradare il tessuto necrotico e ad attivare i segnali necessari per la riparazione della ferita, che rappresenta la fase finale di risposta allo stimolo lesivo. Nel dettaglio, a seguito della risposta infiammatoria, citochine e fattori di crescita attivano cheratinociti e fibroblasti, nel tentativo di ripristinare la perfusione vascolare e promuovere la guarigione delle ferite: le cellule epiteliali dello strato basale presenti lungo i bordi della ferita migrano in direzione centripeta dopo aver perso l'inibizione da contatto; se non ci sono annessi cutanei, la migrazione epiteliale si interrompe dopo 1-2 cm, invece in presenza di annessi cutanei, i cheratinociti sono stimolati a migrare in superficie e a riaffiorare sulla ferita: questo è il motivo per cui le aree con maggiore densità di annessi, come il cuoio capelluto, guariscono più velocemente e hanno una minore probabilità di sviluppare cicatrici ipertrofiche.

Al termine di questo processo si verifica il rimodellamento della ferita, mediante deposizione di collagene ed elastina, e trasformazione dei fibroblasti in miofibroblasti. Alcuni ricercatori hanno

ipotizzato che la guarigione ottimale dipenda da un adeguato "pool" di cellule del midollo osseo e dall'equilibrio tra mediatori pro-infiammatori e anti-infiammatori (Muthu 2008).

In generale, la complessa risposta di guarigione è mirata alla rigenerazione cutanea ed epidermica e ha l'obiettivo di ripristinare la chiusura della barriera cutanea, nonché la flessibilità e la funzionalità della pelle.

Nel tempo, sarà il delicato equilibrio tra la contrazione di miofibroblasti e la riepitelizzazione a determinare la qualità e l'elasticità della ferita riparata e l'estensione della cicatrice (Rowan 2015); infatti il processo di riparazione non sempre è fisiologico: le ferite possono guarire con cicatrici anomale che sono caratteristicamente attive, rosse, pruriginose, dolorose e deturpanti - definite cicatrici ipertrofiche o cheloidi.



**Fig. 2.** Meccanismi di risposta infiammatoria locale in fase iniziale e durante la fase di riparazione dei tessuti (da Jeschke 2020, Nature).

*b. Shock da ustione e alterazioni emodinamiche*

Le citochine e i mediatori dell'inflammazione rilasciati a livello locale e gli ormoni dello stress, come le catecolamine e i glucocorticoidi, hanno anche effetti sistemici: determinano alterazioni emodinamiche e biochimiche (di entità variabile a seconda della gravità dell'ustione), che si manifestano durante le prime 48-72 ore con una complessa sindrome morbosa a cui si dà il nome di shock da ustione.

Nella fase iniziale dello shock da ustione, l'immissione in circolo dei mediatori della flogosi determina in un primo momento vasocostrizione arteriolare periferica, ischemia del letto capillare, ipossia tissutale e acidosi metabolica, e, successivamente, l'apertura di shunt arterovenosi e la paralisi degli sfinteri precapillari.

In questa seconda fase le venule postcapillari rimangono contratte, con conseguente aumento della pressione idrostatica e passaggio di micro- e macromolecole nell'interstizio: tale espansione dello spazio vascolare viene amplificata a circolo vizioso dall'attivazione delle cascate degli enzimi proteolitici (coagulazione, fibrinolisi, chinine e sistema del complemento), responsabili dell'aumento dell'edema e anche dello stato ipermetabolico (v. dopo).

Oltre alla disregolazione del distretto pre-capillare e post-capillare, il danno si estende anche ai capillari stessi a causa: 1) dell'edema interstiziale, che peggiora l'occlusione dei capillari, 2) dello stress ossidativo, che determina rarefazione capillare, e 3) dell'aumento dei livelli di ossido nitrico e mediatori infiammatori, che concorrono al danno dell'endotelio vascolare.

Queste alterazioni sistemiche del microcircolo hanno un impatto emodinamico: l'imponente perdita di liquidi e proteine in parte all'esterno e in parte nello spazio interstiziale è causa di uno shock ipovolemico con emoconcentrazione (Rae 2016).

In risposta all'ipotensione, si osserva, come meccanismo di compenso, una vasocostrizione dei distretti periferici, nel tentativo di assicurare un'adeguata perfusione dei parenchimi nobili, cuore e cervello in particolare. Esauriti i meccanismi di compenso, nei tessuti ipoperfusi si aggrava l'ipossia, che determina liberazione di enzimi proteolitici e quindi una vasodilatazione periferica che, sottraendo sangue ai distretti nobili, sostiene il circolo vizioso e favorisce lo scompenso di altri organi.

Il rene è tra gli organi che risentono maggiormente dell'ipovolemia e può andare incontro a un'insufficienza renale, immediata o tardiva (circa 2 settimane dopo il trauma), multifattoriale, per l'eccesso di emoglobina libera, l'aumento della degradazione dei globuli rossi con danno ostruttivo tubulare, il ridotto flusso ematico da ipovolemia, la vasocostrizione arteriosa e l'attivazione massiva del sistema renina angiotensina aldosterone.

A livello cardiaco si possono osservare: una caduta della gittata cardiaca secondaria a riduzione del precarico (ipovolemia), e un danno cellulare causato dallo stress ossidativo e dai mediatori della flogosi (come IL-6 e TNF), che esita in apoptosi e necrosi dei cardiomiociti; da un punto di vista emodinamico questo danno concorre alla diminuzione della frazione di eiezione e all'insorgenza dello scompenso cardiaco (Nielson 2017).

In conclusione, la diminuzione della funzione cardiaca autoalimenta lo shock ipovolemico e determina un peggioramento dell'ipoperfusione di organi e tessuti, inclusi il polmone, il fegato e il tratto gastrointestinale, e quindi favorisce l'instaurarsi di quadri di insufficienza multiorgano. Lo stato di shock continua e si autoalimenta finché non viene corretta l'ipovolemia (Rae 2016).

### *c. Stato ipermetabolico*

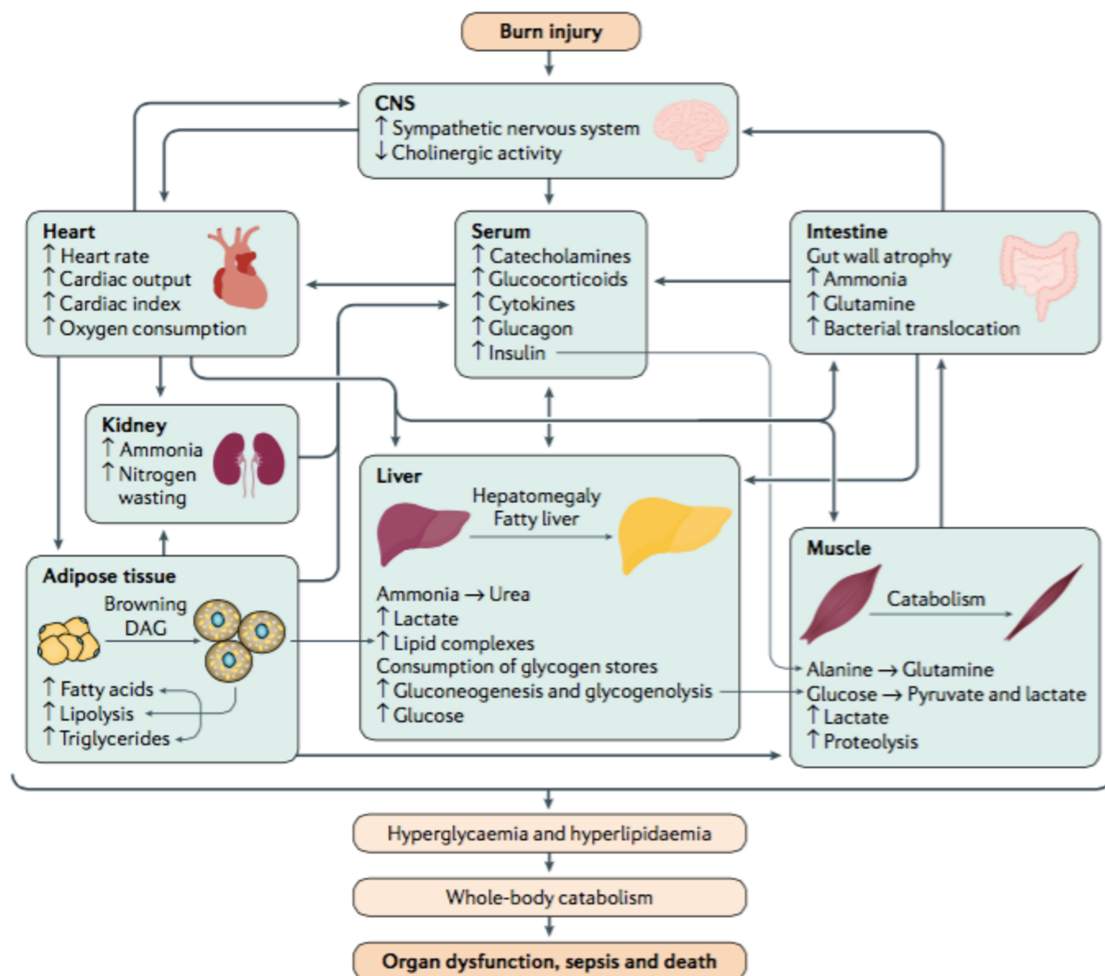
In pazienti con gravi ustioni, dopo una fase di ipometabolismo iniziale (ovvero dopo circa 72-96 ore) (Brooks 2013), potenzialmente causata da processi intracellulari, come aumento dello stress del reticolo endoplasmatico, disfunzione mitocondriale (Jeschke 2009), riduzione del metabolismo e del volume intravascolare, scarsa perfusione tissutale e bassa gittata cardiaca, in genere si osserva uno stato ipermetabolico (Jeschke 2009, Jeschke 2016).

Lo stato ipermetabolico può persistere dopo una lesione da ustione fino a 36 mesi dall'insulto iniziale. Gli ormoni dello stress come le catecolamine, i glucocorticoidi (prodotti dalle ghiandole surrenali) e il glucagone (prodotto dal pancreas) aumentano la pressione sanguigna, l'insulino-resistenza periferica e la glicogenolisi, la lisi di proteine, lipidi ed aumento del consumo di ossigeno.

I risultati di questi effetti sono l'aumento del dispendio energetico a riposo, l'aumento della temperatura corporea (rialzo medio intorno ai 38°C per disregolazione ipotalamica), la perdita di pro-

teine corporee, il deperimento muscolare e l'aumento della sintesi di proteine di fase acuta (come l'IGF-1, che ha effetti anabolici), con conseguente catabolismo degli organi associato a disfunzione e danno (Sidossis 2015, Gore 2002, Hart 2000).

I meccanismi alla base di questa complessa risposta non sono ancora del tutto noti, ma gli studi hanno suggerito che, nei pazienti con gravi lesioni da ustioni, il rilascio continuo e sostenuto di mediatori pro-infiammatori come citochine, chemochine e proteine della fase acuta (es. IL-1, IL-6, TNF e IGF-1) può ulteriormente contribuire a questo stato ipermetabolico.



**Fig. 3.** Meccanismi fisiopatologici dello stato ipercatabolico nel danno da ustioni (da Jeschke 2020, Nature).

Nonostante l'evidenza di questi meccanismi sottostanti, non è disponibile un trattamento efficace per abolire o ridurre la risposta ipermetabolica. Tuttavia, la recente scoperta della transdifferenziazione del tessuto adiposo bianco in bruno dopo le ustioni, determinata da infiammazione o upregolazione della proteina 1 disaccoppiante il grasso bruno mitocondriale (che è responsabile

della respirazione termogenica), sembra indurre cambiamenti metabolici e immunitari che aumentano ulteriormente l'ipermetabolismo e la disfunzione immunitaria (Sidossis 2015, Patsouris 2015): questa è una strada che può portare a nuove opzioni di trattamento.

#### *d. Disregolazione della risposta immunitaria e infezioni*

Nelle ustioni si osserva una disregolazione della risposta immunitaria e un conseguente aumento del rischio infettivo (Finnerty 2013, Seok 2013): basti pensare che l'infezione rappresenta attualmente la principale causa di morte nel paziente ustionato.

Nella fisiologica risposta al danno, le cellule immunitarie, inclusi monociti, macrofagi e neutrofili, si attivano in risposta a lesioni da ustione entro poche ore, riconoscono i fattori endogeni come i profili molecolari associati al danno (DAMP) e le allarmine prodotte a seguito di danno tissutale, e fattori esogeni, come i profili molecolari associati al patogeno (PAMP).

Questi fattori endogeni ed esogeni sono identificati mediante i recettori di riconoscimento dei pattern, ovvero i recettori Toll-like (TLR) e i recettori NOD-like (NLR): il legame dei TLR e NLR con i loro ligandi specifici determina l'attivazione di vie infiammatorie a valle, come quella di NF- $\kappa$ B, un fattore di trascrizione coinvolto nel rilascio di più mediatori infiammatori (come IL-1, IL-6, IL-8, IL-18 e TNF).

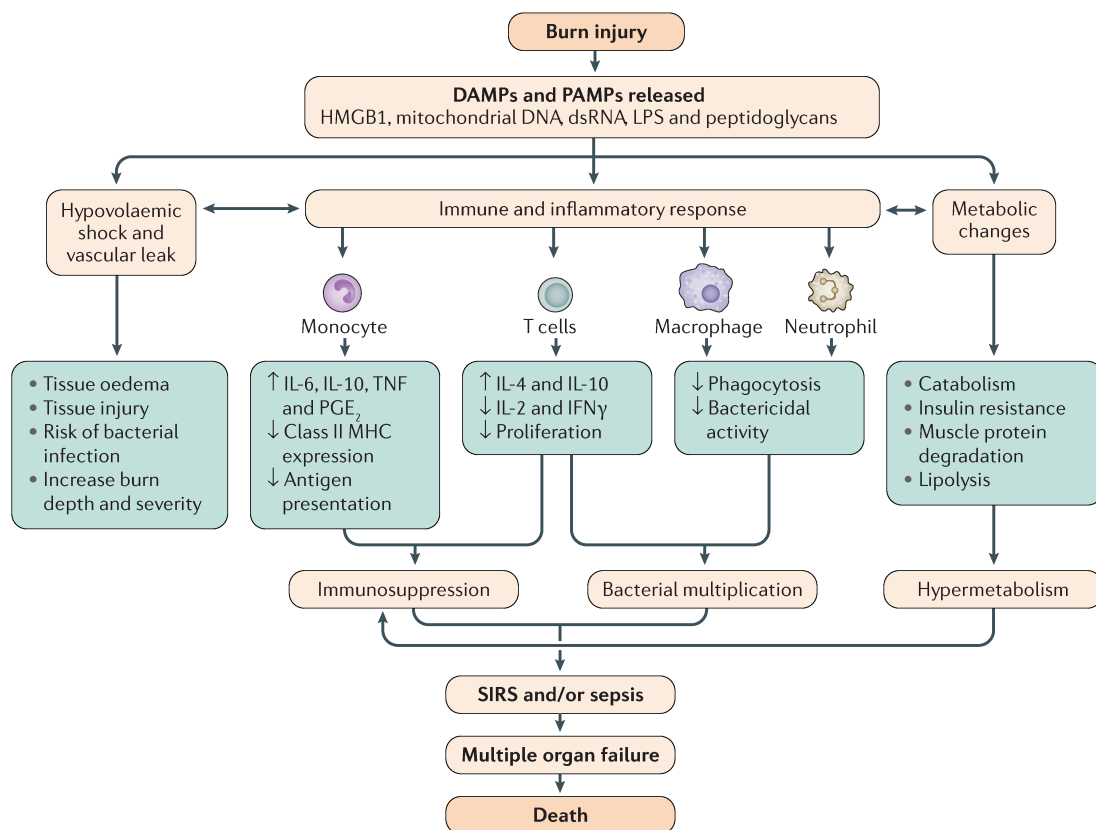
Nel paziente ustionato, questi meccanismi fisiopatologici possono essere disregolati: è soppressa la proliferazione delle cellule T e la produzione di IL-2 (Murphy 2003), sono compromessi la presentazione di antigeni ai macrofagi e l'uccisione da parte dei neutrofili dei patogeni invasori (perché diminuisce la fibronectina osponinica, indispensabile per l'attività fagocitaria) (Miyazaki 2015, Hampson 2017), viene persa la barriera cutanea che normalmente separa l'organismo dall'esterno, sono liberati cataboliti tossici da parte dei tessuti ustionati, si formano immunocomplessi che "distraggono" la risposta immunitaria, e infine può innescarsi, a causa di un'eccessiva secrezione di mediatori infiammatori, la sindrome da risposta infiammatoria sistemica (SIRS), in cui il rilascio incontrollato di citochine porta a un eccessivo reclutamento di leucociti, febbre o ipotermia, tachicardia e tachipnea (Singer 2016).

Sono tutti questi fattori a determinare una maggiore suscettibilità alle infezioni, un aumento della

virulenza dei patogeni e a favorire il conseguente sviluppo di sepsi e insufficienza d'organo (Rech 2019).

In effetti, i pazienti con gravi ustioni sono a maggior rischio di sviluppare complicanze infettive: le fonti di infezione possono essere la flora saprofitica di cute, tratto gastroenterico e respiratorio, ma anche i dispositivi per la ventilazione, infatti la polmonite associata a ventilazione (VAP) è una complicanza comune nei pazienti con gravi ustioni (Lachiewicz 2017).

La diffusione dell'infezione può esitare in sepsi, che a sua volta può determinare un interessamento d'organo con successiva insufficienza. Tra gli organi maggiormente colpiti troviamo: reni, polmoni, fegato, tratto gastroenterico, cuore e midollo osseo. In effetti, in un recente studio autopsico è emerso che più del 60% dei decessi nei pazienti con ustioni è attribuibile a complicanze infettive, che quasi tutti i pazienti hanno avuto almeno un'insufficienza d'organo associata, e che gran parte dei pazienti mostrava insufficienze multiorgano (Ballard 2008, Gomez 2009, Horvath 2007).



**Fig. 4.** Disregolazione della risposta immunitaria e meccanismi di evoluzione verso la sepsi e il danno multiorgano nel danno da ustioni (da Jeschke 2020, Nature).

*e. Altre complicanze d'organo*

Oltre alle complicanze infettive (locali e sistemiche), la lesione da ustione può colpire tutti gli organi, in maniera diretta o indiretta (a causa della risposta infiammatoria sistemica all'ustione).

I possibili danni d'organo includono:

- atrofia cerebrale,
- insufficienza renale acuta,
- a livello epatico: steatosi e insufficienza,
- disfunzione cardiaca,
- disfunzione timica,
- a livello polmonare si possono osservare: polmonite e/o sindrome da distress respiratorio acuta (ARDS). L'apparato respiratorio può essere coinvolto sia direttamente, per l'inalazione di vapori tossici o aria calda, sia indirettamente, con il cosiddetto quadro del "polmone da shock". In tale condizione si realizza, entro le prime 24-72 ore dal trauma, una grave insufficienza respiratoria con edema dapprima interstiziale e successivamente intraalveolare, che evolve verso l'ARDS. Invece, per quanto riguarda le lesioni da inalazione, ovvero il danno diretto, lo spettro di gravità è estremamente variabile da lieve a molto grave e necrotico, ma di difficile valutazione (nonostante alcuni sforzi e un sistema di classificazione esistente basato sulla broncoscopia) (Endorf 2007); le lesioni da inalazione aumentano il rischio di complicanze polmonari, tra cui polmonite associata al ventilatore (VAP), ipovolemia e mortalità (Rehberg 2009),
- a livello dell'apparato gastrointestinale si possono osservare gravi lesioni emorragiche che possono evolvere in ulcere da stress (ulcere di Curling), e alterazioni del microbioma. Nel dettaglio, è emerso che il microbioma intestinale gioca un ruolo importante nella patogenesi delle lesioni da ustioni (Gosain 2005, Magnotti 1999): nei giorni successivi all'ustione, a causa dell'alterazione del sistema immunitario, dell'ipoperfusione intestinale e dell'alterazione della motilità intestinale, si osserva una maggiore incidenza di traslocazione batterica intestinale, che diventa ricorrente quando la lesione da ustioni è accom-

pagnata da fattori che peggiorano l'ipoperfusione intestinale, come shock emorragico peri-operatorio e complicanze infettive (Herndon 1993).

Inoltre è emerso che il microbioma intestinale subisce una modificazione nella composizione: rispetto ai controlli sani, è stato osservato in campioni fecali di pazienti con lesioni da ustioni una diminuzione delle famiglie *Bacteroidaceae*, *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae* e un aumento della famiglia delle *Enterobacteriaceae* (Beckmann 2018, Earley 2015, Deitch 1985).

Questa osservazione fornisce ulteriori prove del fatto che i batteri intestinali e i loro prodotti (come l'endotossina) possono attraversare la barriera epiteliale intestinale, portarsi nella circolazione sistemica o linfatica, e contribuire ai meccanismi fisiopatologici indotti dalle lesioni da ustioni,

- a livello oculare, una potenziale complicazione, molto rara, documentata nei pazienti con ustioni è l'irritazione dell'occhio (Capek 2018) (Jeschke 2020): l'esposizione ad aria calda, vapore o fiamme può bruciare il viso e gli occhi o le palpebre, e persino danneggiare la normale funzione visiva. Inoltre la lesione della palpebra può determinare danno di barriera e favorire, a livello della ferita da ustione, l'ingresso di corpi estranei e di patogeni.

#### *f. Lesioni da trauma*

Una piccola percentuale di lesioni da ustioni è associata a traumi concomitanti, che comunemente includono traumi cerebrali, addominali, toracici, fratture o lesioni complesse dei tessuti molli (come lesioni da schiacciamento o da *degloving*, con più strati di tessuto coinvolto). In generale, i pazienti con ustioni e lesioni traumatiche hanno una prognosi peggiore rispetto a quelli ustionati ma senza lesioni da trauma (Grigorian 2018).

### **6. Clinica e diagnosi: *initial assessment e triage***

L'identificazione di una lesione da ustione e l'accurata valutazione della sua gravità sono i presupposti essenziali per tutte le successive decisioni di trattamento: rappresentano in altre parole la fase 1 della presa in carico del paziente ustionato (*initial assessment and triage*). Se possibile, le

decisioni su come procedere dopo la diagnosi dovrebbero considerare la volontà del paziente e le sue aspettative sulla qualità di vita (Teven 2018). Come descritto da tutte le linee guida, una valutazione ottimale della gravità di una lesione da ustioni deve avvalersi di un approccio sistematico, che preveda *step* sequenziali, indagini di primo livello e di secondo livello (*primary survey* e *secondary survey*), e che consideri l'eventuale necessità di trasportare il paziente in centri specializzati per migliorare la prognosi (Klein 2009).

#### a. *Primary* e *secondary survey*

La *primary survey*, da effettuare sulla scena in cui è avvenuta l'ustione o al pronto soccorso, comprende l'immediata valutazione standardizzata e sistematica di (nell'ordine ABCDE): vie aeree (A), respirazione e ventilazione (B), circolazione e funzione cardiaca (C), disabilità, deficit neurologico, eventuali traumi concomitanti (D), grado di esposizione (E, che richiede di spogliare completamente il paziente per consentire l'identificazione delle lesioni associate). Per evitare l'ipotermia, specialmente nei bambini e negli anziani, questa valutazione deve essere condotta in un ambiente caldo (Henry 2018).

In questa fase occorre stimare in maniera preliminare la superficie percentuale di cute ustionata (v. dopo), da cui dipende la quantità di liquidi da somministrare, e identificare un eventuale danno da inalazione di fumo: in tal senso, oltre all'anamnesi, il riscontro di ustioni facciali, vibrisse carbonizzate, eritema periorale, fuliggine nella cavità orale, stridore, raucedine, espettorato carbonaceo, e dispnea, pone indicazione all'esecuzione di un esame obiettivo della faringe posteriore, alla ricerca di lesioni termiche, tra cui eritema della mucosa, desquamazione e gonfiore, fuliggine nelle corde vocali (ISBI 2016).

La *secondary survey*, da effettuare al pronto soccorso o presso un centro ustioni, include esami di laboratorio e di *imaging*, da prescrivere in base alla presenza di un trauma concomitante o di comorbidità, e la profilassi antitetanica in caso di ferite aperte.

Gli esami di laboratorio indispensabili sono: emocromo, elettroliti, profilo coagulativo, emogasanalisi, valutazione della diuresi oraria, misurazione della pressione arteriosa; tra gli esami stru-

mentali, soprattutto in caso di sospetta inalazione, ricordiamo l’RX del torace e la fibrobroncoscopia (che mette in evidenza fuliggine o lesioni al di sotto delle corde vocali).

Bisogna ricordare però che la normossia e un RX negativo non escludono una sospetta lesione da inalazione, poiché occorre tempo affinché si sviluppi una risposta infiammatoria polmonare (Foster 2017); infatti, per esempio, l’emogasanalisi è meno sensibile in caso di inalazione di fumo perché non rileva i valori di monossido di carbonio (CO): la misurazione della carbossemoglobina è l’unico test accurato dei livelli di monossido di carbonio e se i livelli di carbossemoglobina sono superiori al 30-40%, il paziente ha avuto una grave esposizione al monossido di carbonio (in queste circostanze il trattamento consiste nella somministrazione di ossigeno al 100% che fa diminuire l’emivita del monossido di carbonio).

In questa seconda fase occorre valutare in via definitiva e standardizzata la severità dell’ustione a partire dalla sua profondità ed estensione, anche avvalendosi di esami strumentali specifici di cui dispongono i centri ustione (v. dopo); si procede quindi con il calcolo dei liquidi da infondere.

Emerge, in conclusione, quanto sia importante, in entrambe le fasi, la raccolta mirata e rapida di un’accurata anamnesi, sia patologica remota sia sulle modalità con cui si è realizzato il trauma; a parte infatti i casi di ustioni chimiche o elettriche, con le relative particolari conseguenze clinico-terapeutiche, è opportuno sapere se, assieme al danno da ustioni, si sono verificati altri traumi e se si è verificata inalazione di vapore o fumo. In caso di pazienti incoscienti possono essere utili le informazioni raccolte da eventuali testimoni o soccorritori.

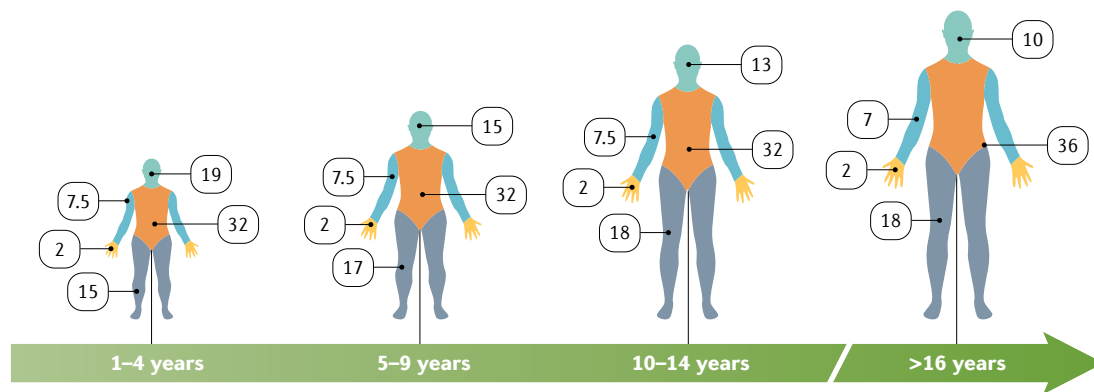
#### *b. Valutazione della gravità di una lesione da ustione*

Nella definizione della gravità di una lesione da ustione, da cui dipendono la prognosi e la gestione terapeutica, i principali fattori da considerare sono la profondità, l’estensione e la sede anatomica della lesione.

La profondità di un’ustione, che è direttamente proporzionale alla temperatura e alla durata del contatto con l’agente lesivo, è facilmente identificabile con l’esame ispettivo; come già detto, in base alla profondità, si identificano ustioni di I grado, II grado superficiale, II grado profondo, III grado e IV grado. L’unico dubbio diagnostico può talora sorgere nella distinzione di ustioni di II

grado superficiale e profondo; sono state proposte diverse metodiche per diagnosticare in modo più obiettivo un'ustione di II grado, dalla tintura con coloranti allo studio della vascolarizzazione con fluoresceina, alla biopsia, ma le metodiche più innovative, appannaggio dei centri specialistici, sono: l'*imaging* con il laser Doppler (Burke-Smith 2015, Wearn 2018), la tomografia a coerenza ottica (Ganapathy 2014) e la termografia a infrarossi ad alta definizione (Burmeister 2017). In linea di massima le ustioni superficiali hanno la tendenza a guarire spontaneamente con *restitutio ad integrum*: le ustioni di I grado infatti guariscono in 5-7 giorni senza alcun esito cicatriziale, e quelle di II grado superficiale in 9-14 giorni grazie all'attività proliferativa degli elementi epiteliali superstiti più profondi, quali gli annessi pilosebacei e le ghiandole sudoripare. Le ustioni di II grado profondo possono guarire spontaneamente in 15-20 giorni con la formazione di esiti cicatriziali di gravità variabile e dipendente oltre che dalle caratteristiche genetiche personali, anche dall'infezione locale e dalle tecniche di medicazione. Le ustioni di III grado richiedono invece un trattamento chirurgico e la guarigione avviene sempre lasciando esiti cicatriziali importanti e invalidanti dal punto di vista sia funzionale sia estetico.

Per il calcolo dell'estensione dell'ustione si valuta il rapporto tra l'estensione dell'area interessata rispetto alla superficie corporea totale (TBSA), calcolando quindi un valore percentuale. Nella pratica clinica si utilizzano schemi corporei specifici nei quali viene riportata la superficie ustionata e si procede quindi alla somma percentuale ottenendo il dato numerico definitivo. Durante la *primary survey*, per comodità e per velocità, ci si può avvalere della "Regola del 9", secondo la quale ai distretti corporei viene assegnato un valore numerico uguale a 9 o ai suoi multipli: ogni braccio rappresenta il 9% della superficie corporea totale, così come la testa, mentre il tronco anteriore e il tronco posteriore contano ciascuno il 18%, così come ogni gamba (Wallace 1951). Questa regola è abbastanza imprecisa: basti pensare che i bambini piccoli hanno la testa proporzionalmente più grande e gambe più piccole rispetto agli adulti. Per una valutazione più adeguata si utilizza il diagramma di Lund e Browder (Lund 1944), che fornisce una stima più precisa perché tiene conto della variazione di percentuale dei diversi distretti corporei a seconda dell'età del paziente.



**Fig. 5.** Diagramma di Lund e Browder per la stima dell'estensione di una lesione da ustione (da Jeschke 2020, Nature).

Si parla di malattia da ustione, ovvero di ustioni che causano alterazioni fisiopatologiche che interessano tutto l'organismo, in presenza di ustioni che si estendono per più del 20% della superficie corporea di un adulto o del 10-12% in un bambino.

Infine, un terzo fattore da valutare per definire la gravità di una lesione da ustione è rappresentato dalla sede anatomica delle lesioni: sono fattori prognostici negativi l'interessamento delle vie respiratorie (per le complicazioni broncopolmonari), delle mani e del viso (per gli invalidanti e inestetici esiti cicatriziali), delle grosse articolazioni (per le complicanze funzionali) e delle regioni genitali.

Combinando questi tre fattori, è possibile distinguere ustioni lievi, intermedie e gravi:

- le ustioni lievi sono caratterizzate da estensione inferiore al 10% della superficie cutanea, con aree di II grado non superiori al 2%. Esse richiedono un trattamento ambulatoriale con medicazioni frequenti,
- le ustioni intermedie sono caratterizzate da lesioni estese al 10-25% della superficie corporea con aree profonde inferiori al 10%. Queste lesioni richiedono sempre un ricovero ospedaliero, non necessariamente in un centro ustioni,
- le ustioni gravi, che richiedono il ricovero in un centro ustioni, coinvolgono più del 25% della superficie corporea se di II grado, o del 10% se di III grado, o, a prescindere dall'estensione, coinvolgono il volto (per le complicanze respiratorie), le mani e le grosse articolazioni (per le complicanze funzionali) e le regioni genitali.

Oltre a profondità, estensione e sede, bisogna considerare da un punto di vista prognostico l'età del paziente (a parità di estensione e profondità, i bambini e gli anziani godono di una prognosi peggiore rispetto all'individuo adulto), condizioni preesistenti e comorbidità.

## **7. Terapia**

Oltre il 95% dei decessi per ustione da fiamma si verifica in Paesi a basso e medio reddito (Davé 2018), dove i centri ustioni con esperienza sono pochi. Anche negli Stati Uniti, è emerso che l'accesso alle cure specialistiche per le ustioni è limitato: fino al 20% della popolazione degli Stati Uniti vive a più di 2 ore da un centro ustioni (Klein 2009). Pertanto, per ridurre la mortalità e la disabilità da ustioni trattate in modo inadeguato, è essenziale formare gli operatori sanitari delle strutture di primo livello, soprattutto di quelle con scarse risorse, in Paesi a basso e medio reddito, e zone di guerra (Young 2017, Jeng 2014), e seguire protocolli diagnostico-terapeutici standardizzati.

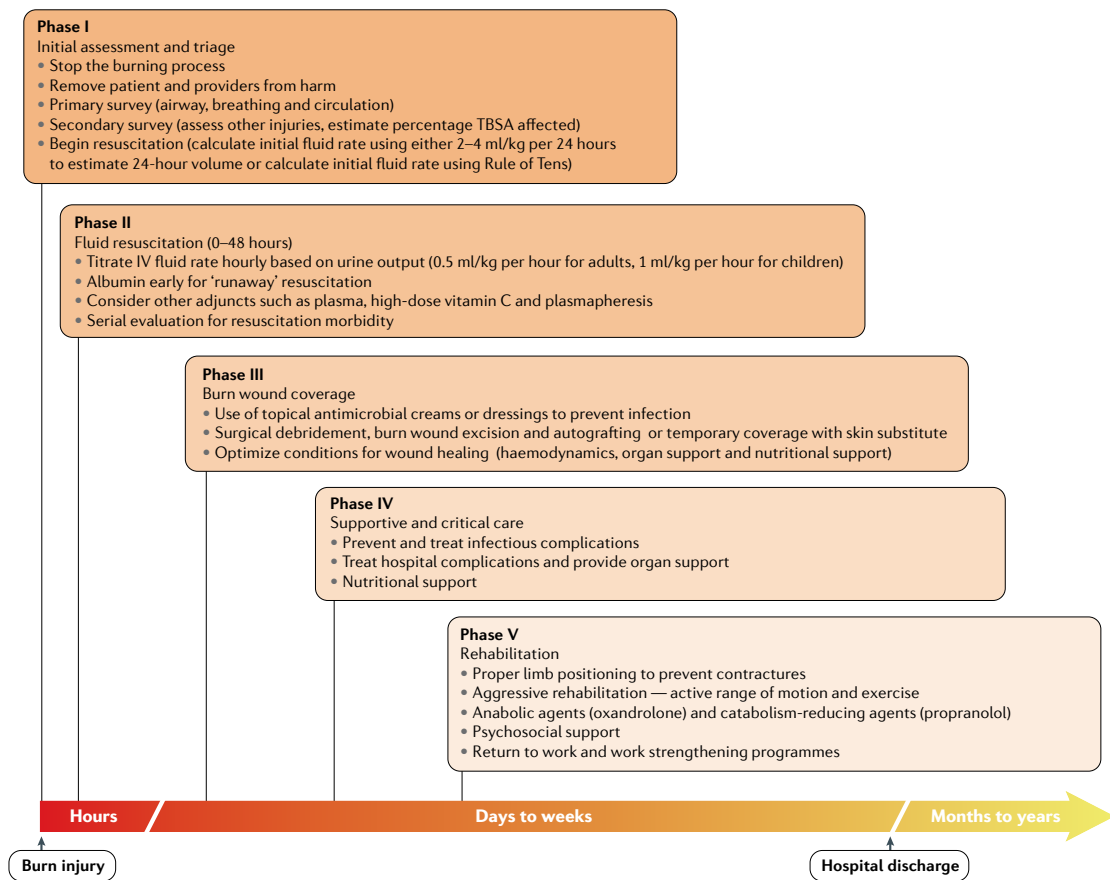
La gestione diagnostico-terapeutica di un paziente ustionato può essere dissecata in cinque fasi: *initial assessment* e *triage* (fase 1), rianimazione (fase 2), copertura della ferita da ustione (fase 3), terapia intensiva e/o di supporto (fase 4) e riabilitazione (fase 5) (ABA 2006).

Segue la trattazione di ogni fase, a partire dalla parte terapeutica della fase 1, che infatti è sia diagnostica sia terapeutica, comprende ovvero sia l'inquadramento delle condizioni generali del paziente e della gravità dell'ustione (di cui si è parlato nel paragrafo precedente), sia gesti terapeutici di primo soccorso (di cui si parlerà di seguito).

Occorre però, come premessa, fare alcune considerazioni su bambini e anziani, che possono essere considerati pazienti speciali a causa di alcune loro peculiarità. Infatti i pazienti pediatrici hanno la cute della testa più estesa in proporzione e presentano una ridotta riserva fisiologica generale; i neonati, ad esempio, hanno un rapporto testa-corpo più grande e gambe più piccole. Inoltre, poiché i bambini hanno scorte limitate di glicogeno, devono ricevere, oltre all'integrazione di liquidi, anche destrosio al 5%.

Nei pazienti anziani (di età superiore ai 65 anni) bisogna invece considerare la fragilità preesistente, che rappresenta un fattore determinante per l'esito (Romanowski 2019); infatti la risposta

fisiopatologica a una lesione da ustione nei pazienti anziani è caratterizzata da una ridotta perfusione e ossigenazione degli organi (Rehou 2019), aumentato rischio infettivo, alterazioni della salute mentale e malnutrizione, che sono tutti aspetti associati a un aumento della morbilità e della mortalità (Grigorian 2019).



**Fig. 6.** Fasi della gestione diagnostico-terapeutica di un paziente con lesioni da ustione (da Jeschke 2020, Nature).

*a. Fase 1: initial assessment e triage*

Come già detto, la fase 1 di *initial assessment e triage*, è sia diagnostica (v. paragrafo precedente) sia terapeutica, comprende quindi le fasi del primo soccorso, fondamentali per il trattamento delle lesioni da ustioni minori e maggiori; nei pazienti con ustioni più gravi, la fase 1 della gestione acuta comprende anche tutte le sopracitate indagini primarie e secondarie.

L'assistenza immediata a un paziente con ustioni differisce in base alla causa della lesione (termica, chimica o elettrica), alla sede della lesione e alla disponibilità delle risorse di cura.

Se l'ustione si verifica in un luogo remoto, il primo soccorso sarà probabilmente condotto da uno spettatore o da una persona senza formazione medica. Il primo passo è fermare l'esposizione all'agente lesivo e spostare il paziente in un'area sicura (per esempio liberando il paziente da un veicolo in cui è intrappolato). Se l'abbigliamento dell'individuo è in fiamme, si consiglia di soffocare le fiamme per estinguere l'incendio arrotolando e coprendo gli indumenti (UFA 2017); in alternativa è possibile utilizzare dell'acqua o un estintore.

Successivamente, bisogna lavare il sito della lesione con acqua fredda, cosa che non solo estingue il fuoco, ma raffredda anche la ferita e riduce la convezione di calore e il dolore; questo gesto però aumenta il rischio di ipotermia: pertanto i pazienti dovrebbero essere poi avvolti in coperte pulite e asciutte. Infine bisognerebbe rimuovere l'abbigliamento e i gioielli.

Per un'ustione chimica, si consiglia un abbondante risciacquo dell'area ustionata con acqua, anche se questo gesto aumenta il rischio di contaminazione dei soccorritori; è controindicato l'uso di agenti neutralizzanti che potrebbero alimentare il calore.

Per le lesioni elettriche, prima di toccare il paziente bisogna interrompere la corrente o utilizzare un isolante.

Effettuati questi passaggi, bisogna allertare le squadre di soccorso o i servizi di emergenza e si procede con le indagini primarie e secondarie (*primary e secondary survey*).

Come già detto, la cura delle ferite nel luogo dell'incidente comporta la rimozione di tessuti bruciati, che possono essere sostituiti da lenzuola pulite per prevenire l'ipotermia e ridurre il rischio di contaminazione della ferita. L'uso di "rimedi casalinghi" come burro, limone, dentifricio, unguenti non è raccomandato poiché si rischia di danneggiare ulteriormente i tessuti.

A seconda della situazione geografica locale cambiano i criteri di trasporto verso l'ospedale: certo è che bisogna considerare il trasporto aereo quando quello su strada supera le 2 ore di tempo o i 100 km di distanza.

*b. Fase II: rianimazione*

Come accennato, nelle prime 48 ore dopo un'ustione grave, a causa di una risposta infiammatoria sistemica disregolata, il paziente può andare incontro a uno shock da ustione, che è al contempo ipovolemico, distributivo e cardiogeno.

Sebbene l'approccio a un paziente con shock da ustione sia personalizzato, in generale, occorre somministrare fluidi ai pazienti con ustioni maggiori del 20% della TBSA e a quelli con ustioni minori ma con lesioni elettriche, inalazione di fumo o trauma concomitante. L'obiettivo finale della somministrazione di fluidi è mantenere la perfusione degli organi.

Per far questo occorre reperire due accessi venosi periferici o, se possibile, un accesso venoso centrale; la procedura può non essere semplice e agevole visto che l'edema e la lesione si possono estendere fino ai siti di accesso. Si consiglia quando possibile di scegliere accessi lontani dalle aree ustionate fin da subito; infatti nei giorni successivi all'ustione, la comparsa di edema e il consolidamento delle escare può rendere difficile, se non impossibile, il reperimento di accessi venosi periferici.

La soluzione di scelta da somministrare è il Ringer lattato riscaldato (Lawrence 2010), una soluzione cristalloide bilanciata; tuttavia poiché, nella maggior parte dei pazienti con gravi ustioni, l'uso esclusivo di una soluzione di cristalloidi può provocare un sovraccarico di fluidi e una conseguente sindrome compartimentale, è stato suggerito di utilizzare anche soluzioni colloidali come albumina o plasma, che consentono di infondere un volume totale di liquidi inferiore (O'Mara 2005).

Classicamente la quantità di cristalloidi da somministrare viene calcolata con la regola di Parkland, in cui la quantità di liquidi da somministrare (Q) è pari a:

$$Q(mL) = 4 (mL/Kg/h) \cdot peso\ del\ paziente\ (Kg) \cdot \%\ di\ cute\ ustionata$$

Si somministra metà della quantità calcolata nelle prime 8 ore dall'ustione e la restante metà nelle 18 ore successive; nelle ustioni che si estendono per più del 50% della TBSA, la percentuale di cute ustionata è impostata per convenzione a 50%. Questa regola non è tuttavia vincolante e deve

tenere conto dell'età del paziente, delle patologie correlate e della risposta emodinamica. Nelle prime ore si dovrebbero infondere cristalloidi sino a ottenere una diuresi di 0,5 mL/kg/ora (per i bambini con peso inferiore ai 30 Kg di 1 mL/Kg/ora) e mantenere una pressione di perfusione renale adeguata (maggiore di 65 mmHg). Nelle seconde 24 ore la terapia infusione dovrebbe essere proseguita con la somministrazione di colloidi e di cristalloidi in proporzione del 50%.

Richiedono più fluidi i pazienti con ustioni profonde, quelli con inalazione di fumo e lesioni associate, i pazienti per i quali è stata ritardata la rianimazione, i bambini piccoli e i pazienti con intossicazione da alcol.

Attualmente si preferisce la personalizzazione di ogni tipo di terapia infusione, con l'ausilio di un attento monitoraggio dei parametri cardiocircolatori, ma con la consapevolezza che è impensabile raggiungere, nel paziente ustionato acuto, valori normali di gittata cardiaca proprio a causa dello shock ipovolemico imponente.

E' stato anche esplorato il ruolo della somministrazione di alte dosi (66 mg/Kg/ora) di vitamina C, che ha proprietà antiossidanti, durante la rianimazione dei pazienti con ustioni: è emerso che essa consente di ridurre i volumi dei cristalloidi da infondere e migliorare alcuni parametri di ventilazione e ossigenazione, ma non impatta in maniera significativa sulla mortalità (Tanaka 2000).

Infine, durante la fase di rianimazione, è emerso il ruolo benefico delle metodiche di purificazione del sangue da tutti i mediatori dell'infiammazione circolanti (Neff 2010): il plasma *exchange* terapeutico consentirebbe infatti di infondere meno liquidi, migliorare la pressione arteriosa media, aumentare la produzione di urina e diminuire i livelli di lattato (Klein 2009), ma sfortunatamente, un singolo trattamento è molto costoso e dispendioso poiché richiede elevati volumi di plasma da donatore o colloide. Un'alternativa più pratica può essere l'emofiltrazione ad alto volume (HVHF), che si è mostrata di beneficio nei pazienti con shock da ustione (Heering 1997, Payen 2009): un recente studio multicentrico ha rivelato la sua efficacia nel trattamento dello shock e nel miglioramento della funzione degli organi (Chung 2017); un altro studio ha dimostrato che riduce l'incidenza della sepsi, la durata del trattamento vasopressore e la mortalità (You 2018). Il problema è che queste strategie di purificazione del sangue non sono praticate in un centro con risorse limitate.

Infine, da un punto di vista locale, nel caso di ustioni profonde localizzate a livello degli arti o del torace, può essere indicato effettuare escarotomie per impedire la comparsa di sindromi compartimentali provocate dall'eccessivo edema tissutale, che possono complicarsi in danno ischemico da compressione. Nel dettaglio, le incisioni devono essere eseguite tempestivamente con il bisturi in senso longitudinale e devono interessare la cute ustionata a tutto spessore sino a raggiungere i tessuti sani: si definiscono incisioni liberatorie decompressive o fasciotomie o escarotomie.

### *c. Fase III: copertura della ferita da ustioni*

Nella prima metà del XX secolo, la guarigione delle ferite da ustioni era frequentemente complicata dalla sepsi, che spesso causava la morte del paziente; la sopravvivenza è aumentata con l'introduzione degli antimicrobici topici (Pruitt 1968) e, soprattutto, con l'introduzione negli anni '70, dell'escissione precoce dei tessuti necrotici (*debridement* o necrosectomia) e del posizionamento di innesti di cute per coprire la ferita e colmare la perdita di sostanza (Burke 1974, Desai 1990, Herndon 1989).

Nella cura di pazienti con ustioni acute non vengono utilizzati gli antibiotici sistemici profilattici; rappresentano invece il pilastro del trattamento delle ustioni non chirurgiche gli **antimicrobici topici** (sotto forma di creme, pomate, etc.): la maggior parte dei protocolli di medicazione cita l'argento (Sulfadiazina argentea 5%), a causa della scarsa resistenza dei microrganismi. Tuttavia non ci sono dati di letteratura che mettono in evidenza la superiorità di un antimicrobico topico rispetto a un altro, e, di conseguenza, ogni centro utilizza una particolare medicazione in base alla disponibilità, alle preferenze del personale e all'esperienza (Hermans 2007). Nel dettaglio, questo trattamento occlusivo, consiste nell'applicazione di antisettici topici e di garze.

L'**escissione precoce dei tessuti necrotici** rappresenta il trattamento *gold standard* e consiste nel rimuovere i tessuti ustionati e necrotici, fino a raggiungere tessuto vitale; questa procedura attenua lo stato ipermetabolico e rimuove il focolaio biologico dell'infezione, riducendo quindi il rischio di sepsi da ustioni. Nel dettaglio si procede con: un'accurata detersione della zona lesa e di quelle circostanti, la tricotomia, l'asportazione del materiale estraneo e delle medicazioni precedentemente applicate, l'asportazione del tessuto necrotico.

Segue l'**innesto precoce di cute autologa o eterologa**, che permette di chiudere rapidamente le ferite pulite, di ridurre ulteriormente il rischio di infezione, di attenuare il dolore e di mobilitare più precocemente il paziente.

Resta ancora poco chiaro nella letteratura cosa si intenda per “precoce”, ovvero quale sia il momento ottimale per effettuare questi gesti chirurgici: se il primo giorno dopo l'ustione o 2-3 giorni dopo il completamento delle procedure di rianimazione.

Come accennato, a seconda della fonte, gli innesti possono essere:

- **autologhi**, se prelevati dal paziente stesso da aree di cute dette donatrici, mediante un dispositivo chiamato dermatomo. Sono di solito innesti a medio spessore, che comprendono cioè l'epidermide e il derma superficiale.

Sono utilizzati se il paziente presenta siti donatori disponibili, è stabile emodinamicamente, e se il letto della ferita è fresco e non contaminato.

Nelle ustioni che coprono più del 30-40% della TBSA, la cute donatrice può essere insufficiente per consentire una copertura definitiva con una singola operazione: in questi casi, per mezzo di un dispositivo detto *mesher*, si realizzano delle perforazioni a rete sugli innesti cutanei prelevati, che prendono quindi il nome di innesti a rete o *mesh-graft*. Per mezzo di questa procedura l'innesto si espande in dimensioni (che possono essere da 1,5 a 9 volte maggiori rispetto all'innesto originario; infatti i rapporti di maglia vanno da 1:1,5 a 1:9) e diventa permeabile, consente cioè agli agenti topici applicati su di esso di penetrare nei tessuti e al siero di trasudare.

Questa procedura di *meshing* però, compromette i risultati estetici e funzionali; pertanto, per aree esteticamente rilevanti come mani, viso e collo, vengono utilizzati innesti integri (*non meshed*);

- **eterologhi**: comprendono innesti di cute di cadavere (allograft), di cute porcina (xenograft) e sostituti di pelle artificiali.

Possono essere temporanei (cute di cadavere o porcina, sostituti artificiali) o permanenti (sostituti artificiali); sono preferiti in caso di aree donatrici insufficienti per estensione, o

di dubbi sulla vitalità o sulla contaminazione del letto della ferita, di instabilità del paziente.

Per esempio nelle ustioni molto estese, in cui l'area ustionata asportata supera per estensione la pelle disponibile del donatore, è necessario coprire temporaneamente l'area ustionata per favorire l'avvio del processo di riepitelizzazione e prevenire le complicanze infettive: in questa situazione è opportuno utilizzare innesti porcini o da cadavere, che forniscono una copertura temporanea fino a 14 giorni prima dell'inevitabile rigetto (Rowan 2015).

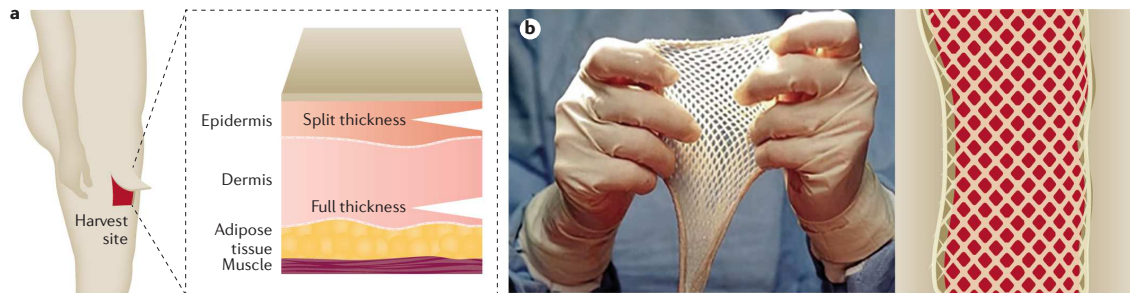
Invece i sostituti cutanei artificiali possono essere composti da vari materiali biologici, sintetici e biosintetici, e possono fornire una copertura temporanea o permanente di ferite aperte (Murphy 2012, Chocarro-Wrona 2019). Sono caratterizzati da una struttura tridimensionale che rappresenta un surrogato della matrice extracellulare e che fa quindi da impalcatura per i processi di neovascolarizzazione, adesione cellulare, proliferazione e differenziazione.

Sono disponibili molte varianti di sostituti di cute artificiali, tutte accumulate dalle seguenti caratteristiche: resistenza alle forze di taglio durante la manipolazione; stessa struttura e funzione della cute normale, quindi capacità di proteggere dalla perdita di liquidi e dalle infezioni; capacità di agire da impalcatura e consentire alle cellule di proliferare per la guarigione delle ferite; composizione con sostanze non infiammatorie, tossiche e immunogeniche; convenienza (Nicholas 2016, Sheikholeslam 2018).

I sostituti cutanei artificiali possono essere, secondo la classificazione di Davison-Kotler (Davison-Kotler 2018): cellulari o acellulari; a strato singolo o doppio strato; epidermici o compositi; sintetici, biosintetici o biologici; permanenti, semipermanenti o temporanei (van Zuijlen 2015).

In pazienti selezionati con grandi ustioni, è possibile realizzare sostituti cutanei a partire da cellule autologhe (CEA), mediante coltura per 2-3 settimane di cheratinociti prelevati dal paziente: si realizza così un autoinnesto epidermico, che però presenta come limiti la fragilità, i costi e l'esperienza tecnica richiesta per l'attecchimento ottimale. Il principale

vantaggio di questa tecnica ricostruttiva risiede nella possibilità di passare in soli 20 giorni da un frammento cutaneo di soli 2 cm<sup>2</sup> a un'area di cute ingegnerizzata di 6 m<sup>2</sup>.



**Fig. 7.** a) Schema degli innesti a seconda dello spessore. b) Innesto a rete o *mesh* (da Jeschke 2020, Nature).

Secondo Jeschke e collaboratori (Jeschke 2020) i distretti prioritari da trattare chirurgicamente sono la schiena e il tronco, ovvero quelli più estesi, seguiti da articolazioni, gambe e braccia: questo approccio si basa sull'ipotesi che le grandi aree bruciate contribuiscano maggiormente e aumentino l'ipermetabolismo e l'infiammazione e, pertanto, sono associate a una prognosi peggiore. Coperte le aree più grandi, ci si dovrebbe dedicare ad aree delicate come viso, palpebre e mani; se i risultati estetici non sono ottimali, per esempio a causa del ridotto spessore della pelle o della presenza di esiti cicatriziali, si possono effettuare ricostruzioni successive in elezione, una volta che il paziente è stabilizzato e dimesso.

Infatti, sui risultati a lungo termine del trattamento di una lesione da ustioni impattano gli **esiti cicatriziali**: il processo di cicatrizzazione può essere fisiologico o patologico; nelle cicatrici normali si osservano: una maggiore attività delle collagenasi, una minore espressione di TGFβ, e macrofagi con un fenotipo prevalentemente M1, che attivano i linfociti T helper 1. Invece, le cicatrici patologiche, di più frequente riscontro dopo ustioni profonde, sono caratterizzate da un'eccessiva deposizione di collagene, che causa a sua volta: aumento dello spessore della cute, perdita di elasticità, prurito, dolore e contratture, limitazioni funzionali (Gauglitz 2011).

Le cicatrici patologiche dopo un'ustione possono essere cicatrici ipertrofiche o cheloidi:

- le **cicatrici ipertrofiche**, presenti nel 30-90% dei pazienti con ustioni (Gauglitz 2011), sono associate a un ritardo nella guarigione delle ferite di più di 3 settimane; in esse si osserva una ridotta attività della collagenasi, che porta alla produzione e degradazione di

collagene alterato, con conseguente formazione di fasci di collagene reticolare orientato in parallelo alla superficie epidermica. In particolare, diminuisce l'espressione di collagene di tipo I maturo e aumenta quella del collagene di tipo III (Finnerty 2016). Inoltre, nelle cicatrici ipertrofiche aumenta l'espressione TGF- $\beta$  e PDGF, e i macrofagi hanno un fenotipo prevalentemente M2, che favorisce l'attivazione dei linfociti T helper 2 e dei miofibroblasti,

- le **cicatrici cheloidi** si sviluppano invece diversi mesi o anni dopo l'insulto iniziale. Sono lesioni fibroproliferative rilevate, composte da fasci disorganizzati di collagene di tipo I e di tipo III, caratterizzate da proprietà simil-tumorali (crescita incontrollata, invasione dei tessuti normali e recidiva nonostante il trattamento) e da una dipendenza dalla glicolisi anaerobica per produrre metaboliti necessari per la proliferazione cellulare (Vincent 2008, Tsai 2019). Un fattore di rischio per lo sviluppo di cicatrici cheloidi è la persistenza delle fasi infiammatoria e proliferativa del processo di guarigione delle ferite. La pigmentazione della cicatrice cheloide può essere aumentata o diminuita rispetto alla pelle normale.

Sia le cicatrici cheloidi sia quelle ipertrofiche influiscono negativamente sulla qualità della vita e sono gestite, a seconda della presentazione clinica, con una combinazione di terapia farmacologica intralesionale, incisione chirurgica, escissione della cicatrice, massaggio della cicatrice e terapia laser della cicatrice.

#### *d. Fase IV: terapia di supporto*

Poiché la chiusura della ferita impatta positivamente su mortalità e morbilità (Nitzschke 2014), occorre erogare cure di supporto che promuovano la guarigione della ferite, prevenendo al contempo le complicanze legate al ricovero ospedaliero (ad esempio, complicanze tromboemboliche venose, ulcere da stress, polmonite nosocomiale e associata al ventilatore, batteriemie associate a catetere venoso centrale, e infezioni delle vie urinarie associate a catetere vescicale).

L'ottimizzazione delle condizioni di guarigione delle ferite comprende il supporto emodinamico nelle prime fasi (somministrazione di fluidi ed eventualmente di vasopressori), il supporto nutri-

zionale e l'uso di farmaci per contenere gli effetti dell'ipermetabolismo.

La risposta ipermetabolica si sviluppa in pazienti con ustioni che si estendono per più del 20% TBSA, portando a perdita di massa muscolare e, se non trattata, a morte per MOF. I pazienti con risposta ipermetabolica hanno una temperatura interna elevata (circa 38°C), quindi per ridurre la domanda metabolica occorre impostare la temperatura ambiente a circa 18°C e ridurre al minimo il rischio di infezione e di sepsi; infine si possono somministrare il propranololo, che si è mostrato efficace nel ridurre gli effetti ipermetabolici delle catecolamine, e l'ossandrolone, un analogo del testosterone senza effetti mascolinizzanti che, alla dose di 10 mg due volte a giorno, migliora la massa muscolare e gli esiti nei pazienti con ustioni (Rowan 2015, Wolf 2003). Infatti, una strategia per ridurre il catabolismo è aumentare la massa muscolare fornendo agenti anabolizzanti: l'insulina, il fattore di crescita insulino-simile 1 (IGF-1) e l'ormone della crescita (GH) hanno tutti mostrato un beneficio ma sono usati raramente (Williams 2009, Abdullahi 2014, Auger 2017).

In ogni fase della cura, oltre a diminuire la domanda metabolica, è fondamentale un adeguato controllo del dolore con l'uso appropriato di oppioidi e analgesici non oppioidi. Occorre inoltre instaurare la profilassi tromboembolica con eparine a basso peso molecolare e la profilassi delle ulcere gastrointestinali con H2-antagonisti.

Per quanto riguarda la nutrizione, nelle prime fasi è necessario embriacare alla nutrizione enterale un supporto parenterale per garantire l'adeguato fabbisogno calorico-proteico al paziente ustionato. Poi bisogna continuare a nutrire il paziente esclusivamente per via enterale previo posizionamento di una canula naso-duodenale: la nutrizione è fondamentale per soddisfare l'elevata domanda metabolica del paziente con gravi ustioni. Il fabbisogno calorico può essere calcolato con l'uso di varie formule che stimano il dispendio energetico a riposo (ad es. Harris-Benedict, Toronto, Milner) e moltiplicando il risultato ottenuto per 1,4-1,5. Le proteine andrebbero fornite ad una velocità di 1,5-2 g/Kg/die, regolabile sulla base della valutazione del bilancio dell'azoto.

Infine, i pazienti devono essere monitorati per intercettare precocemente eventuali segni di sepsi, che sono peculiari nei pazienti con lesioni da ustioni, come: la diminuzione della conta piastrinica, un'intolleranza alimentare, la riduzione della produzione di urina, l'acidosi e alterazioni respiratorie. Fatta la diagnosi di sepsi, con criteri specifici per il paziente ustionato, è necessario un

trattamento precoce e aggressivo con antibiotici ad ampio spettro, seguito da una riduzione della copertura antibiotica (terapia mirata) in base ai risultati dell'emocoltura. Per la profilassi della sepsi invece gli antibiotici sistemici si sono rivelati inefficaci e dannosi: infatti aumentano il rischio, in caso di eventuale sepsi, di isolare batteri multiresistenti.

#### *e. Fase V: riabilitazione*

Già durante il ricovero di un paziente con gravi lesioni da ustione, un *team* multidisciplinare di operatori sanitari dovrebbe pianificare un percorso di riabilitazione che abbia come obiettivo la "sopravvivenza funzionale"; per la riabilitazione è fondamentale il ruolo di fisiatristi e fisioterapisti che devono integrare la terapia medica.

Per esempio, già al momento del ricovero, è possibile, anche in pazienti intubati, ridurre la contrattura della lesione da ustione, minimizzare l'edema, migliorare l'attecchimento dell'innesto e migliorare i risultati funzionali (Lester 2013, Nedelec 2012), per mezzo di interventi semplici come il corretto posizionamento degli arti (in posizione anti-contrattura) e l'immobilizzazione.

La terapia occupazionale, la terapia fisica e la mobilizzazione sono elementi terapeutici cruciali: consentono di migliorare la rigidità articolare, prevenire l'ossificazione eterotopica, migliorare la funzione di muscoli e tendini, diminuire la risposta ipermetabolica (Porter 2016). Di conseguenza, l'esercizio e la terapia dovrebbero essere iniziati il prima possibile e la mobilizzazione dovrebbe iniziare immediatamente dopo il ricovero, mantenendo per il più breve tempo possibile le restrizioni di movimento dopo l'intervento (Hart 2000).

Non sorprende che il costo psicosociale delle lesioni gravi sia elevato per i pazienti e le loro famiglie (Wiechman 2004). Per questo motivo, è consigliabile includere nel team multidisciplinare anche gli assistenti sociali e gli psicologi. La fase V è stata per molto tempo trascurata o addirittura ignorata: solo da poco tempo ne è emersa l'importanza sui risultati a lungo termine (Amtmann 2020, Wiechman 2018).

## 8. Qualità della vita

La qualità della vita correlata alla salute (HRQOL) è un concetto multidimensionale che riflette la percezione di un individuo di come una condizione medica (nel nostro caso le ustioni) influisca sul benessere fisico, psicologico, emotivo e sociale (Ravenek 2013); essa rappresenta una variabile sempre più studiata dopo una lesione da ustioni, sia a breve che a lungo termine (Miller 2013), mediante diversi questionari come il *Burn-Specific Health Scale–Brief* (BSHS), il *Medical Outcomes Survey Short Form-36* (SF-36) e l'*EuroQol* (EQ-5D). Nonostante i limiti sul piano della psicomетria e della riproducibilità dei risultati, questi strumenti sono utili per valutare la prognosi e la qualità della vita dopo una lesione da ustione.

Si osserva, negli adulti, dopo una lesione da ustione un peggioramento della HRQOL nel primo anno (Wasiak 2017) e dopo 10 anni (Chin 2018); inoltre, sebbene la HRQOL migliori nel tempo nel complesso, alcuni domini, tra cui quello emotivo, l'ansia, la depressione, il dolore o il disagio, dimostrano un ritorno ritardato al basale (Spronk 2018). In sintesi, rispetto alla popolazione generale, i pazienti che subiscono gravi ustioni riportano una qualità della vita inferiore, in particolare correlata ad ansia e depressione, dolore e disagio (Spronk 2019, Öster 2011). Anche la durata del ricovero in terapia intensiva e le complicanze mediche durante la degenza rappresentano dei fattori che impattano negativamente sulla qualità di vita dopo la dimissione.

Anche i pazienti con lievi lesioni da ustioni riportano più ansia e depressione rispetto alla popolazione generale, nonostante abbiano nel complesso una HRQOL comparabile (Spronk 2019). Una revisione di 19 studi (Spronk 2018) ha dimostrato che sono fattori predittivi di una peggiore HRQOL: la gravità dell'ustione, la depressione post-ustione, i sintomi dello stress post-traumatico, le condotte di evitamento, il minore supporto emotivo o sociale, un livello più elevato di nevrosi, e la disoccupazione.

Da tutti questi dati emerge la fondamentale importanza degli aspetti di salute mentale nei sopravvissuti a lesioni da ustioni.

Anche nella popolazione pediatrica sono emersi risultati analoghi; anche in questo caso impattano sulla HRQOL i seguenti fattori: dimensioni e profondità delle ustioni, durata della degenza ospedaliera, presenza di ustioni a faccia e mani, comorbidità e lunghi tempi di recupero (Spronk

2018). I bambini e gli adolescenti sembrano avere continui problemi con i cambiamenti di aspetto e i genitori non nascondono le preoccupazioni relative ai loro figli dopo un infortunio da ustioni.

Valutare la qualità della vita nei bambini, soprattutto di età inferiore ai 12 anni, è complesso e non sempre l'intervista ai genitori corrisponde alla percezione individuale della qualità della vita. Pertanto, questi risultati riferiti dai genitori dovrebbero sempre essere interpretati con cautela.

A qualsiasi età, un importante indicatore della qualità della vita dopo il trattamento di lesioni da ustioni è rappresentato dal ritorno al lavoro (o a scuola); infatti il lavoro non è solo una fonte di reddito ma rappresenta la prova dell'integrazione e della partecipazione alla vita di una comunità. Due review sistematiche hanno mostrato che il 66–74% dei sopravvissuti alle ustioni è tornato a qualsiasi forma di lavoro dopo 1-24 mesi dall'ustione (Mason 2012, Quinn 2010). I fattori predittivi del ritorno al lavoro sono: gravità dell'ustione, durata della degenza ospedaliera, età, fattori psicosociali e legati al lavoro (Mason 2012, Quinn 2010). Ad esempio, uno studio monocentrico in Europa ha mostrato un tasso di ritorno al lavoro dopo lesioni da ustioni del 92%, e in questo campione l'estensione media delle ustioni era dell'8% della TBSA; da altri studi emerge che all'aumentare dell'estensione della lesione diminuiscono i tassi di ritorno al lavoro (Goei 2016).

Indipendentemente da ciò, l'onere economico delle ustioni è notevole: in uno studio europeo il numero medio di giorni di assenza dal lavoro era di 59,3 per paziente e il costo medio dovuto alla perdita di produttività era di 11.916 € per paziente (Goei 2016).

Sono pochi i dati di letteratura che valutano i tempi di rientro a scuola: una review ha mostrato che nei bambini di età compresa tra 6 e 18 anni, con lesioni che si estendevano in media per il 14,3% della TBSA, il tempo medio di ritorno a scuola era di 10,5 giorni; tale intervallo di tempo aumentava nei pazienti di sesso maschile, con l'aumentare dell'età e della durata della degenza ospedaliera (Christiansen 2007). Una recente review della letteratura ha sottolineato il ruolo fondamentale di un programma di reinserimento scolastico, predisposto e strutturato, nel facilitare l'educazione del personale docente (Pan 2018); infatti, gli insegnanti svolgono un ruolo centrale nel facilitare il reinserimento sociale dopo un infortunio da ustioni (Pan 2018).

Infine, da pubblicazioni recenti sulle conseguenze mediche a lungo termine delle lesioni da ustioni (Mason 2017), emerge un aumento generale, a prescindere dalla gravità dell'ustione, della

morbilità e della mortalità a lungo termine in tutte le fasce di età, nonché un aumentato rischio di ricovero ospedaliero, ricovero a lungo termine e degenza prolungata per malattie muscoloscheletriche (Duke 2015, Randall 2015, Polychronopoulou 2018). I pazienti adulti con lesioni da ustioni e i pazienti con trauma hanno mostrato elevati tassi di riammissione in ospedale dopo l'incidento per eventi cardiovascolari, e una maggiore incidenza di ricoveri correlati al diabete mellito nei primi 5 anni dopo l'incidento (Duke 2018). I bambini con lesioni da ustioni avevano un tasso di mortalità a lungo termine 1,6 volte maggiore rispetto ai bambini senza lesioni da ustione (Duke 2015).

## **9. Prospettive future**

La conoscenza delle lesioni da ustione dovrà perfezionarsi sul piano epidemiologico, diagnostico, terapeutico e di definizione dei fattori di rischio e prognostici.

Da un punto di vista epidemiologico, bisognerebbe conoscere in maniera più approfondita le conseguenze sociali ed economiche delle ustioni e, in generale, tutte le sue conseguenze a livello globale; questo potrebbe portare a benefici per il trattamento e la prevenzione delle ustioni. Per raccogliere in maniera sistematica i dati epidemiologici è indispensabile il ruolo di enti internazionali come l'OMS e l'*International Society for Burn Injuries*; attualmente l'OMS sta guidando un'importante iniziativa di controllo del fenomeno ustioni che non richiede risorse considerevoli per la strutturazione dei dati.

Inoltre, lo sviluppo di registri internazionali delle ustioni faciliterebbe una migliore comprensione delle cause delle lesioni da ustioni in molte popolazioni vulnerabili e determinerebbe un aumento di consapevolezza e conoscenza sull'argomento, indispensabili per mettere in atto misure di prevenzione. I dati da raccogliere dovrebbero includere informazioni sul numero di incidenti, sugli individui a rischio e sui fattori di rischio, per identificare le popolazioni vulnerabili, che in secondo momento potrebbero essere i destinatari di strategie di prevenzione.

Da un punto di vista diagnostico bisogna implementare i metodi di misurazione della dimensione e della profondità dell'ustione, fondamentale per porre indicazione al trattamento conservativo o chirurgico; come già detto, sono stati introdotti nuovi strumenti, molti dei quali basati sulla tecno-

logia laser o di *imaging* termico, per esaminare la perfusione cutanea e quindi per determinare la profondità dell'ustione (Wearn 2018); il laser Doppler è un esempio promettente, ma altre metodiche stanno emergendo. Inoltre, l'accurata stima della dimensione dell'ustione è particolarmente impegnativa nei pazienti con cachessia o obesità: anche in questo senso si stanno sviluppando numerosi strumenti diagnostici di supporto (Parvizi 2016).

Un'altra sfida è rappresentata dalla definizione della prognosi: occorre sviluppare in tal senso strumenti di medicina personalizzata che considerino la variabilità tra i pazienti e la loro personale risposta allo stress fisiopatologico da ustione. Ad esempio, la sepsi e l'insufficienza multiorgano sono le principali cause di mortalità nei pazienti dopo una lesione da ustione, ma i medici non dispongono di un mezzo accurato per diagnosticare, e tanto meno prevedere, la sepsi; in uno studio si è riusciti a prevedere la sepsi con una precisione del 100% durante il primo intervento chirurgico utilizzando l'analisi della citofluorimetria a flusso del tessuto adiposo (Chen 2018): sebbene questi risultati siano molto promettenti, lo studio ha incluso solo 37 pazienti e questa tecnologia non può essere facilmente impiegata in tutti i centri ustioni. Tuttavia, molti altri studi stanno sviluppando strumenti predittivi di sepsi, insufficienza multiorgano e morte dopo una lesione da ustione: quando potremo ottenere previsioni accurate, la sfida sarà quella di cambiare la traiettoria degli eventi e prevenire queste temibili complicanze. Da uno studio multicentrico, il *Glue Grant trial* (Finnerty 2012, Finnerty 2013, Seok 2013), che sta esaminando i cambiamenti genomici e proteomici dopo lesioni da ustioni, stanno emergendo dati sostanziali che miglioreranno le nostre conoscenze sulla medicina personalizzata.

Dal punto di vista terapeutico, in acuto, bisogna personalizzare ancora di più la terapia in rianimazione, soprattutto quella infusione, e comprendere per ogni paziente il volume e la composizione di fluidi da infondere. Una tecnologia recente è il "burn navigator", che, dopo aver determinato alcuni parametri emodinamici valutando l'output urinario, regola automaticamente il volume di fluidi da infondere (Cancio 2016, Serio-Melvin 2017). Questa tecnologia ha certamente un potenziale, ma l'output urinario non è ideale in quanto dipende da diverse variabili e può essere fuorviante nel determinare i parametri emodinamici da raggiungere.

Un altro passo avanti nella terapia può essere dato dalla recente scoperta della transdifferenzia-

zione del tessuto adiposo bianco in bruno dopo le ustioni, determinata da infiammazione o upregolazione della proteina 1 disaccoppiante il grasso bruno mitocondriale (che è responsabile della respirazione termogenica), sembra indurre cambiamenti metabolici e immunitari che aumentano ulteriormente l'ipermetabolismo e la disfunzione immunitaria (Sidossis 2015, Patsouris 2015): questa è una strada che può portare a nuove opzioni di trattamento per abolire o ridurre la risposta ipermetabolica.

Un'altra area promettente è rappresentata dai sostituti cutanei artificiali, la cui applicazione nei pazienti con ustioni, sebbene ancora limitata da costi, tempo di lavoro e disponibilità, ha cambiato notevolmente la gestione delle ustioni molto estese (Sheikholeslam 2018). Altre prospettive future sono rappresentate dalle cellule staminali (Amini-Nik 2018) e dalla stampa 3D di cellule autotone (Hakimi 2018).

Un altro obiettivo importante sarà comprendere quali siano i mediatori chimici, prodotti in una ferita aperta da 2-3 settimane, a indurre la formazione cicatrici ipertrofiche: questo permetterebbe di contenere il problema più devastante per i sopravvissuti all'ustione, ovvero la formazione di cicatrici.

Un'ultima sfida è rappresentata dalla riabilitazione: come già detto è infatti superata la convinzione storica che una volta che le ferite da ustioni siano guarite, il paziente sia guarito. Infatti i sopravvissuti alle ustioni hanno una mortalità sostanzialmente maggiore rispetto alla popolazione generale, con un rischio di morte aumentato durante il primo anno dopo l'infortunio (in calo ogni anno successivo), e una qualità di vita ridotta (Mason 2017, Mason 2019). E' pertanto necessario soddisfare i bisogni assistenziali dei pazienti e diagnosticare, curare e prevenire le morbidità a lungo termine.

In conclusione la risposta fisiopatologica a una lesione da ustioni è molto complessa, così come l'approccio terapeutico. Nonostante i recenti progressi in termini di sopravvivenza, la cura delle ustioni deve ulteriormente implementarsi nei prossimi decenni e le nuove tecnologie devono essere integrate in tutte le fasi del processo diagnostico-terapeutico per migliorare ulteriormente la prognosi.

## Capitolo 2

### *Efficacia della tigeciclina nella guarigione delle ustioni infettate da stafilococco aureo meticillino-resistente*

#### **1. Introduzione**

Tra le complicanze riscontrabili nei pazienti trattati nei centri ustioni, come già detto, ricordiamo l'immunosoppressione, la sepsi e il ritardo nella guarigione della lesione da ustione. In particolare, la lesione da ustione rappresenta un sito suscettibile di colonizzazione opportunistica da parte di organismi di origine endogena ed esogena; infatti, una delle principali cause di morbilità e mortalità nei pazienti ustionati è proprio *Staphylococcus aureus*, un batterio della normale flora cutanea (Elsner 2006, Guggenheim 2009, Owens 2008), che però nei pazienti con lesioni da ustione può anche essere acquisito dall'ambiente e dalle mani degli operatori sanitari (Cook 1998).

Una lesione da ustione può essere considerata come un terreno di coltura per i batteri, in cui peraltro, a causa della depauperazione dei vasi, viene ostacolato l'arrivo dei componenti del sistema immunitario per mezzo del torrente ematico: questo favorisce la rapida disseminazione di *S. aureus* dai siti della ferita ustionata agli organi a distanza (Guggenheim 2009, Altoparlak 2004, Appelgren 2002, de Macedo 2003).

Inoltre, numerosi sono i fattori di rischio per lo sviluppo della colonizzazione e dell'infezione da parte di *S. aureus* meticillino-resistente (MRSA) (Cook 1998, Phillips 1992) quali: l'interruzione della normale barriera cutanea, lo stato di immunodepressione (Guggenheim 2009, Appelgren 2002, Santucci 2003), l'ospedalizzazione prolungata e la terapia antibiotica. Queste infezioni sono responsabili di un aumento della mortalità, della morbilità, e del costo e della durata della degenza in ospedale.

Al momento, nessuna classe di antibiotici è uniformemente efficace contro *S. aureus* (Enright 2010). La resistenza da parte dei batteri agli antibiotici maggiormente utilizzati in terapia ha reso indispensabile lo sviluppo di nuove molecole con meccanismi d'azione alternativi agli antibiotici

comunemente utilizzati (Metzger 2009). In particolare, la tigeciclina ha rappresentato una promettente terapia, efficace nei confronti delle infezioni da Gram-positivi delle ustioni (Arbeit 2004, Erol S2004, Steenbergen JN 2005). Infatti, la tigeciclina è una nuova glicilcilina, un derivato della tetraciclina, con un'azione antibiotica ad ampio spettro, che include: Gram-positivi, Gram-negativi, atipici, anaerobici e organismi antibiotico-resistenti (Peterson 2008, Steenbergen 2009). Nonostante i progressi nella cura dei pazienti ustionati, restano ancora molti problemi associati al processo di guarigione delle ferite, un processo complesso in cui sono coinvolti eventi biochimici e cellulari coordinati tra loro al fine di ripristinare l'integrità dei tessuti dopo la lesione. Il rimodellamento tissutale è regolato: dalle proteinasi e dai loro inibitori che ne modulano i livelli di espressione (Birkedal-Hansen 1995, Parks 1999). In particolare, si ritiene che un importante ruolo nel rimodellamento della membrana basale venga svolto dalla metalloproteinasi-9 (MMP-9) della matrice extracellulare, che riconosce come substrati diverse proteine della matrice extracellulare, come il collagene di tipo IV (Seltzer 1989).

La sintesi e la secrezione di MMP-9 sono strettamente controllate e possono essere indotte da molteplici stimoli fisiologici, tra cui citochine, chemochine e fattori di crescita. Inoltre, è noto che la produzione cellulare di MMP-9 è modulata anche da fattori stress-correlati fisici e chimici, come le specie reattive dell'ossigeno, le variazioni del pH, le radiazioni UV e i raggi X (Ries 2009, Han 2002).

Si è osservato che durante lo sviluppo embrionale e nel danno tissutale, c'è un'espressione transitoria della pro-MMP-9, che diminuisce al progredire del rimodellamento tissutale (Salo 1994, Young 1994, Tarlton 1997). Tuttavia, in caso di infiammazione prolungata, la proMMP-9 viene rapidamente convertita nella forma attiva o matura (82 kDa) (Wysocki 1993, Ladwig 2002).

A conferma del ruolo complessivamente positivo delle MMP nella guarigione delle ferite, è stato dimostrato che le ferite trattate con inibitori delle MMP guariscono più lentamente (Agren 2001). Tuttavia si è osservato un ritardo nella guarigione della ferita anche in caso di sovraespressione delle MMP, indicando che la loro attività enzimatica deve essere bilanciata per favorire la normale guarigione delle ferite (Page-McCaw 2009).

I modelli animali consentono di studiare dettagliatamente il processo di guarigione delle ferite e consentono di superare i limiti imposti dall'etica sull'uso di volontari umani; inoltre consentono di anticipare i risultati clinici (Bjellerup 2005, Vaingankar 2001).

L'obiettivo del presente studio è valutare l'efficacia della tige ciclina, *in vivo*, in modelli sperimentali murini con ustioni cutanee a tutto spessore infettate da MRSA. Oltre all'attività antibatterica, sono state valutate alcune caratteristiche morfologiche della guarigione delle ferite (grado di ri-epitelizzazione, formazione del tessuto di granulazione e organizzazione del collagene) e l'espressione immunohistochimica della MMP-9 e del collagene di tipo IV, per comprendere meglio come l'azione della tige ciclina sulla guarigione delle lesioni da ustione infette.

## **2. Metodi**

### *a. Organismi e animali*

Come patogeno è stato utilizzato l'MRSA ATCC 43300 disponibile in commercio. I modelli murini selezionati per lo studio sono invece ratti maschi Wistar, del peso di 220-320 g, alloggiati in gabbie individuali a temperatura costante di 22° C e umidità costante, con un ciclo luce/buio di 12 ore (luce dalle 06:30 alle 18:30). I ratti sono stati alimentati con acqua e cibo *ad libitum* durante lo studio. Lo studio è stato approvato dal comitato etico per la ricerca sugli animali dell'IRRCS-INRCA di Ancona (Italia).

### *b. Farmaci e determinazione della MIC*

Sono stati utilizzati la tige ciclina [Pfizer Italia, Aprilia (LT)] e la teicoplanina (Aventis Pharma SpA, Roma, Italia), diluite in base alle raccomandazioni dei produttori che hanno prodotto soluzioni stock di 10 mg/ml. Le soluzioni sono state rese fresche il giorno del saggio o conservate al buio a -80° C per brevi periodi. L'intervallo di concentrazione saggiato per determinare la MIC era di 0,25–256 mg/L.

La minima concentrazione inibente (MIC) è stata determinata secondo le procedure codificate dal CLSI (NCCLS 2003). È stata assunta come la più bassa concentrazione di farmaco a cui era inibita la crescita; gli esperimenti sono stati eseguiti a dosi triplicate (3 volte la MIC).

### *c. Preparazione degli inoculi*

I batteri sono stati coltivati in agar cuore-cervello e, giunti alla fase di crescita logaritmica, la sospensione è stata centrifugata a 1000 giri per 15 minuti, il surnatante è stato scartato e i batteri sono stati risospesi e diluiti in soluzione salina sterile per raggiungere una concentrazione di  $5 \times 10^7$  cfu/ml.

### *d. Protocollo sperimentale*

Gli animali sono stati randomizzati e divisi in quattro gruppi sperimentali (12 animali per ciascun gruppo). Lo studio ha incluso un gruppo di controllo che non ha ricevuto alcun trattamento, un gruppo infettato che non ha ricevuto alcun trattamento, e due gruppi infettati che sono stati trattati, rispettivamente con iniezione intraperitoneale di tigeclina (2 mg/kg) e teicoplanina (7 mg/kg).

La teicoplanina è stata scelta perché nella pratica clinica viene applicata nelle infezioni più importanti e nel trattamento dell'MRSA.

I ratti sono stati anestetizzati mediante iniezione intramuscolare di ketamina/xilazina (rispettivamente 40 e 13 mg/kg) e la superficie posteriore del corpo è stata rasata e lavata con una soluzione di idio povidone. Una barra di rame (12×12 mm) riscaldata in acqua bollente (100° C per 10 minuti) è stata posizionata su ciascun animale a livello paraspinale per 40 secondi senza esercitare nessuna pressione: è stato utilizzato il solo peso del blocco per generare le ustioni. Dopo aver riscaldato la sonda in acqua bollente, è stata realizzata una seconda ustione sull'altro lato della schiena il più simmetricamente possibile. L'applicazione della barra ha prodotto due aree di ustione a tutto spessore (zona di coagulazione). Tutte le ustioni sono state indotte dallo stesso operatore al fine di evitare variazioni nella creazione delle lesioni stesse.

E' stata quindi posizionata una piccola garza su ogni ustione in cui sono state poi inoculate  $5 \times 10^7$  ufc di *S. aureus* ATCC 43300; la tasca è stata chiusa per mezzo di clip cutanee. Questa procedura determina un'infezione locale entro 24 ore, dopo le quali, negli animali controllo è stata aperta l'ustione, è stata rimossa la garza per coltura batterica quantitativa ed è stato avviato il trattamento con somministrazione quotidiana di antibiotici intraperitoneali per 21 giorni.

Durante l'intervento chirurgico, la temperatura corporea degli animali è stata mantenuta a 36-37 °C usando una coperta omeotermica (Harvard Apparatus). I ratti sono stati quindi rianimati con una soluzione di 1 mL di Ringer lattato somministrata mediante iniezione intraperitoneale, e riportati nelle loro gabbie. Per proteggere la lesione, è stata applicata una benda di tessuto e gli animali sono stati riposizionati nelle gabbie ed esaminati ogni giorno.

Per mimare la situazione clinica dei pazienti ustionati, il *debridement* chirurgico è stato eseguito 48 ore dopo la lesione: sotto anestesia generale con isoflurano, sono stati asportati la cute e il sottocutaneo nell'area dorsale fino ai bordi dell'ustione e alle fasce dei muscoli cutanei. Questa procedura mira a ridurre l'elevato rischio di colonizzazione della ferita e di formazione di cicatrici ipertrofiche. Durante l'intervento chirurgico, la temperatura corporea degli animali è stata mantenuta a 36-37° C usando una coperta omeotermica. Le ferite sono state lasciate guarire per seconda intenzione (cioè i bordi della ferita non sono stati chiusi con suture) ed è stata applicata una garza sterile idratata per proteggere le ferite da contaminazioni e infezioni esterne. Gli animali sono stati riposizionati in gabbie singole ed esaminati accuratamente ogni giorno. Secondo il metodo descritto da Morton e Malone (Morton 1972), ogni ferita è stata valutata ogni 3 o 4 giorni per 21 giorni dopo l'escissione. Il cambio della medicazione è stato effettuato ogni 2 giorni previa anestesia generale con isoflurano. Dopo ogni misurazione, la medicazione è stata rimossa e la ferita è stata sciacquata con una garza sterile bagnata con soluzione fisiologica.

Completata la guarigione, sono stati prelevati da ciascuna area trattata campioni di tessuto che sono poi stati processati per l'analisi morfologica. Tutti i ratti sono stati sacrificati alla fine dell'esperimento con eccesso di anestetico. I campioni di cute sono stati divisi in due pezzi: un pezzo (area centrale) è stato utilizzato per l'esame istologico, e l'altro è stato omogeneizzato in 1 mL di PBS. La quantificazione dei batteri vitali è stata eseguita coltivando diluizioni scalari (0,1 ml) della sospensione batterica su piastre di agar sangue. Tutte le piastre sono state incubate a 37° C per 48 ore e valutate per la presenza di batteri. Gli organismi sono stati quantificati contando il numero di cfu per piastra. Il limite di rilevazione per questo metodo era di 10 cfu/g. La tossicità è stata valutata sulla base della presenza di eventuali effetti avversi correlati al farmaco, cioè segni locali di infiammazione, anoressia, perdita di peso, diarrea, febbre e alterazioni comportamentali.

#### e. Escissione di biopsie cutanee

I campioni di cute sono stati prelevati chirurgicamente dalle ferite al momento dell'eutanasia a 7, 14 e 21 giorni dopo l'ustione e sono stati congelati in azoto liquido e conservati a -70° C. Sono state tagliate, usando un microtomo, delle sezioni spesse 5 micrometri di epidermide, derma e muscolo sottocutaneo del *panniculus carnosus*, che sono poi state asciugate all'aria durante la notte e quindi fissate in acetone per 10 minuti.

#### f. Valutazione istologica

Per valutare a livello istologico il processo di guarigione delle ferite da ustioni, le sezioni sono state colorate con ematossilina-eosina. Tutte le analisi successive sono state effettuate in singolo cieco cioè da un operatore a cui era ignoto il gruppo di trattamento di appartenenza del campione. I campioni sono stati osservati al microscopio ottico per valutare la progressione della riepitelizzazione, l'infiammazione, le risposte vascolari e la formazione di collagene nella ferita, a 7, 14 e 21 giorni dopo l'ustione, utilizzando il *grading system* a cinque livelli descritto in Tabella 1.

Score	Riepitelizzazione	Tessuto di granulazione	Deposizione di collagene
0	Tracce e migrazione focale	Tracce	Assente
1	Migrazione	Poche cellule e assenza di vasi	Tracce
2	Parziale	Molte cellule e pochi vasi	Lieve
3	Strato corneo parziale e ipertrofico	Molti fibroblasti, alcune fibre e alcuni vasi	Moderata
4	Completa	Più fibre e meno cellule	Marcata

**Tabella 1.** *Grading system* per la valutazione degli aspetti morfologici del processo di riparazione della ferita.

Inoltre, gli aspetti morfologici della neo-epidermide a 21 giorni (grado di riepitelizzazione, formazione del tessuto di granulazione e organizzazione del collagene, indicativi della maturità della riparazione della ferita) sono stati valutati sempre con questo *grading system* e sono stati confrontati tra tutte le categorie considerate nello studio (Simonetti 2008).

#### *g. Immunoistochimica*

In tutti i campioni, a 21 giorni dopo la lesione da ustioni, sono state applicate tecniche ancillari di immunoistochimica; le sezioni sono state incubate durante la notte a 48° C con i seguenti anticorpi monoclonali: anti-collagene di tipo IV (diluito 1:50; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) e anti-MMP9 (diluito 1:300; Abcam, Cambridge, UK).

La reazione è stata rilevata usando la streptavidina-biotina-perossidasi secondo le istruzioni del produttore (Dako Envision +/HRP peroxidase kit; Dako SpA, Milano, Italia).

Le sezioni sono state incubate con 3,3-diamminobenzidina (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) (0,05 mg di diamminobenzidina, 0,05 M, pH 7,6 e 0,01% di perossido di idrogeno) e contrastate con l'ematossilina di Mayer (Bio-Optica SpA, Milano, Italia). I controlli negativi sono stati sfidati con siero non immune, al posto dell'anticorpo primario.

L'immunocolorazione della MMP-9 è stata valutata nelle cellule epiteliali e mesenchimali, quella del collagene di tipo IV a livello della membrana basale. L'espressione del collagene di tipo IV è stata valutata sulla base della linearità e della continuità della membrana basale sottoepiteliale. Il numero di cellule MMP-9-positive è stato contato utilizzando un microscopio ottico Nikon Eclipse E600 (Nikon, DuSeldorf, Germania) con ingrandimento al  $\times 250$ , in campi selezionati nel contesto dell'area di riparazione della ferita in modo casuale, a partire dai margini del neoepidermide e proseguendo verso il centro della ferita. Sono state valutate le aree più positive, moderatamente positive e meno positive nella neoepidermide, in particolare a livello di epitelio e derma, incluso il tessuto di granulazione. Il numero di cellule colorate positive è stato espresso come percentuale delle cellule totali contate (1000 cellule).

#### *h. Analisi statistica*

L'analisi statistica gravita attorno alla valutazione dello score degli aspetti morfologici del processo di riparazione delle ferite. Tutti i risultati sono presentati come media  $\pm$  DS. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando i test ANOVA e Bonferroni per confrontare tutti i gruppi, e il Mann-Whitney U-test per confrontare il gruppo con ferite infette trattate con teicoplanina e quello con ferite infette trattate con tigeiciclina.

Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il pacchetto SPSS 16 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). La significatività statistica è considerata accettabile e il *P value* è inferiore di 0,05.

### 3. Risultati

#### *a. Coltura quantitativa dei tessuti asportati*

La tigeciclina e la teicoplanina avevano entrambe MIC di 1 mg/L. Il numero medio di batteri nei controlli infettati, ma non trattati ( $8,2 \times 10^7 \pm 2,1 \times 10^7$  cfu/mL) era significativamente più alto rispetto a quello di tutti i gruppi di trattamento. In particolare, la più alta inibizione della carica batterica è stata ottenuta nel gruppo che ha ricevuto la tigeciclina ( $2,4 \times 10^4 \pm 1,6 \times 10^4$  cfu/mL), mentre la teicoplanina ha ridotto il numero di batteri a  $3,7 \times 10^4 \pm 0,9 \times 10^4$  (v. Tabella 2).

<b>Gruppo di trattamento</b>	<b>cfu/mL</b>
Non infetto	<10
Infetto non trattato	$8,2 \times 10^7 \pm 2,1 \times 10^7$
Teicoplanina (7 mg/kg) <sup>a</sup>	$3,7 \times 10^4 \pm 0,9 \times 10^4$
Tigeciclina (2 mg/kg) <sup>a</sup>	$2,4 \times 10^4 \pm 1,6 \times 10^4$

**Tabella 2.** Coltura quantitativa dei tessuti asportati dopo somministrazione di tigeciclina e teicoplanina a 21 giorni. I gruppi trattati con antibiotici intraperitoneali hanno mostrato un miglioramento significativo rispetto ai gruppi non trattati. <sup>a</sup>ANOVA test,  $P < 0.001$ .

Nel corso di questi esperimenti, non sono stati osservati in alcun momento tra i ratti pattern anormali di comportamento, quali affaticamento, stress, aggressività, perdita di peso o cambiamenti nei movimenti. Infine, nessun animale ha mostrato segni di infezione più severa, come febbre, ascessi o segni di infiammazione.

#### *b. Esame istologico dei tessuti asportati*

L'impatto dei diversi regimi di trattamento sul processo di guarigione delle ferite a 7, 14 e 21 giorni dall'ustione è stato calcolato sotto forma di *score*, riassunto nella Tabella 3 e illustrato nella Figura 1. La Tabella 4 mostra invece i dati ricavati dall'analisi statistica degli *score* su grado di

riepitelizzazione, formazione del tessuto di granulazione e organizzazione del collagene, calcolati 21 giorni dopo l'ustione in tutte le categorie di ratti.

<b>Trattamento</b>	<b>7 giorni dopo l'ustione</b>	<b>14 giorni dopo l'ustione</b>	<b>21 giorni dopo l'ustione</b>
Non infetto	0/1	2	4
Infetto non trattato	0	1	2/3
Infetto trattato con teicoplanina	0/1	2	3/4
Infetto trattato con tigeciclina	0/1	2/3	4

**Tabella 3.** Riepilogo dello *score* di guarigione della ferita a 7, 14, e 21 giorni dopo l'ustione in modelli murini. Lo *score* è stato ottenuto valutando la progressione del neoepitelio, della infiammazione, delle risposte vascolari e della deposizione del collagene a livello della ferita, usando il sistema di classificazione a cinque livelli descritto nella Tabella 1.

A 7 giorni dall'ustione, tutte le biopsie hanno mostrato il distacco dell'epidermide dal derma. Sono stati osservati inoltre gravi danni che si estendono attraverso il derma al *panniculus carnosus* e cellule infiammatorie sulla superficie della lesione. In particolare, la risposta infiammatoria era più evidente nel gruppo di ratti infetti non trattati.

I ratti infetti, non trattati, mostravano il peggior processo di guarigione rispetto ai gruppi di non infetti e di infetti non trattati, con un marcato infiltrato infiammatorio e un tessuto di granulazione vagamente organizzato. A 7 giorni dall'ustione, lo *score* di guarigione della ferita per i ratti non infetti e quelli infetti trattati era 0/1, e per i ratti infetti non trattati era 0 (Tabella 3).

A 14 giorni dall'ustione, le biopsie dei ratti non infetti hanno mostrato aspetti morfologici di guarigione simili a quelle di ratti infetti trattati con teicoplanina. E' stata osservata una riepitelizzazione incompleta: l'epidermide neoformata conteneva diversi strati di cellule, senza caratteristiche di differenziazione. Il tessuto di granulazione era aumentato, con molte cellule e alcune fibre, e una leggera deposizione di collagene. Non vi è stata evidenza di una risposta infiammatoria e lo *score* di guarigione della ferita dei ratti infetti trattati con teicoplanina era 2 (Tabella 3).

A 14 giorni, nei ratti infetti trattati con la tigeciclina è stato osservato il miglior processo di guarigione, con ricostituzione del rivestimento epidermico, che appariva ipertrofico e con una lieve e focale cheratinizzazione. Il tessuto di granulazione era spesso, con molte cellule, e alcuni vasi e

fibre; la deposizione di collagene appariva ancora lieve. Nei ratti infetti trattati con tigeclina lo *score* di guarigione della ferita era di 2/3 (Tabella 3).

Nei ratti infetti senza trattamento è emersa infine una compromissione generale del processo di guarigione delle ferite, caratterizzato da una scarsa riepitelizzazione, un'evidente essudazione fibrinosa, un maggiore accumulo di tessuto di granulazione con alcune cellule e poche fibre, una risposta infiammatoria marcata e tracce di deposizione di collagene. A 14 giorni dall'ustione, in questo gruppo, lo *score* di guarigione della ferita era di 1 (Tabella 3).

A 21 giorni dall'ustione, le biopsie dei ratti non infetti e quelle dei ratti infetti trattati con tigeclina presentavano caratteristiche morfologiche simili: un'importante copertura epidermica, con ricostituzione del normale rivestimento epidermico ed evidente cheratinizzazione (*score* nei non infetti di  $3,25 \pm 0,40$  e negli infetti trattati con tigeclina di  $3,30 \pm 0,55$ ), un tessuto di granulazione spesso (*score* nei non infetti di  $2,80 \pm 0,37$  e negli infetti trattati con tigeclina di  $2,70 \pm 0,37$ ), una notevole riduzione dell'essudato fibrinoso e una regolare deposizione di collagene (*score* nei non infetti di  $2,50 \pm 0,60$  e negli infetti trattati con tigeclina di  $2,67 \pm 0,56$ ). (Tabella 4). Non è stata osservata un'evidente risposta infiammatoria. A 21 giorni dall'ustione, lo *score* di guarigione della ferita in questi ratti era di 4 (Tabella 3).

I ratti infetti trattati con teicoplanina hanno mostrato un rivestimento epiteliale continuo ma ipertrofico, con evidente cheratinizzazione (*score*:  $3,00 \pm 0,25$ ); il tessuto di granulazione era spesso (punteggio:  $2,50 \pm 0,40$ ) e le fibre di collagene erano più organizzate, ma ancora non regolari (punteggio:  $2,25 \pm 0,55$ ). Come nel gruppo di trattamento con la tigeclina, non è stata osservata un'evidente risposta infiammatoria. A 21 giorni dall'ustione, lo *score* di guarigione della ferita in questi ratti era di 3/4 (Tabella 3).

Confrontando lo *score* di guarigione della ferita tra il gruppo infetto trattato con teicoplanina e quello infetto trattato con tigeclina, si osserva una differenza statisticamente significativa nel punteggio di epitelizzazione ( $P=0.043$ ) e nell'organizzazione del collagene ( $P=0.040$ ) (Tabella 4).

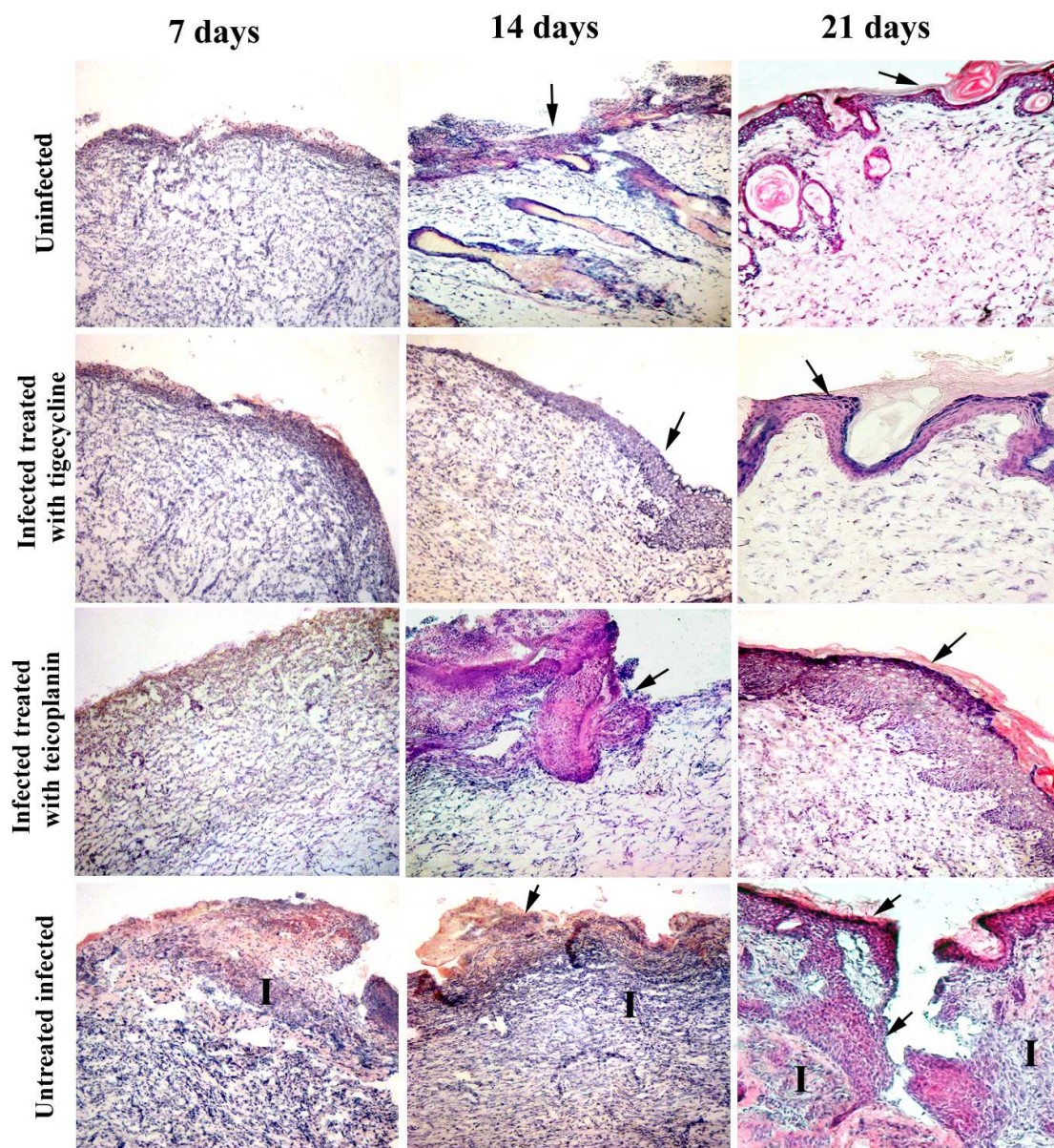
Al contrario, 21 giorni dall'ustione, i ratti infetti non trattati mostravano una riepitelizzazione incompleta, con un rivestimento epiteliale non continuo, marcatamente ipertrofico e poco organizzato in strati ben differenziati (*score*:  $2.20 \pm 0.10$ ). Si sono osservati: una risposta infiammatoria

marcata, un aumento del tessuto di granulazione con molte cellule (*score*:  $1,60 \pm 0,50$ ), poche fibre e una modesta deposizione di collagene (*score*:  $1,50 \pm 0,45$ ) (Tabella 4). Lo *score* di guarigione della ferita in questi ratti era di 2/3 (Tabella 3).

Dall'analisi statistica, confrontando i ratti infetti non trattati con quelli infetti trattati (sia con tige-  
ciclina sia con teicoplanina), emerge che entrambi i regimi di trattamento hanno influenzato posi-  
tivamente e in maniera statisticamente significativa il processo di riparazione della ferita ( $P < 0,05$ ;  
Tabella 4).

<b>Modello murino</b>	<b>Score epitelizzazione</b>	<b>Score tessuto di granulazione</b>	<b>Score organizza- zione del collagene</b>
Non infetto	$3,25 \pm 0,40$	$2,80 \pm 0,37$	$2,5 \pm 0,60$
Infetto non trattato	$2,20 \pm 0,10$	$1,60 \pm 0,50$	$1,50 \pm 0,45$
Trattato con teicoplanina	$3,00 \pm 0,25^a$	$2,50 \pm 0,40^a$	$2,25 \pm 0,55^a$
Trattato con tige- ciclina	$3,30 \pm 0,55^a$	$2,70 \pm 0,37^a$	$2,67 \pm 0,56^a$
Test ANOVA e Bonferroni, $P < 0,05$	Non infetto, teico- planina, tige- ciclina vs infetto	Non infetto, teico- planina, tige- ciclina vs infetto	Tige- ciclina vs in- fetto
<sup>a</sup> Mann-Whitney U-test, $P < 0,05$	Teicoplanina vs ti- ge- ciclina, <sup>a</sup> $P = 0,043$	Teicoplanina vs ti- ge- ciclina, <sup>a</sup> $P = 0,058$	Teicoplanina vs ti- ge- ciclina, <sup>a</sup> $P = 0,04$

**Tabella 4.** Valutazione statistica dei parametri di guarigione delle ferite a 21 giorni dall'ustione in modelli murini. Il grado di riepitelizzazione, la formazione del tessuto di granulazione e l'organizzazione del collagene a 21 giorni, indicativi della maturità del processo di riparazione della ferita, sono stati valutati con lo score e confrontati tra tutti i gruppi di studio. I test ANOVA e Bonferroni sono stati utilizzati per confrontare tutti i gruppi. <sup>a</sup>Il Mann-Whitney U-test è stato utilizzato per confrontare il gruppo trattato con teicoplanina con quello trattato con tige-  
ciclina.



**Fig. 1.** Cambiamenti morfologici del processo di guarigione delle ferite nei modelli murini (ematossilina ed eosina; ingrandimento originale:  $\times 150$ ). A 7 giorni dopo l'ustione, tutte le biopsie hanno mostrato: distacco dell'epidermide dal derma, tessuto di granulazione con poche cellule e vasi, infiltrato infiammatorio nel derma (I), soprattutto nel gruppo infetto non trattato. A 14 giorni dall'ustione, le biopsie del gruppo non infetto e di quello trattato con teicoplanina hanno mostrato simili aspetti di riparazione: riepitelizzazione incompleta ( $\hat{u}$ ), aumento del tessuto di granulazione e leggera deposizione di collagene con una modesta risposta infiammatoria]; i ratti infetti trattati con tigeciclina hanno mostrato una ricostituzione del rivestimento epidermico, sebbene ipertrofico ( $\hat{u}$ ) e tessuto di granulazione denso, ma ancora una leggera deposizione di collagene; e i ratti infetti non trattati hanno mostrato scarsa riepitelizzazione ( $\hat{u}$ ), maggiore accumulo di tessuto di granulazione, robusta risposta infiammatoria (I) e presenza di collagene in tracce. A 21 giorni dopo la lesione da ustioni, i gruppi non infetti e quelli trattati con tigeciclina hanno mostrato caratteristiche morfologiche simili [rivestimento epidermico spesso con evidente cheratinizzazione ( $\hat{u}$ ), deposizione regolare di collagene e scarsa risposta infiammatoria]; nei ratti trattati con teicoplanina si sono osservati: epitelio ispessito ( $\hat{u}$ ), tessuto di granulazione denso, fibre di collagene organizzate ma ancora non regolari e scarsa risposta infiammatoria; i ratti infetti non trattati mostravano epitelio altamente ipertrofico e mal organizzato ( $\hat{u}$ ), tessuto di granulazione con un'evidente risposta infiammatoria (I) e deposizione irregolare di collagene.

c. Valutazioni immunoistologiche

I risultati dell'analisi immunoistochimica sono mostrati nella Tabella 5.

Modello murino	Collagene di t. IV		MMP-9
	Membrana basale	Cellule epiteliali media % $\pm$ DS	Cellule dermiche media % $\pm$ DS
Non infetto (1)	Regolare	10 $\pm$ 2,25	30 $\pm$ 3,5
Infetto non trattato (2)	Irregolare	60 $\pm$ 2,0	90 $\pm$ 4,8
Trattato con teicoplanina (3)	Regolare	30 $\pm$ 8,9	65 $\pm$ 3,6
Trattato con tigeiciclina (4)	Regolare	20 $\pm$ 2,7	50 $\pm$ 4,9
Test ANOVA e Bonferroni, P<0.05		2 vs 1, 3, 4; 4 vs 1; 4 vs 3	2 vs 1, 3, 4; 4 vs 1; 4 vs 3

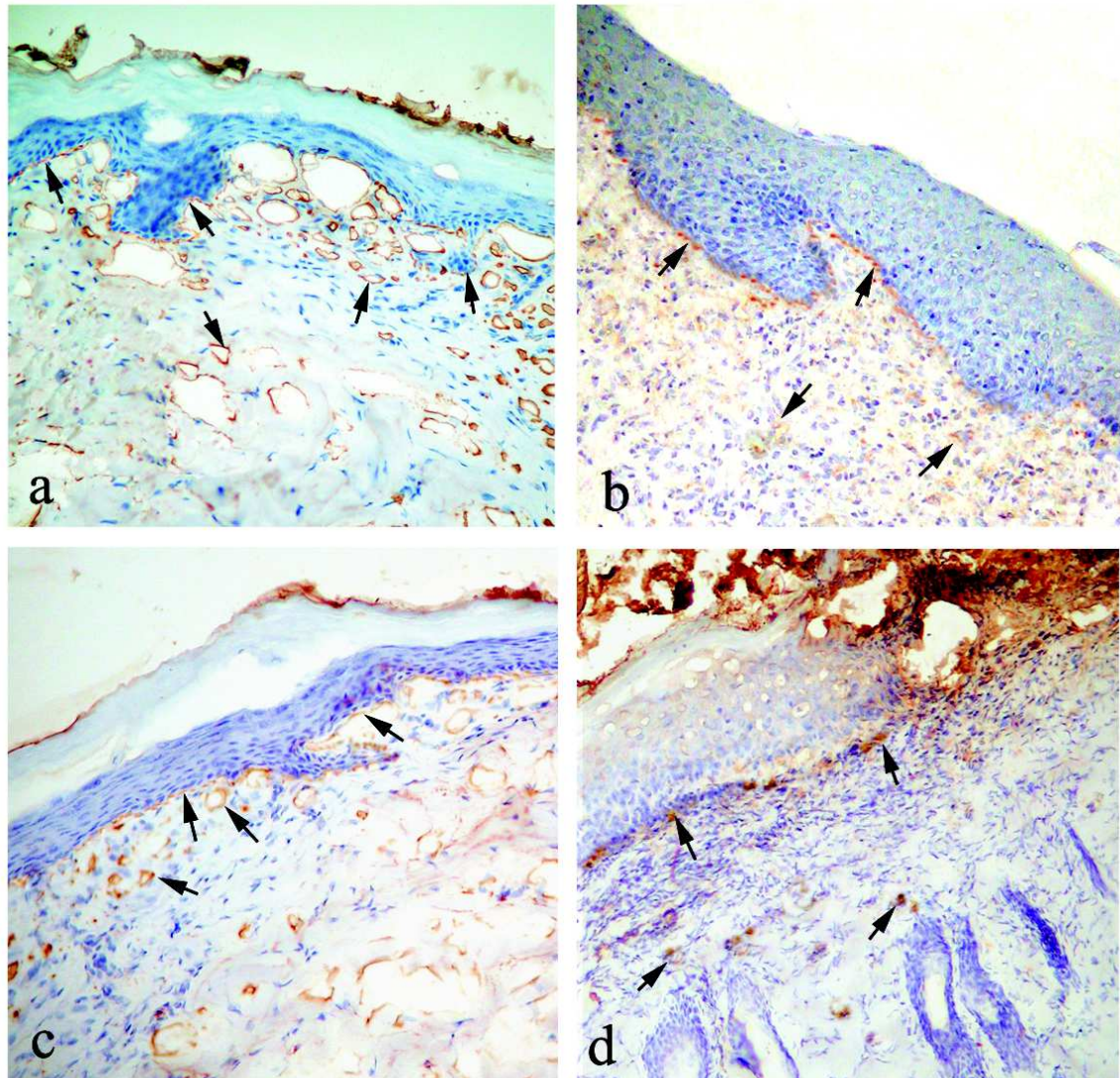
**Tabella 5.** Espressione immunoistochimica del collagene di tipo IV e della MMP-9 nella cute di ratto a 21 giorni dall'ustione. I valori rappresentano il numero di cellule colorate positive stimate come media percentuale delle cellule totali contate (1000 cellule). I numeri 1, 2, 3 e 4 corrispondono ai numeri tra parentesi della colonna "Modello murino".

Per valutare la presenza di una membrana basale, le sezioni sono state trattate con anticorpi contro il collagene di tipo IV. Nei ratti non infetti (Figura 2a) e infetti trattati con teicoplanina (Figura 2b) e tigeiciclina (Figura 2c), il collagene di tipo IV era localizzato in maniera analoga a livello giunzione dermoepidermica e della lamina basale dei capillari; inoltre, negli stessi gruppi di ratti è stata osservata una membrana basale ininterrotta. Al contrario, nei ratti infetti non trattati (Figura 2d), l'espressione di collagene di tipo IV a livello della giunzione dermoepidermica e della lamina basale dei capillari era focale e irregolare.

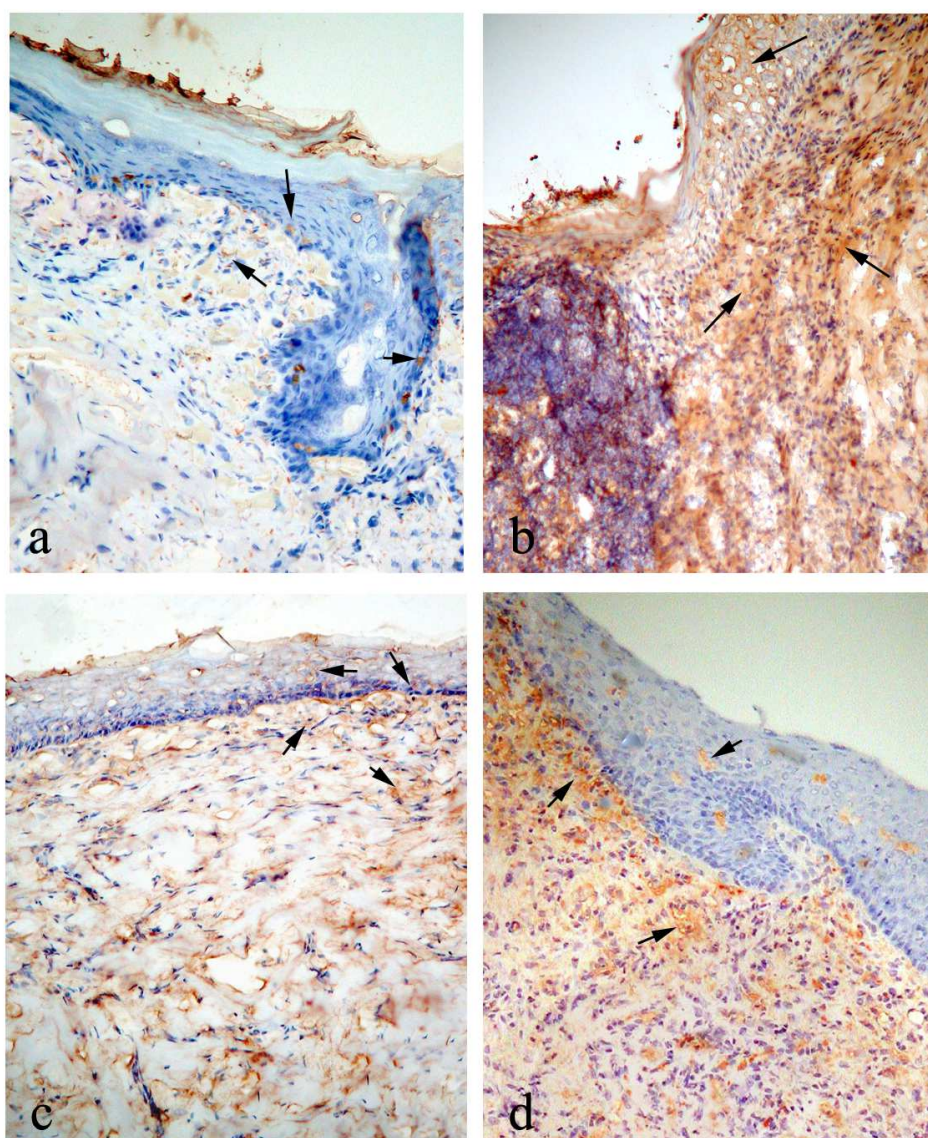
Invece, per quanto riguarda l'espressione della MMP-9, nei ratti non infetti è stata osservata una debole espressione della MMP-9 sia nell'epitelio, specialmente a livello dello strato basale (10  $\pm$  2,25), sia nel derma (30  $\pm$  3,5) (Figura 3a).

Nei ratti infetti non trattati, si è invece osservata una notevole espressione epiteliale e dermica della MMP-9, significativamente aumentata rispetto agli altri gruppi di ratti (60  $\pm$  2,0 e 90  $\pm$  4,8, rispettivamente; P<0,05); nell'epitelio era presente sia nello strato basale sia nello strato spinoso (Figura 3b).

Al contrario, i ratti infetti trattati con tigeciclina hanno mostrato una significativa riduzione dell'espressione della MMP-9, sia nell'epitelio ( $20 \pm 2,7$ ) sia nel derma ( $50 \pm 4,9$ ) (Figura 3c), rispetto a i ratti trattati con teicoplanina (rispettivamente  $30 \pm 8.9$  e  $65 \pm 3.6$  nell'epitelio e nel derma) (Figura 3d).



**Fig. 2.** Espressione immunoistochimica del collagene IV nel ratto a 21 giorni dall'ustione (reazione con immunoperossidasi; ingrandimento originale:  $\times 250$ ). Nei ratti non infetti (a) e infetti trattati con teicoplanina (b) e tigeciclina (c), il collagene di tipo IV era localizzato in modo simile nella giunzione dermoepidermica ( $\hat{u}$ ), dove si può osservare una membrana basale ininterrotta, e nella lamina basale dei capillari ( $\hat{u}$ ). Al contrario, nei ratti infetti non trattati (d) l'espressione focale di collagene di tipo IV a livello della giunzione dermoepidermica ( $\hat{u}$ ) e della lamina basale dei capillari ( $\hat{u}$ ) è focale; in questo gruppo di trattamento si osserva una membrana basale irregolare.



**Fig. 3.** Espressione immunoistochimica di MMP-9 nel ratto a 21 giorni dall'ustione (reazione di immunoperoxidasi; ingrandimento originale:  $\times 250$ ). (a) Ratto non infetto: debole espressione della MMP-9 sia nell'epitelio ( $\hat{u}$ ) sia nel derma ( $\hat{u}$ ). (b) Ratto infetto non trattato: marcata espressione della MMP-9 epiteliale ( $\hat{u}$ ) e dermica ( $\hat{u}$ ). (c) Ratto infetto trattato con tigeciclina: diminuzione dell'espressione di MMP-9 sia nell'epitelio ( $\hat{u}$ ) sia nel derma ( $\hat{u}$ ) rispetto ai ratti trattati con teicoplanina (d).

#### 4. Discussione

Nell'uomo, la superficie cutanea intatta è vitale per garantire la termoregolazione, l'omeostasi dei fluidi corporei e, infine, la protezione dell'ospite dalle infezioni (Church 2006). Una lesione termica crea una breccia nella superficie e altera queste importanti funzioni fisiologiche della cute. Nei pazienti ustionati viene prestata molta attenzione alla somministrazione di liquidi e alla prevenzione dell'ipovolemia, al mantenimento della temperatura corporea entro un *range* normale costante, alla terapia del dolore severo e alla prevenzione delle infezioni (Church 2006, Dyer

1990). I patogeni più comunemente coinvolti sono gli aerobi Gram-positivi, in particolare lo *S. aureus* (Guggenheim 2009, Appelgren 2002).

Le attuali tecniche di cura delle ferite da ustione hanno ridotto significativamente l'incidenza delle infezioni invasive della lesione, aumentato l'intervallo tra l'ustione e l'insorgenza dell'infezione, ridotto la mortalità associata all'infezione, aumentato l'incidenza globale delle infezioni nei pazienti ustionati e aumentato la sopravvivenza dei pazienti ustionati.

Alcune di queste infezioni sono associate a manifestazioni cliniche più severe, come infezioni necrotizzanti e sindrome stafilococcica da shock tossico (Church 2006, Gibran 2000). Le infezioni correlate alle ustioni possono cronicizzare e causare un danno economico secondario alla morbilità e mortalità del paziente. Molte di queste infezioni coinvolgono stafilococchi in grado di sviluppare resistenza agli antibiotici. Con l'evidenza di un aumento della frequenza dell'antibiotico-resistenza, si stanno sviluppando nuovi farmaci e, per queste gravi infezioni, sono disponibili diverse nuove opzioni antimicrobiche con una buona copertura contro l'MRSA come la tigeciclina.

Nel nostro modello animale, è emerso che l'MRSA è stato in grado di colonizzare la cute con un'ustione a tutto spessore e, di conseguenza, di evocare una risposta infiammatoria dell'ospite, come determinato dall'esame istologico. I risultati dello studio *in vivo* hanno dimostrato che tutti gli antibiotici utilizzati hanno una buona attività contro le infezioni da MRSA, ma è noto che la tigeciclina ha anche una buona attività in presenza di biofilm, e vi sono evidenze che le ferite spesso presentano biofilm sulla loro superficie (Costerton 1999). I biofilm sono comunità strutturate di cellule batteriche, racchiuse in una matrice polimerica autoprodotta e aderenti a superfici inerti o viventi. La modalità di crescita del biofilm consente ai batteri di sopravvivere esposti a concentrazioni 1000 volte superiori di vari antibiotici, rispetto agli stessi batteri che crescono singolarmente (Costerton 1999, Lewis 2001). L'antibiotico-resistenza associata alla presenza di biofilm può essere attribuita alla ridotta penetrazione di antibiotici o a un'attività metabolica batterica eterogenea; poiché gli antibiotici bersagliano principalmente le cellule metabolicamente attive, è molto difficile bersagliare le parti del biofilm a crescita lenta o non in crescita. Inoltre, si reputa che l'espressione da parte del biofilm di alcuni geni conferisca una maggiore resistenza agli antibiotici (Costerton 1999, Singh 2010). Gli stafilococchi, ad esempio, per persistere all'interno di un

biofilm attivano una risposta adattativa che limita gli effetti deleteri della diminuzione del pH associata alle condizioni di crescita anaerobica, e producono molteplici fattori di virulenza (Coster-ton 1999). In studi precedenti, è stato osservato che la tigeciclina era significativamente più attiva della vancomicina e del linezolid contro biofilm di MRSA (Road 2007).

La riparazione delle ferite cutanee è un processo complesso che coinvolge diversi meccanismi, come coagulazione, infiammazione, sintesi e deposizione della matrice, angiogenesi, deposizione di collagene, fibroplasia, epitelizzazione, contrazione e rimodellamento. Nel nostro studio, è emerso che da un punto di vista istologico la riparazione delle ferite da ustione, infette e non infette, progredisce notevolmente a partire dal settimo giorno, ma è più rallentata in caso di infezione. Il confronto istologico tra le ferite infette non trattate rispetto e quelle infette e trattate ha mostrato che tutti i regimi terapeutici hanno influenzato positivamente la guarigione delle ferite. A 21 giorni, nei ratti infetti non trattati si osservava il peggiore processo di riparazione delle ferite a livello sia epiteliale sia cutaneo.

E' emerso anche che in tutti i gruppi trattati, la rigenerazione e la migrazione delle cellule epiteliali sono progredite notevolmente prima del giorno 21; tuttavia, nei ratti trattati con teicoplanina non è stata osservata la stessa tempistica: infatti, l'epitelio, il tessuto di granulazione e la deposizione di collagene apparivano leggermente meno organizzati rispetto ai ratti non infetti o a quelli infetti trattati con tigeciclina. Tra i trattamenti, la teicoplanina si è dimostrata meno efficace nella riparazione della ferita, mentre la tigeciclina ha notevolmente impattato da un punto di vista biologico sui componenti epidermici e dermici alla base del processo di guarigione delle ferite. Infatti, il gruppo trattato con tigeciclina mostrava i valori medi più alti dei parametri correlati al processo di riparazione delle ferite, con completa e normale epitelizzazione, spesso tessuto di granulazione e regolare deposizione di collagene.

Valutando tutte le fasi della guarigione della ferita dal settimo al ventunesimo giorno, abbiamo osservato che il trattamento con tigeciclina ha migliorato la guarigione delle ferite durante la seconda settimana e a 21 giorni la guarigione era perfettamente paragonabile a quella del gruppo dei non infetti.

La regolazione del turnover del collagene è parte integrante del processo di riparazione dei tessuti. Questo processo dipende dalla formazione di fibrille di collagene che colmano la perdita di sostanza a livello della ferita; quindi, anche piccole alterazioni dell'equilibrio tra sintesi di collagene, deposizione, formazione di cross-link e degradazione possono causare una guarigione della ferita alterata. È risaputo che, durante il processo di guarigione delle ferite, l'espressione delle MMP è fisiologicamente aumentata in acuto, ma resta notevolmente elevata nell'ambiente cronico della ferita (Tregrove 1999). Le MMP sono in gran parte responsabili della degradazione dei vari costituenti dei tessuti connettivi durante il normale rimodellamento e in caso di danno tissutale patologico (Greenwald 1998, Kontinen 1998). Reiss e collaboratori (Reiss 2010). È stato recentemente dimostrato che la produzione prolungata ed eccessiva di MMP (in particolare della MMP-9) altera il processo di guarigione delle ferite. D'altra parte, se vengono soppressi i normali livelli di MMP-9, l'epitelizzazione risulta ritardata, il che sottolinea l'importanza di una produzione equilibrata di MMP-9 (Widgerow 2011). La MMP-9 è prodotta da diverse cellule, come neutrofili, macrofagi, monociti e cheratinociti (Ries 2009, Pugin 1999).

Le MMP svolgono un ruolo nelle infezioni, quando il sistema immunitario dell'ospite viene attivato da un agente infettivo, facilitando il reclutamento di leucociti dal torrente ematico; questi migrano verso il sito di infezione per eradicare il patogeno (mediante proteolisi della membrana basale) e modulare la risposta infiammatoria (Elkington 2005). Studi clinici hanno mostrato livelli plasmatici più elevati di MMP-9 e TIMP-1 nei pazienti con sepsi rispetto a quelli osservati nei controlli (Pugin 1999, Ricou 1996, Hoffmann 2006, Lorente 2009). È stato anche dimostrato che le MMP promuovono il rilascio del fattore di necrosi tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Gearing 1994), attivano la pro-interleuchina-1 $\beta$  (pro-IL-1 $\beta$ ) (Schonbeck 1998) e lisano la forma attivata dell'IL-1 $\beta$  (Ito 1996). A loro volta, i mediatori infiammatori, in particolare il TNF- $\alpha$ , modulano potentemente la funzione dei fibroblasti cutanei e delle cellule epiteliali. Precedenti studi che hanno esplorato gli effetti del TNF- $\alpha$  sull'attività delle cellule cutanee, hanno dimostrato che il TNF- $\alpha$  può inibire l'espressione del collagene di tipo I nelle ferite, e contrastare la differenziazione dei miofibroblasti indotta dal fattore di crescita tumorale  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) e la produzione di collagene da parte dei fi-

broblasti dermici (Buck 1996, Goldberg 2007); da questi dati emerge come l'inibizione del signalling del TNF- $\alpha$  possa accelerare il processo di guarigione delle ferite.

Nel nostro studio, è emerso che i ratti infetti trattati con tigeciclina hanno mostrato, rispetto a quelli trattati con teicoplanina, una significativa riduzione dell'espressione di MMP-9 sia nell'epitelio sia nel derma. Possiamo ipotizzare che il maggiore e migliore impatto sull'istologia del processo di guarigione delle ferite emerso nel gruppo trattato con la tigeciclina, un derivato della tetraciclina, possa essere dovuto alla capacità di questo farmaco di modulare l'attivazione e la sintesi di MMP-9 e TNF- $\alpha$ . Per questo motivo, la tigeciclina presenta un profilo farmacologico complesso, in grado di modulare alcuni aspetti del processo di riparazione delle ferite (Lamparter 2002, Parternak 2008, Stechmiller 2010). Non ci sono evidenze che l'effetto della tigeciclina sia dovuto all'inibizione delle MMP. Comunque, è noto che un'altra tetraciclina, la doxiciclina, è in grado di inibire l'attività delle MMP e la sintesi del pro-enzima (Stechmiller 2010, Franco 2011). Tuttavia, ulteriori studi potrebbero far luce sul ruolo della tigeciclina nell'attività delle MMP ed essere più rappresentativi delle condizioni cliniche e dei processi che avvengono nell'uomo.

## **5. Conclusioni**

In conclusione, questo studio suggerisce che tutti i regimi antibiotici utilizzati svolgono un ruolo centrale nel trattamento dell'infezione da MRSA. Tradizionalmente, si pensava che il successo clinico riportato con la tigeciclina fosse dovuto alla sua attività antimicrobica; ora, sembra che la sua efficacia dipenda anche da proprietà non antibiotiche, come la sua capacità di modulare la MMP-9. Queste proprietà supportano l'utilità terapeutica della tigeciclina nel trattamento delle lesioni da ustioni, dove l'inibizione della MMP-9 può essere utile per accelerare il processo di guarigione delle ferite.

Uno dei limiti di questo studio è che gli esperimenti sono stati condotti su modelli animali; sarebbero necessari futuri trial clinici nell'uomo per valutare gli effetti e l'efficacia della tigeciclina nel trattamento delle infezioni delle ferite da ustioni sostenute da MRSA.

## **Bibliografia**

- Abdullahi A, Jeschke MG. Nutrition and anabolic pharmacotherapies in the care of burn patients. *Nutr Clin Pract* 2014;29:621-30.
- Agren MS, Mirastschijski U, Karlsmark T et al. Topical synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases delays epidermal regeneration of human wounds. *Exp Dermatol* 2001; 10: 337–48.
- Altoparlak U, Erol S, Akcay MN et al. The time-related changes of antimicrobial resistance patterns and predominant bacterial profiles of burn wounds and body flora of burned patients. *Burns* 2004; 30: 660–4.
- American Burn Association. Burn Center Referral Criteria. [ameriburn.org http://ameriburn.org/wp-content/uploads/2017/05/burncenterreferralcriteria.pdf](http://ameriburn.org/wp-content/uploads/2017/05/burncenterreferralcriteria.pdf) (2006).
- American Burn Association. National Burn Repository 2019 Update, Report of data from 2009-2018 [ameriburn.site-ym.com](http://ameriburn.site-ym.com) (2019).
- Amini-Nik S et al., Stem cells derived from burned skin - the future of burn care. *EBioMedicine* 37, 509–520 (2018).
- Amtmann D et al., Satisfaction with life over time in people with burn injury: a National Institute on Disability, Independent Living, and Rehabilitation Research burn model system study. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 101, S63–S70 (2020).
- Appelgren P, Bjornhagen V, Bragderyd K et al., A prospective study of infections in burn patients. *Burns* 2002; 28: 39–46.
- Arbeit RD, Maki D, Tally FP et al., The safety and efficacy of daptomycin for the treatment of complicated skin and skin-structure infections. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 1673 – 81.
- Atwell K, Bartley C, Cairns B, Charles A, The effect of pre-existing seizure disorders on mortality and hospital length of stay following burn injury. *J. Burn Care Res.* 40, 979–982 (2019).
- Auger C, Samadi O, Jeschke MG, The biochemical alterations underlying post- burn hypermetabolism. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2017;1863:2633-44.
- Ballard J et al, Positive fungal cultures in burn patients: a multicenter review. *J. Burn Care Res.* 29, 213–221 (2008)

- Bayuo J, Agbenorku P, Amankwa R, Agbenorku M, Epidemiology and outcomes of burn injury among older adults in a Ghanaian tertiary hospital. *Burns Open* 2, 98–103 (2018).
- Beckmann N, Pugh AM, Caldwell CC, Burn injury alters the intestinal microbiome's taxonomic composition and functional gene expression. *PLoS One* 13, e0205307 (2018).
- Birkedal-Hansen H, Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7: 728–35.
- Bjellerup M, Novel method for training skin flap surgery: polyurethane foam dressing used as a skin equivalent. *Dermatol Surg* 2005; 31: 1107 – 11.
- Bouza E, New therapeutic choices for infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 44–52.
- Brooks NC et al., XBP-1s is linked to suppressed gluconeogenesis in the ebb phase of burn injury. *Mol. Med.* 19, 72–78 (2013).
- Buck M, Houglum K, Chojkier M, Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits collagen  $\alpha 1(I)$  gene expression and wound healing in a murine model of cachexia. *Am J Pathol* 1996; 149: 195–204.
- Burke JF, Bondoc CC, Quinby WC, Primary burn excision and immediate grafting: a method shortening illness. *J. Trauma* 14, 389–395 (1974).
- Burke-Smith A, Collier J, Jones I, A comparison of non-invasive imaging modalities: infrared thermography, spectrophotometric intracutaneous analysis and laser Doppler imaging for the assessment of adult burns. *Burns* 41, 1695–1707 (2015).
- Burmeister DM et al., Noninvasive techniques for the determination of burn severity in real time. *J. Burn Care Res.* 38, e180–e191 (2017).
- Cancio LC, Salinas J, Kramer GC, Protocolized resuscitation of burn patients. *Crit. Care Clin.* 32, 599–610 (2016).
- Capek KD, Culnan DM, Merkley K, Huan TT, Trocme S, in *Total Burn Care 5th edn* (ed. Hennon, D. N.) 435–444 (Elsevier, 2018).
- Chen P, Stanojic M, Jeschke MG, Septic predictor index: a novel platform to identify thermally injured patients susceptible to sepsis. *Surgery* 163, 409–414 (2018).

- Chin TL et al., Trends 10 years after burn injury: a burn model system national database study. *Burns* 44, 1882–1886 (2018).
- Chocarro-Wrona C, Lòpez-Ruiz E, Peràn M, Gàlvez-Martín P, Marchal JA, Therapeutic strategies for skin regeneration based on biomedical substitutes. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 33, 484–496 (2019).
- Christiansen M et al., Time to school re-entry after burn injury is quite short. *J. Burn Care Res.* 28, 478–481 (2007).
- Chung KK et al., High-volume hemofiltration in adult burn patients with septic shock and acute kidney injury: a multicenter randomized controlled trial. *Crit. Care* 21, 289 (2017).
- Church D, Elsayed S, Reid O et al. Burn wound infections. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 403–34.
- Cook N, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* versus the burn patient. *Burns* 1998; 24: 91–8.2
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP, Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284: 1318–22.39
- Davé DR, Nagarjan N, Canner JK, Kushner AL, Stewart BT, Rethinking burns for low & middle-income countries: differing patterns of burn epidemiology, care seeking behavior, and outcomes across four countries. *Burns* 44, 1228–1234 (2018).
- Davison-Kotler E, Sharma V, Kang NV, Garcia-Gareta E, A universal classification system of skin substitutes inspired by factorial design. *Tissue Eng. Part B Rev.* 24, 279–288 (2018).
- Deitch EA, Maejima K, Berg R, Effect of oral antibiotics and bacterial overgrowth on the translocation of the GI tract microflora in burned rats. *J. Trauma* 25, 385–392 (1985).
- de Macedo JL, Rosa SC, Castro C, Sepsis in burned patients. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; 36: 647–52.
- Desai MH et al., Early burn wound excision significantly reduces blood loss. *Ann. Surg.* 211, 753–762 (1990).
- Dionigi R, *Chirurgia* (2 voll.), Edra 2017
- Duke JM et al., Increased admissions for musculoskeletal diseases after burns sustained during childhood and adolescence. *Burns* 41, 1674–1682 (2015).

- Duke JM, Rea S, Boyd JH, Randall SM, Wood FM, Mortality after burn injury in children: a 33-year population-based study. *Pediatrics* 135, e903–e910 (2015).
- Duke JM et al., Diabetes mellitus after injury in burn and non-burned patients: a population based retrospective cohort study. *Burns* 44, 566–572 (2018).
- Dyer C, Roberts D. Thermal trauma. *Nurs Clin N Am* 1990; 25: 85–117. 37
- Earley ZM et al., Burn injury alters the intestinal microbiome and increases gut permeability and bacterial translocation. *PLoS One* 10, e0129996 (2015).
- Elkington PT, O’Kane CM, Friedland JS. The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease. *Clin Exp Immunol* 2005; 142: 12–20.
- Elsner P, Antimicrobials and the skin physiological and pathological flora. *Curr Probl Dermatol* 2006; 33: 35-41.
- Endorf FW, Gamelli RL, Inhalation injury, pulmonary perturbations, and fluid resuscitation. *J. Burn Care Res.* 28, 80–83 (2007)
- Enright MC, The evolution of a resistant pathogen—the case of MRSA. *Curr Opin Pharmacol* 2003; 3: 474 – 9.
- Erol S, Altoparlak U, Akcay MN et al., Changes of microbial flora and wound colonization in burned patients. *Burns* 2004; 30: 357–61.
- Finnerty CC et al., Proteomics improves the prediction of burns mortality: results from regression spline modeling. *Clin. Transl. Sci.* 5, 243–249 (2012).
- Finnerty CC et al., Determination of burn patient outcome by large-scale quantitative discovery proteomics. *Crit. Care Med.* 41, 1421–1434 (2013).
- Finnerty CC et al., Hypertrophic scarring: the greatest unmet challenge after burn injury. *Lancet* 388, 1427–1436 (2016).
- Foster KN, Holmes JH, Inhalation injury: state of the science 2016. *J. Burn Care Res.* 38, 137–141 (2017).
- Franco GC, Kajiya M, Nakanishi T et al., Inhibition of matrix metalloproteinase-9 activity by doxycycline ameliorates RANK ligand-induced osteoclast differentiation in vitro and in vivo. *Exp Cell Res* 2011; 317: 1454-64.

- Ganapathy P et al., Dual-imaging system for burn depth diagnosis. *Burns* 40, 67–81 (2014).
- Gauglitz GG, Korting HC, Pavicic T, Ruzicka T, Jeschke MG, Hypertrophic scarring and keloids: pathomechanisms and current and emerging treatment strategies. *Mol. Med.* 17, 113–125 (2011).
- GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2015; 385:117-71.
- Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M et al. Processing of tumour necrosis factor- $\alpha$  precursor by metalloproteinases. *Nature* 1994; 370: 555–7.
- Gibran NS, Heimbach DM. Current status of burn wound pathophysiology. *Clin Plast Surg* 2000; 27: 11-22.38
- Goei, H. et al. Return to work after specialised burn care: a two-year prospective follow-up study of the prevalence, predictors and related costs. *Injury* 47, 1975–1982 (2016).
- Goldberg MT, Han YP, Yan C et al. TNF- $\alpha$  suppresses  $\alpha$ -smooth muscle actin expression in human dermal fibroblasts: an implication for abnormal wound healing. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 2645–55.
- Gomez R et al., Causes of mortality by autopsy findings of combat casualties and civilian patients admitted to a burn unit. *J. Am. Coll. Surg.* 208, 348–354 (2009)
- Gore DC et al., Hyperglycemia exacerbates muscle protein catabolism in burn-injured patients. *Crit. Care Med.* 30, 2438–2442 (2002).
- Gosain A, Gamelli RL, Role of the gastrointestinal tract in burn sepsis. *J. Burn Care Rehabil.* 26, 85–91 (2005).
- Greenhalgh DG, Management of Burns, *N Engl J Med* 2019;380:2349-59
- Greenwald RA, Golub LM, Ramamurthy NS et al. In vitro sensitivity of the three mammalian collagenases to tetracycline inhibition: relationship to bone and cartilage degradation. *Bone* 1998; 22: 33-8.
- Grigorian A et al., Rising mortality in patients with combined burn and trauma. *Burns* 44, 1989–1996 (2018)

- Grigorian A et al., 23 burns in octogenarians: 80 is the new 60. *J. Burn Care Res.* 40, S19 (2019).
- Guggenheim M, Zbinden R, Handschin AE et al. Changes in bacterial isolates from burn wounds and their antibiograms: a 20-year study (1986-2005). *Burns* 2009; 35: 553 – 60.
- Guillory A, Clayton R, Herndon D, Finnerty C, Cardiovascular dysfunction following burn injury: what we have learned from rat and mouse models. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 53 (2016).
- Hakimi N et al., Handheld skin printer: in situ formation of planar biomaterials and tissues. *Lab Chip* 18, 1440–1451 (2018).
- Hampson P et al., Neutrophil dysfunction, immature granulocytes, and cell-free DNA are early biomarkers of sepsis in burn-injured patients: a prospective observational cohort study. *Ann. Surg.* 265, 1241–1249 (2017)
- Han YP, Nien YD, Garner WL. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced proteolytic activation of pro-matrix metalloproteinase-9 by human skin is controlled by down-regulating tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and mediated by tissue-associated chymotrypsin-like proteinase. *J Biol Chem* 2002; 277: 27319–27.
- Hart DW et al., Persistence of muscle catabolism after severe burn. *Surgery* 128, 312–319 (2000).
- Heering P et al., Cytokine removal and cardiovascular hemodynamics in septic patients with continuous venovenous hemofiltration. *Intensive Care Med.* 23, 288–296 (1997).
- Henry S, ATLS 10th edition offers new insights into managing trauma patients. *Bulletin of the American College of Surgeons* <http://bulletin.facs.org/2018/06/atls-10th-edition-offers-new-insights-into-managing-trauma-patients/> (2018).
- Hermans MHE, Results of an internet survey on the treatment of partial thickness burns, full thickness burns, and donor sites. *J. Burn Care Res.* 28, 835–847 (2007).
- Herndon DN et al., A comparison of conservative versus early excision. Therapies in severely burned patients. *Ann. Surg.* 209, 547–553 (1989).
- Herndon DN, Zeigler ST, Bacterial translocation after thermal injury. *Crit. Care Med.* 21, S50–S54 (1993)

- Hoffmann U, Bertsch T, Dvortsak E et al. Matrix-metalloproteinases and their inhibitors are elevated in severe sepsis: prognostic value of TIMP-1 in severe sepsis. *Scand J Infect Dis* 2006; 38: 867–72.
- Horvath EE et al, Fungal wound infection (not colonization) is independently associated with mortality in burn patients. *Ann. Surg.* 245, 978–985 (2007)
- ISBI Practice Guidelines Committee. ISBI practice guidelines for burn care. *Burns* 42, 953–1021 (2016).
- Ito A, Mukaiyama A, Itoh Y et al. Degradation of interleukin 1b by matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1996; 271: 14657–60.
- Jeng J, Gibran N, Peck M, Burn care in disaster and other austere settings. *Surg. Clin. North. Am.* 94, 893–907 (2014).
- Jeschke MG et al., Pathophysiologic response to severe burn injury. *Ann. Surg.* 248, 387–401 (2008).
- Jeschke MG et al., Calcium and ER stress mediate hepatic apoptosis after burn injury. *J. Cell. Mol. Med.* 13, 1857–1865 (2009).
- Jeschke MG, The hepatic response to thermal injury: is the liver important for postburn outcomes? *Mol. Med.* 15, 337–351 (2009).
- Jeschke MG, Postburn hypermetabolism: past, present, and future. *J. Burn Care Res.* 37, 86–96 (2016).
- Jeschke MG, van Baar ME, Choudhry MA, Chung KK, Gibran NS, Logsetty S, Burn injury, *Nat Rev Dis Primers.* 2020 Feb 13;6(1):11
- Klein MB et al., Geographic access to burn center hospitals. *JAMA* 302, 1774–1781 (2009)
- Klein MB et al., The beneficial effects of plasma exchange after severe burn injury. *J. Burn Care Res.* 30, 243–248 (2009).
- Kontinen YT, Halinen S, Hanemaaijer R et al. Matrix metalloproteinase (MMP)-9 type IV collagenase/gelatinase implicated in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Matrix Biol* 1998; 17: 335-47.

- Lachiewicz AM, Hauck CG, Weber DJ, Cairns BA, van Duin D, Bacterial infections after burn injuries: impact of multidrug resistance. *Clin. Infect. Dis.* 65, 2130–2136 (2017)
- Ladwig GP, Robson MC, Liu R et al., Ratios of activated matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in wound fluids are inversely correlated with healing of pressure ulcers. *Wound Repair Regen* 2002; 10: 26–37.
- Lamparter S, Slight SH, Weber KT, Doxycycline and tissue repair in rats. *J Lab Clin Med* 2002; 139: 295–302.
- Lawrence A et al., Colloid administration normalizes resuscitation ratio and ameliorates “fluid creep”. *J. Burn Care Res.* 31, 40–47 (2010).
- Lee RC, Injury by electrical forces: pathophysiology, manifestations, and therapy. *Curr. Probl. Surg.* 34, 677–764 (1997).
- Lester ME, Hazelton J, Dewey WS, Casey, J. C. & Richard, R. Influence of upper extremity positioning on pain, paresthesia, and tolerance. *J. Burn Care Res.* 34, e342–e350 (2013).
- Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 999–1007.
- Lorente L, Martín MM, Labarta L et al. Matrix metalloproteinase-9,-10, and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 blood levels as biomarkers of severity and mortality in sepsis. *Crit Care* 2009; 13: R158.
- Lund C, Browder N, The estimation of areas of burns. *Surg. Gynecol. Obstet.* 79, 352–358 (1944).
- Magnotti LJ, Xu DZ, Lu Q, Deitch EA, Gut-derived mesenteric lymph: a link between burn and lung injury. *Arch. Surg.* 134, 1333–1340 (1999).
- Mason ST et al., Return to work after burn injury: a systematic review. *J. Burn Care Res.* 33, 101–109 (2012).
- Mason SA et al., Association between burn injury and mental illness among burn survivors: a population-based, self-matched, longitudinal cohort study. *J. Am. Coll. Surg.* 225, 516–524 (2017).
- Mason SA et al., Burn center care reduces acute health care utilization after discharge: a population-based analysis of 1,895 survivors of major burn injury. *Surgery* 162, 891–900 (2017).

- Mason SA et al., Increased rate of long-term mortality among burn survivors. *Ann. Surg.* 269, 1192–1199 (2019).
- Metzger R, Bonatti H, Sawyer R, Future trends in the treatment of serious Gram-positive infections. *Drugs Today* 2009; 45: 33 – 45.
- Meyer WJ et al., Adolescent survivors of burn injuries and their parents' perceptions of recovery outcomes: do they agree or disagree? *J. Trauma. Acute Care Surg.* 73, S213–S220 (2012).
- Miller T et al., Quality-of-life loss of people admitted to burn centers, United States. *Qual. Life Res.* 22, 2293–2305 (2013).
- Miyazaki H, Kinoshita M, Ono S, Seki S, Saitoh D, Burn-evoked reactive oxygen species immediately after injury are crucial to restore the neutrophil function against postburn infection in mice. *Shock* 44, 252–257 (2015)
- Morton JJ, Malone MH, Evaluation of vulnerary activity by an open wound procedure in rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1972; 196: 117 – 26.
- Murphy TJ, Paterson HM, Mannick JA, Lederer JA, Injury, sepsis, and the regulation of Toll-like receptor responses. *J. Leukoc. Biol.* 75, 400–407 (2003)
- Murphy PS, Evans GRD, Advances in wound healing: a review of current wound healing products. *Plast. Surg. Int.* 2012, 190436 (2012).
- Muthu K et al, Perturbed bone marrow monocyte development following burn injury and sepsis promote hyporesponsive monocytes. *J. Burn Care Res.* 29, 12–21 (2008).
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically—Sixth Edition: Approved Standard M7-A6.* NCCLS, Wayne, PA, USA, 2003.
- Nicholas MN, Jeschke MG, Amini-Nik S, Methodologies in creating skin substitutes. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 3453–3472 (2016).
- Nedelec B, Serghiou MA, Niszczak J, McMahon M, Healey T, Practice guidelines for early ambulation of burn survivors after lower extremity grafts. *J. Burn Care Res.* 33, 319–329 (2012).

- Neff LP, Allman JM, Holmes JH, The use of therapeutic plasma exchange (TPE) in the setting of refractory burn shock. *Burns* 36, 372–378 (2010).
- Nguyen CM, Chandler R, Ratanshi I, Logsetty S, in *Handbook of Burns Vol. 1* (eds. Jeschke, M. G., Kamolz, L.-P., Sjöberg, F. & Wolf, S. E.) 529–547 (Springer, 2020)
- Nielson CB, Duethman NC, Howard JM, Moncure M, Wood JG, Burns: pathophysiology of systemic complications and current management. *J. Burn Care Res.* 38, e469–e481 (2017).
- Nitzschke SL et al., Wound healing trajectories in burn patients and their impact on mortality. *J. Burn Care Res.* 35, 474–479 (2014).
- Norton R, Kobusingye O, Injuries. *N Engl J Med* 2013;368:1723-30
- O'Mara MS, Slater H, Goldfarb IW, Caushaj PF, A prospective, randomized evaluation of intra-abdominal pressures with crystalloid and colloid resuscitation in burn patients. *J. Trauma* 58, 1011–1018 (2005).
- Öster C, Willebrand M, Ekselius L, Health-related quality of life 2 years to 7 years after burn injury. *J. Trauma* 71, 1435–1441 (2011).
- Osuka A, Ogura H, Ueyama M, Shimazu T, Lederer JA, Immune response to traumatic injury: harmony and discordance of immune system homeostasis. *Acute Med. Surg.* 1, 63–69 (2014)
- Owens CD, Stoessel K. Surgical site infections: epidemiology, microbiology and prevention. *J Hosp Infect* 2008; 70: 3 – 10.
- Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 221–33.
- Pan R et al., School reintegration of pediatric burn survivors: an integrative literature review. *Burns* 44, 494–511 (2018).
- Parks WC, Matrix metalloproteinases in repair. *Wound Repair Regen* 1999; 7: 423–32.
- Parvizi D et al., BurnCase 3D software validation study: burn size measurement accuracy and inter-rater reliability. *Burns* 42, 329–335 (2016).
- Pasternak B, Rehn M, Andersen L et al., Doxycycline-coated sutures improve mechanical strength of intestinal anastomoses. *Int J Colorectal Dis* 2008; 23: 271–6.

- Patsouris D et al., Burn induces browning of the subcutaneous white adipose tissue in mice and humans. *Cell Rep.* 13, 1538–1544 (2015).
- Payen D et al., Impact of continuous venovenous hemofiltration on organ failure during the early phase of severe sepsis: a randomized controlled trial. *Crit. Care Med.* 37, 803–810 (2009).
- Peck M, Pressman MA, The correlation between burn mortality rates from fire and flame and economic status of countries. *Burns* 39, 1054–1059 (2013).
- Peterson LR, A review of tigecycline—the first glycylicycline. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32 Suppl 4: S215–22.
- Phillips LG, Heggers JP, Robson MC, Burn and trauma units as sources of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Burn Care Rehabil* 1992; 13: 293–7.
- Polychronopoulou E, Herndon DN, Porter C, The long-term impact of severe burn trauma on musculoskeletal health. *J. Burn Care Res.* 39, 869–880 (2018).
- Porter C et al., The metabolic stress response to burn trauma: current understanding and therapies. *Lancet* 388, 1417–1426 (2016).
- Pruitt BA Jr, O'Neill JA Jr, Moncrief JA, Lindberg RB, Successful control of burn-wound sepsis. *JAMA* 203, 1054–1056 (1968).
- Pugin J, Widmer MC, Kossodo S et al. Human neutrophils secrete gelatinase B in vitro and in vivo in response to endotoxin and proinflammatory mediators. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20: 458-64.
- Quinn T, Wasiak J, Cleland H, An examination of factors that affect return to work following burns: a systematic review of the literature. *Burns* 36, 1021–1026 (2010).
- Raad I, Hanna H, Jiang Y et al. Comparative activities of daptomycin, linezolid, and tigecycline against catheter-related methicillin-resistant *Staphylococcus bacteremic* isolates embedded in biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 1656–60.
- Rae L, Fidler P, Gibran N, The physiologic basis of burn shock and the need for aggressive fluid resuscitation. *Crit. Care Clin.* 32, 491–505 (2016)
- Randall SM et al., Long-term musculoskeletal morbidity after adult burn injury: a population-based cohort study. *BMJ Open* 5, e009395 (2015).

- Ravenek MJ, Skarakis-Doyle E, Spaulding SJ, Jenkins ME, Doyle PC, Enhancing the conceptual clarity and utility of the international classification of functioning, disability & health: the potential of a new graphic representation. *Disabil. Rehabil.* 35, 1015–1025 (2013).
- Rech MA et al., Outcomes in burn-injured patients who develop sepsis. *J. Burn Care Res.* 40, 269–273 (2019)
- Rehberg S et al., Pathophysiology, management and treatment of smoke inhalation injury. *Expert. Rev. Respir. Med.* 3, 283–297 (2009)
- Rehou S, Shahrokhi S, Thai J, Stanojic M, Jeschke MG, Acute phase response in critically ill elderly burn patients. *Crit. Care Med.* 47, 201–209 (2019).
- Reiss MJ, Han YP, Garcia E et al. Matrix metalloproteinase-9 delays wound healing in a murine wound model. *Surgery* 2010; 147: 295 – 302.
- Ricou B, Nicod L, Lacraz S et al. Matrix metalloproteinases and TIMP in acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 346 – 52.
- Ries C, Popp T, Egea V et al. Matrix metalloproteinase-9 expression and release from skin fibroblasts interacting with keratinocytes: upregulation in response to sulphur mustard. *Toxicology* 2009; 263: 26–31.
- Romanowski K et al., The frailty tipping point: determining which patients are targets for intervention in a burn population. *Burns* 45, 1051–1056 (2019).
- Rowan MP et al., Burn wound healing and treatment: review and advancements. *Crit. Care* 19, (2015).
- Salo T, Makela M, Kylmaniemi M et al., Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 during early human wound healing. *Lab Invest* 1994; 70: 176–82.
- Sanghavi P, Bhalla K, Das V, Fire-related deaths in India in 2001: a retrospective analysis of data. *Lancet* 373, 1282–1288 (2009).
- Santucci SG, Gobara S, Santos CR et al., Infections in a burn intensive care unit: experience of seven years. *J Hosp Infect* 2003; 53: 6–13.

- Schonbeck U, Mach F, Libby P, Generation of biologically active IL-1b by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1b processing. *J Immunol* 1998; 161: 3340–6.
- Seltzer JL, Weingarten H, Akers KT et al., Cleavage specificity of type IV collagenase (gelatinase) from human skin. Use of synthetic peptides as model substrates. *J Biol Chem* 1989; 264: 19583–6.
- Seok J et al., Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 110, 3507–3512 (2013)
- Serio-Melvin ML et al., Burn shock and resuscitation. *J. Burn Care Res.* 38, e423–e431 (2017).
- Sheikholeslam M, Wright MEE, Jeschke MG, Amini-Nik S, Biomaterials for skin substitutes. *Adv. Healthc. Mater.* 7, 1700897 (2018).
- Sidossis LS et al., Browning of subcutaneous white adipose tissue in humans after severe adrenergic stress. *Cell Metab.* 22, 219–227 (2015).
- Simonetti O, Cirioni O, Ghiselli R et al. RIP enhances healing of wounds infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 2205 – 11.
- Singer M et al., The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315, 801–810 (2016)
- Singh R, Ray P, Das A et al. Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 1955–8.
- Spronk I, Legemate CM, Polinder S, van Baar ME, Health-related quality of life in children after burn injuries. *J. Trauma. Acute Care Surg.* 85, 1110–1118 (2018).
- Spronk I et al., Predictors of health-related quality of life after burn injuries: a systematic review. *Crit. Care* 22, 160 (2018).
- Spronk I et al., Health related quality of life 5–7 years after minor and severe burn injuries: a multicentre cross-sectional study. *Burns* 45, 1291–1299 (2019).
- Stechmiller J, Cowan L, Schultz G. The role of doxycycline as a matrix metalloproteinase inhibitor for the treatment of chronic wounds. *Biol Res Nurs* 2010; 11: 336–44.

- Steenbergen JN, Alder J, Thorne GM et al. Daptomycin: a lipopeptide antibiotic for the treatment of serious Gram-positive infections. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 283–8.
- Steenbergen JN, Mohr JF, Thorne GM. Effects of daptomycin in combination with other antimicrobial agents: a review of in vitro and animal model studies. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64: 1130–8.
- Tanaka H et al., Reduction of resuscitation fluid volumes in severely burned patients using ascorbic acid administration: a randomized, prospective study. *Arch. Surg.* 135, 326–331 (2000).
- Tarlton JF, Vickery CJ, Leaper DJ et al. Postsurgical wound progression monitored by temporal changes in the expression of matrix metalloproteinase-9. *Br J Dermatol* 1997; 137: 506–16.
- Taylor SL, Sen S, Greenhalgh DG, Lawless M, Curri T, Palmieri TL. A competing risk analysis for m hospital length of stay in patients with burns. *JAMA Surg* 2015;150:450-6
- Teven CM, Gottlieb LJ, The four-quadrant approach to ethical issues in burn care. *AMA J. Ethics* 20, 595–601 (2018)
- Trengove NJ, Stacey MC, MacAuley S et al. Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. *Wound Repair Regen* 1999; 7: 442–52.
- Tsai CH, Ogawa R., Keloid research: current status and future directions. *Scars Burn. Heal.* 5, 2059513119868659 (2019).
- US Fire Administration. Choosing and using fire extinguishers. [usfa.fema.gov https://www.usfa.fema.gov/prevention/outreach/extinguishers.html](https://www.usfa.fema.gov/prevention/outreach/extinguishers.html) (2017).
- Vaingankar NV, Sylaidis P, Eagling V et al. Comparison of hydrocellular foam and calcium alginate in the healing and comfort of split-thickness skin-graft donor sites. *J Wound Care* 2001; 10: 289–91.
- van Zuijlen PPM et al., Tissue engineering in burn scar reconstruction. *Burns Trauma* 3, 18 (2015).
- Vincent AS et al., Human skin keloid fibroblasts display bioenergetics of cancer cells. *J. Invest. Dermatol.* 128, 702–709 (2008).
- Wallace AB, The exposure treatment of burns. *Lancet* 257, 501–504 (1951).

- Wasiak J et al., Female patients display poorer burn-specific quality of life 12 months after a burn injury. *Injury* 48, 87–93 (2017).
- Wearn C et al., Prospective comparative evaluation study of laser Doppler imaging and thermal imaging in the assessment of burn depth. *Burns* 44, 124–133 (2018).
- Widgerow AD. Chronic wound fluid-thinking outside the box. *Wound Repair Regen* 2011; 19: 287-91.
- Wiechman SA, Patterson DR, ABC of burns. Psychosocial aspects of burn injuries. *BMJ* 329, 391–393 (2004).
- Wiechman SA et al., Reasons for distress among burn survivors at 6, 12, and 24 months postdischarge: a burn injury model system investigation. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 99, 1311–1317 (2018).
- Williams FN, Jeschke MG, Chinkes DL, Suman OE, Branski LK, Herndon DN. Modulation of the hypermetabolic response to trauma: temperature, nutrition, and drugs. *J Am Coll Surg* 2009;208:489-502.
- Wolf SE, Thomas SJ, Dasu MR, et al., Improved net protein balance, lean mass, and gene expression changes with oxandrolone treatment in the severely burned. *Ann Surg* 2003;237:801-10.
- World Health Organization. Burns. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/burns> (WHO, 2018)
- Wysocki AB, Staiano-Coico L, Grinnell F. Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9. *J Invest Dermatol* 1993; 101: 64–8.
- You B et al., Early application of continuous high-volume haemofiltration can reduce sepsis and improve the prognosis of patients with severe burns. *Crit. Care* 22, 173 (2018).
- Young PK, Grinnell F. Metalloproteinase activation cascade after burn injury: a longitudinal analysis of the human wound environment. *J Invest Dermatol* 1994; 103: 660–4.
- Young AW et al., Guideline for burn care under austere conditions. *J. Burn Care Res.* 38, e497–e509 (2017).