

VETERINARIA è indicizzata su CAB ABSTRACTS e su Scopus

# VETERINARIA

ANNO 29 NUMERO 3 ● GIUGNO 2015

ISSN: 0394-3151

## **Uso di un'emulsione contenente lattoferricina, verbascoside e glicerofosfoinositolo nel trattamento dell'otite eritematosa ceruminosa: studio pilota in 10 cani**

Antonella Vercelli, Natalia Fanton, Natascia Bruni, Diana Vergnano, Mauro Bigliati, Luisa Corneigliani

**Estratto da:**

**Veterinaria, Anno 29, n. 3, Giugno 2015, pagg. 49-57**

**NOVITÀ** Innovazione Candioli

# actea™

## La nuova frontiera in campo otologico per cani e gatti

# actea™

**OTO**

con



patent pending



ACTEA™ e LAS™ sono marchi depositati da Candioli S.p.A.

[www.candioli-vet.it](http://www.candioli-vet.it)

**Candioli**  
FARMACEUTICI

# Uso di un'emulsione contenente lattoferricina, verbascoside e glicerofosfoinositolo nel trattamento dell'otite eritematosa ceruminosa: studio pilota in 10 cani



L'otite esterna è un problema clinico ricorrente che spesso richiede terapie farmacologiche complesse. Lo scopo del presente lavoro era quello di valutare l'efficacia di un'emulsione topica otologica contenente lattoferricina, verbascoside e glicerofosfoinositolo lisina nelle otiti esterne eritematose con sovracrescita microbica del cane. Sono stati inclusi, secondo le *good general practice guidelines*, 10 cani con otite eritematosa e sovracrescita batterica e/o da lieviti. I soggetti inclusi venivano valutati al momento d'inclusione (V1), dopo 7 (V7) e dopo 14 (V14) giorni di trattamento e di nuovo a 7 giorni (V21) dalla fine della terapia. Durante ogni controllo sono stati valutati parametri clinici (tramite VAS e CADESI modificato) e citologici del cerume. Per ogni visita si valutavano: quantità di cellule epiteliali di sfaldamento, batteri coccoidi, bastoncellari e lieviti del genere *Malassezia* spp. L'analisi statistica dei risultati è stata effettuata tramite software SPSS 19. I dati sono stati analizzati con test di Shapiro-Wilk e di Kruskal-Wallis se con distribuzione normale; diversamente con test di Friedman per dati non normalmente distribuiti ad analisi ripetute. Venivano considerati statisticamente significativi i dati con un valore di  $p \leq 0.05$ .

È stato osservato un miglioramento statisticamente significativo di tutti i parametri ( $p \leq 0.05$ ) dopo 7 giorni di terapia, che si è protratto fino a una settimana dopo l'interruzione della stessa. Questo studio suggerisce che l'uso giornaliero di un'emulsione otologica contenente lattoferricina, verbascoside e glicerofosfoinositolo lisina per 14 giorni sia efficace per ridurre i segni clinici e la proliferazione microbica in corso di otiti esterne ricorrenti.

Antonella Vercelli<sup>1</sup>,  
Med Vet Dipl CES  
Derm CES Ofta

Natalia Fanton<sup>1\*</sup>,  
Med Vet

Nataschia Bruni<sup>2</sup>,  
Dott PhD Qp Qppv

Diana Vergnano<sup>2</sup>,  
Med Vet

Mauro Bigliati<sup>2</sup>,  
Med Vet

Luisa Cornegiani<sup>1</sup>,  
Med Vet PhD,  
Dipl ECVD

## INTRODUZIONE

L'otite esterna è una malattia comune in medicina veterinaria e si stima che interessi fino al 15% dei cani<sup>1</sup>. Si tratta di una condizione multifattoriale, in cui è indispensabile identificare tutti i fattori coinvolti<sup>1</sup>. Nelle

otiti ricorrenti o croniche, oltre alle cause primarie, sono spesso coinvolti anche fattori secondari, quali le infezioni batteriche e da lieviti, oltre a fattori perpetuanti e predisponenti<sup>1</sup>. La terapia topica, con agenti antimicrobici e detergenti, è fondamentale nella ge-

<sup>1</sup> Ambulatorio Veterinario Associato, c.so Traiano 99/d, 10135 Torino, Italia

<sup>2</sup> Istituto Profilattico e Farmaceutico Candioli & C. S.p.A., Via A. Manzoni 2, 10092 Beinasco (TO), Italia

\* Corresponding Author (nati83@libero.it)

Ricevuto: 04/02/15 - Accettato: 20/05/15

Lavoro presentato come poster al congresso: "Antibiotic Alternatives for the new Millenium", EuroSciCon, London, UK, 5<sup>th</sup>-7<sup>th</sup> November 2014.

sione di questi casi, e consente di limitare l'uso di antibiotici topici e sistemici<sup>2</sup>. Considerato l'aumento di fenomeni di antibiotico-resistenza anche in medicina veterinaria<sup>3</sup>, lo sviluppo di agenti antimicrobici alternativi, come i peptidi antimicrobici, assume crescente importanza. LAS<sup>TM</sup> è una miscela brevettata a base di tre componenti di origine naturale: lattoferricina, verbascoside e glicerofosfoinositolo lisina. La lattoferricina è un peptide ottenuto per idrolisi dalla lattoferrina, con proprietà antibatterica dimostrata *in vitro*, e che possiede anche attività antinfiammatorie, antivirali, antiossidanti e antitumorali<sup>4,5,6,7,8</sup>. Essa è in grado di penetrare nella membrana cellulare batterica e di interagire elettrostaticamente con i glicosaminoglicani della matrice e della superficie cellulare caricati negativamente<sup>4</sup>. La lattoferricina, inoltre, ha attività battericida nei confronti di un ampio spettro di batteri Gram positivi e Gram negativi, incluso *Staphylococcus aureus*<sup>9,10</sup> ed è anche in grado di impedire la formazione del biofilm in alcune specie batteriche<sup>11</sup> e di inibire *in vitro* la crescita di *Candida albicans*<sup>11</sup>.

**Lattoferricina, verbascoside e glicerofosfoinositolo lisina sono molecole di origine naturale rispettivamente ad effetto antimicrobico, antinfiammatorio e/o antiossidante.**

La verbascoside è un derivato fenolico idrosolubile presente nel regno vegetale<sup>12</sup>. Questa molecola è in grado di promuovere la riparazione degli epiteli e ridurre l'infiammazione grazie all'effetto anti-ossidante, chelante del ferro e alle proprietà di induzione della glutathione-S-transferasi<sup>12</sup>. Alcuni studi *in vivo* hanno dimostrato la sua efficacia antiossidante e antinfiammatoria in modelli murini di colite, parodontite e trauma spinale<sup>13,14,15</sup>. Il glicerofosfoinositolo lisina (GPI), è un derivato semisintetico brevettato<sup>16</sup>, ottenuto a partire dalle lecitine presenti nella pianta di girasole, con azione antinfiammatoria.

Il GPI è in grado di inibire, mediante un feedback negativo, l'attività della fosfolipasi A2 citosolica (cPLA2), enzima che provoca la liberazione di acido arachidonico, il quale a sua volta è metabolizzato per sintetizzare i mediatori dell'infiammazione, come prostaglandine e leucotrieni<sup>17</sup>.

Diversi studi *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato l'efficacia antinfiammatoria di GPI sulla cute, associata alla riduzione sia del prurito sia della disidratazione cutanea (TEWL o Trans Epidermal Water Loss)<sup>17,18,19</sup>.

Lo scopo del lavoro è di valutare l'efficacia di una emulsione otologica contenente LAS<sup>TM</sup> nel trattamento dell'otite esterna da sovracrescita batterica o da lieviti del cane e il suo effetto sulla flora microbica auricolare.

## MATERIALI E METODI

Lo studio clinico è stato condotto secondo le Good Clinical Practice [Gazzetta Ufficiale (G.U.) n° 289; 10 dicembre 1996, 47-53] e previo consenso informato del proprietario.

### Animali

Sono stati selezionati cani di proprietà con un'anamnesi di otite ricorrente, definita come più di tre episodi di otite negli ultimi 18 mesi, e con evidenza alla visita clinica di otite eritematosa e ceruminosa, mono o bilaterale. I cani inclusi presentavano sovracrescita batterica, da lieviti o mista, diagnosticata tramite esame citologico del cerume.

Sono stati esclusi i cani affetti da otite causata da corpi estranei, da cause parassitarie (es. otoacariasi, demodicosi), malattie neoplastiche del canale auricolare, otite cronica polipoide iperplastica idiopatica, otite purulenta, cani con evidenza di otite media (rotazione della testa, rottura del timpano, evidenze radiologiche di effusione nella bolla timpanica). Sono stati inoltre esclusi i cani che erano stati trattati con terapie antibiotiche, antimicotiche sistemiche o topiche auricolari, compresi i detergenti otologici, negli ultimi 7 giorni.

In caso di intenso dolore o difficoltà alla manipolazione, è stato permesso di utilizzare prednisone per via orale 1 mg/kg al giorno per bocca per tre giorni, a condizione che il trattamento fosse interrotto almeno due giorni prima della visita di inclusione. Altri trattamenti farmacologici, già in atto al momento della visita di inclusione dei pazienti, sono riportati in tabella 1.

I proprietari erano liberi di ritirare il proprio cane dallo studio in qualunque momento. Qualsiasi deviazione dal protocollo di studio o reazione avversa comportava l'esclusione del cane dallo studio.

### Visite cliniche e campionamenti

Al momento della visita di selezione (VS) i cani inclusi presentavano un'otite mono o bilaterale eritematosa ceruminosa. Si eseguiva l'esame otoscopico di entrambi i condotti auricolari e l'esame citologico del cerume. Il materiale per quest'ultimo era raccolto con tamponi cotonati introdotti in ogni canale auricolare, strisciato su un vetrino e allestito con colorazione Romanowsky modificata (Diff-Quik® Baxter Diagnostic AG, Dubingen, Switzerland). Per ogni campione si valutava il numero medio di corneociti, corneociti nucleati, granulociti neutrofili e macrofagi in 10 campi a 40X nelle aree con presenza di materiale. I parametri erano poi riportati in modo semiquantitativo in cartella come segue: punteggio di 1 se <5 cellule/campo; 2 se 5-10 cellule/campo; 3 se 11-20 cellule/campo; infine 4 se > 20 cellule/campo. In caso di presenza di granulociti neutrofili o macrofagi nei 10 campi esaminati si escludeva il paziente dallo studio.

Tabella 1 - Trattamenti farmacologici in atto al momento della visita di inclusione dei pazienti

Caso	Trattamento	Patologie concomitanti
1	Oclacitinib	Dermatite simil-atopica (atopic-like dermatitis)
2	Oclacitinib	Dermatite atopica
3	Oclacitinib	Dermatite atopica
4	Milteforan	Leishmaniosi
5	Oclacitinib	Dermatite atopica
6	Oclacitinib	Dermatite atopica like
7	Nessun trattamento	Dermatite atopica e RAC
8	Ciclosporina	Dermatite atopica
9	Asit (immunoterapia specifica)	Dermatite atopica
10	Asit (immunoterapia specifica)	Dermatite atopica

Per la conta microbica si procedeva nello stesso modo, valutando però la presenza di batteri coccoidei, batteri bastoncellari e lieviti del genere *Malassezia* spp. I parametri erano poi riportati in modo semiquantitativo in cartella come segue: punteggio di 1 se <10-20/campo; 2 se 21-30/campo; 3 se 31-40/campo; 4 se >40/campo. Se l'esame otoscopico e citologico erano compatibili con sovracrescita batterica e/o di *Malassezia* spp. (più di 10 batteri o 10 lieviti per campo a ingrandimento microscopico 40X, presenza di cheratinociti ed assenza di granulociti neutrofili o macrofagi) l'animale era incluso nello studio (visita di inclusione V1). Al momento della visita di inclusione si valutavano le condizioni del padiglione auricolare e le lesioni dermatologiche della pinna.

Era inoltre chiesto al proprietario di valutare il prurito del proprio cane tramite l'uso di una scala analogica del prurito (VAS)<sup>20</sup>.

#### Valutazione del canale auricolare

I canali auricolari esterni erano valutati tramite otoscopia nella porzione verticale e orizzontale. I parametri esaminati erano: quantità di cerume, eritema, erosioni e ulcere. I punteggi attribuiti per ciascun parametro erano di: 0, nessuna lesione presente; 1, lieve; 2 e 3 moderato; 4 e 5 severo. Il punteggio finale corrispondeva alla somma di ciascun parametro (Figura 1).

VALUTAZIONE				eritema	ulcere	erosioni	cerume
CANALE AURICOLARE ESTERNO	sinistro		verticale orizzontale				
	destro		verticale orizzontale				
grading (ogni lesione e sede): nessuno: 0; 1: lieve; 2,3: moderato; 4,5: severo					TOTAL Score		
CADESI-MODIFICATO			eritema	lichenificazione	escoriazioni	alopecia auto-indotta	TOTALE
faccia	pre-auricolare						
	perioculare						
capo	dorsale						
pinna auricolare	sinistra	convessa					
		concava					
	destra	convessa					
		concava					
grading (ogni lesione e sede): nessuno: 0; 1: lieve; 2,3: moderato; 4,5: severo				TOTAL Score			

Figura 1 - Schema utilizzato per la valutazione clinica del condotto uditivo esterno e del padiglione auricolare con CADESI modificato.



## Valutazione delle lesioni dermatologiche tramite CADESI modificato

La valutazione delle lesioni dermatologiche si effettuava tramite l'impiego di un CADESI<sup>21</sup> modificato con uso esclusivo del punteggio e dei parametri riferiti a capo e pinne auricolari (Figura 1). Le alterazioni dermatologiche esaminate erano: eritema, lichenificazione, alopecia ed escoriazioni. Come per il canale auricolare, venivano attribuiti dallo stesso sperimentatore valori di: 0, nessuna lesione presente; 1, lieve; 2 e 3 moderato; 4 e 5 severo. Il punteggio finale corrispondeva alla somma dei punteggi per ciascun parametro (Figura 1).

**Valutazione clinica del condotto uditivo e della pinna tramite CADESI e VAS e dei parametri citologici del cerume alla visita di inclusione.**

## Valutazione del prurito tramite VAS

Si chiedeva al proprietario di esprimere il proprio giudizio sul prurito del paziente apponendo un segno su una linea di 10 cm con dei descrittori a intervalli precisi. Il valore del prurito corrispondeva alla distanza della linea apposta dallo zero. Il valore, corrispondente a un numero da 0 a 10, veniva poi annotato in cartella.

## Trattamento

Al termine della visita di inclusione, il primo trattamento veniva eseguito dallo sperimentatore, instillando 4-8 gocce del prodotto (Actea<sup>TM</sup> Oto, Candioli, Torino) nel canale o nei canali auricolari con otite senza alcun lavaggio aggiuntivo. La base dell'orecchio veniva quindi massaggiata delicatamente per consentire un'adeguata distribuzione del prodotto al suo interno. Si consegnava poi il preparato da testare al proprietario con l'istruzione di ripetere il trattamento ogni 12 ore per 14 giorni. Le visite di controllo venivano fissate a 7 (V7) e 14 (V14) giorni. La visita finale era eseguita a 21 giorni (VF). Durante ogni visita venivano eseguiti l'esame otoscopico, l'esame citologico, la valutazione delle lesioni dermatologiche tramite CADESI modificato e del prurito tramite VAS.

Durante l'ultima visita (V21), al proprietario era chiesto di esprimere un'opinione sulla risposta alla terapia e

sulla facilità di esecuzione del trattamento scegliendo tra scarsa, moderata, buona ed eccellente.

## STATISTICA

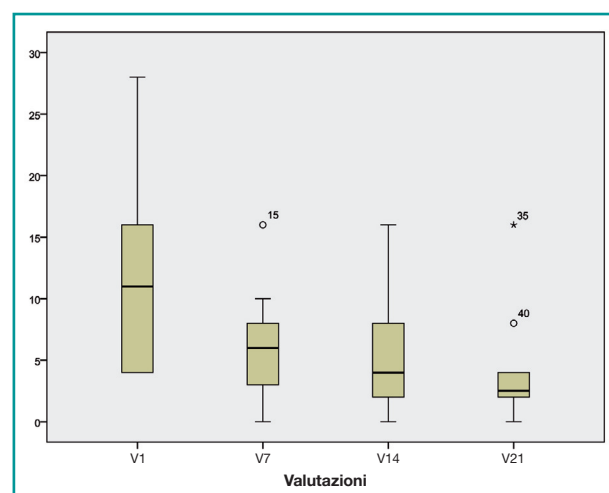
L'analisi statistica è stata effettuata tramite software SPSS (versione 19; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). I dati sono stati analizzati con test di Shapiro-Wilk e di Kruskal-Wallis se con distribuzione normale; diversamente con test di Friedman per dati non normalmente distribuiti ad analisi ripetute. Si consideravano statisticamente significativi i dati con un valore di p-value  $\leq 0.05$ .

## RISULTATI

Sono stati inclusi in totale 10 cani; tutti gli animali inclusi hanno concluso lo studio; in nessun paziente si sono verificate reazioni avverse al prodotto.

## Valutazione del canale auricolare

Si osservava una riduzione del punteggio medio del 48%, corrispondente a un miglioramento delle lesioni del canale auricolare, dopo i primi 7 giorni, con un p-value  $< 0.0001$  (Tabella 2, Figura 2). In 4 cani su 10 si osservava una riduzione del punteggio del 50% o superiore. In un solo cane (caso 3) il punteggio a V7 era maggiore rispetto a V1. Il punteggio diminuiva ulteriormente tra V1, V7, V14 e V21 con una differenza statisticamente significativa. Al giorno 21 il punteggio medio era diminuito del 65% rispetto alla visita di inclusione ( $p < 0.0001$ ).



**Figura 2** - Valutazione della diminuzione del punteggio lesionale del canale auricolare a V1, V7, V14 e V21.

**Tabella 2** - Valutazione del punteggio lesionale e dei parametri clinici di tutti i cani selezionati a V1, V7, V14 e V21

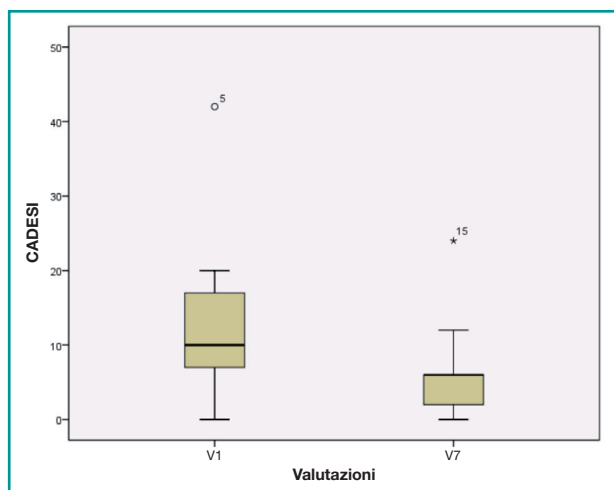
Visita	Canale auricolare	CADESI modificato	VAS
V1	11.9 ± 2.378	13.30 ± 3.636	5.0 ± 0.601
V7	6.20 ± 1.436	6.70 ± 2.191	3.18 ± 0.536
V14	5.10 ± 1.449	5.80 ± 2.225	2.90 ± 0.640
V21	4.10 ± 1.509	4.60 ± 1.945	3.30 ± 0.578

Anno 29, n° 3, Giugno 2015

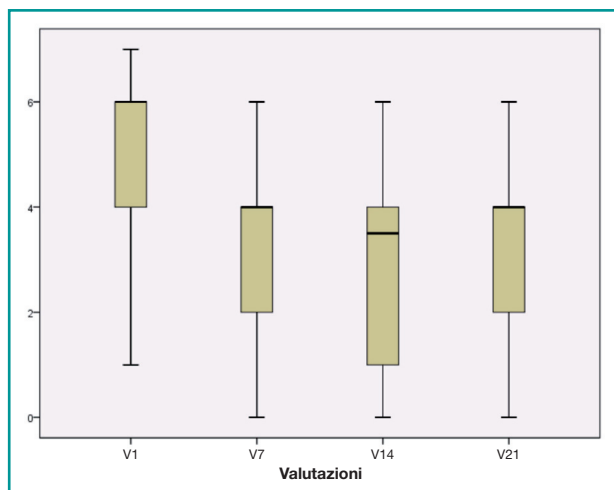
VETERINARIA

### Valutazione della pinna tramite CADESI modificato

Si osservava dopo i primi 7 giorni una riduzione del punteggio lesionale medio del 49%, corrispondente a un miglioramento delle lesioni della pinna auricolare. In 5 cani su 10 si osservava un miglioramento del 50% o superiore. Il miglioramento proseguiva fino al giorno 21 con una differenza statisticamente significativa tra V1e V7, V14 e V21 ( $p < 0.0001$ ) (Tabella 2, Figura 3).



**Figura 3** - Diminuzione del punteggio lesionale CADESI modificato tra V1 e V7.



**Figura 4** - Valutazione del punteggio VAS tra V1, V7, V14 e V21. Si nota la diminuzione significativa del prurito tra V1 e V21.

Tra V14 e 21 non vi era differenza statisticamente significativa. A V21 il punteggio medio era diminuito del 65% rispetto a V1.

### Valutazione del prurito tramite VAS

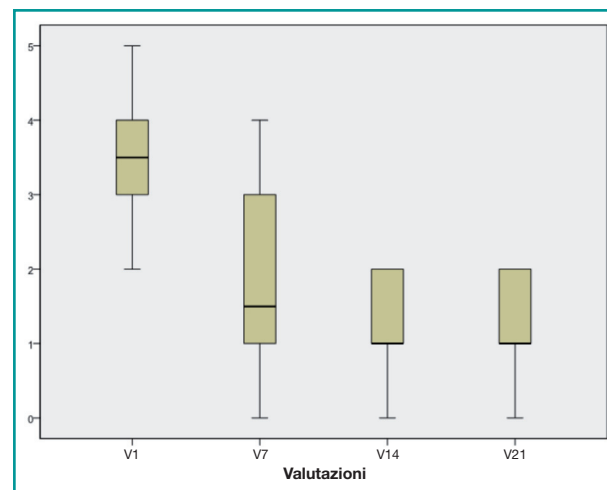
Tra V1 e V7 si osservava una riduzione del punteggio medio del 36% con p-value pari a 0,008, quindi statisticamente significativo (Tabella 2, Figura 4). Diversamente, non si osservava una differenza statisticamente significativa tra i dati raccolti a V14 e V21 rispetto a V7, mentre erano significativamente differenti rispetto a V1 (dati con distribuzione non normale, test di Friedman,  $p < 0.0001$ ).

**Miglioramento dei parametri clinici e citologici alle visite di controllo dopo 14 giorni di terapia topica.**

### Esame citologico del cerume

#### *Cheratinociti*

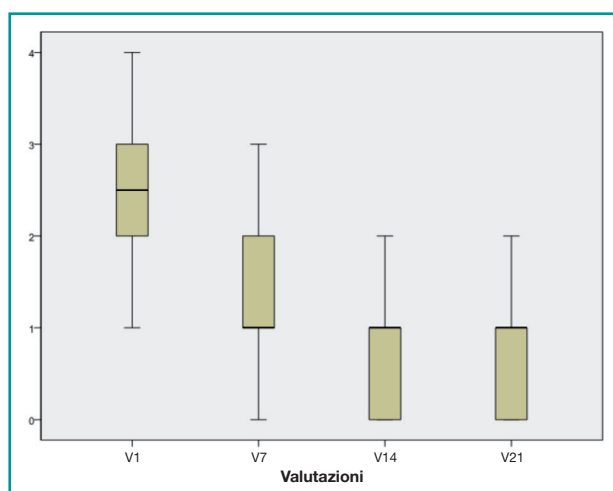
Tra V1, V7, V14 e V21 si osservava una riduzione del numero di cellule statisticamente significativa, pari al 68%, con un valore di p-value  $< 0.0001$  (Tabella 3, Figura 5). Tra V14 e V21 la differenza non era statisticamente significativa.



**Figura 5** - Valutazione delle cellule epiteliali (cheratinociti). Si nota la diminuzione statisticamente significativa tra V1 e V7, mentre rimane costante tra V14 e V21.

**Tabella 3 - Valutazione degli esami citologici eseguiti a V1, V7, V14 e V21**

Visite	Cellule	Batteri	Malassezia spp.
V1	3.50 ± 0.342	2.50 ± 0.342	0.6 ± 0.221
V7	1.80 ± 0.389	1.3 ± 0.260	0.3 ± 0.153
V14	1.10 ± 0.233	0.7 ± 0.213	0
V21	1.20 ± 0.249	0.7 ± 0.213	0



**Figura 6** - Valutazione della carica batterica. Anche in questo caso vi è una differenza statistica tra V1 e V7, non tra V14 e V21.

#### Batteri coccoidi e bastoncellari

Tra V1, V7, V14 e V21 si osservava una riduzione del numero di batteri statisticamente significativa, pari al 48%, con un p-value <0.0001 (Tabella 3, Figura 6). Tra V14 e V21 non vi era differenza statisticamente significativa.

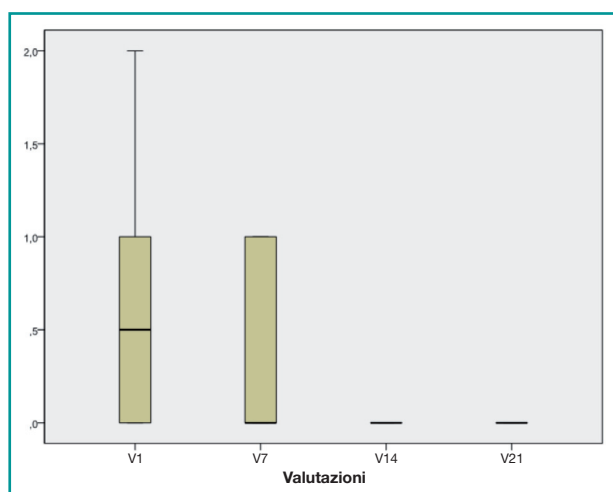
#### Malassezia spp.

Tra V1 e V7 si osservava una riduzione del 50% del numero di lieviti statisticamente significativa, con un valore di p-value <0.0001 (Tabella 3, Figura 7). Tra V14 e V21 non sono stati identificati lieviti del genere *Malassezia* spp. all'esame citologico.

#### Soddisfazione del proprietario

##### Risposta alla terapia

In un caso il proprietario non ha espresso la valutazione; dei restanti 9, 7 valutavano buona la risposta alla terapia, uno eccellente e uno moderata.



**Figura 7** - Valutazione della sovracrescita di *Malassezia* spp. ad ogni visita.

#### Facilità di esecuzione

In un caso il proprietario non esprimeva la valutazione; dei restanti 9, 8 valutavano buona la facilità di esecuzione del trattamento ed uno eccellente.

## DISCUSSIONE

Sulla base dei dati ottenuti, il prodotto otologico in esame ha dimostrato una buona efficacia nel ridurre i segni clinici dell'otite eritematosa ceruminosa e nel trattare la sovracrescita microbica da lieviti e batteri. La lattoferricina è in grado di interagire con la membrana cellulare sia dei Gram positivi che dei Gram negativi<sup>8,9</sup> tramite un effetto permeabilizzante che causa la rottura della membrana, e provoca inizialmente l'inibizione della biosintesi delle macromolecole e in ultimo la morte cellulare. Il meccanismo d'azione è differente a seconda che si svolga nei confronti della membrana di batteri Gram negativi o Gram positivi: nel primo caso il peptide agisce sui lipopolisaccaridi, mentre nel secondo sugli acidi lipoteicoici e teicoici<sup>8</sup>.

**Il miglioramento dei parametri clinici e citologici è verosimilmente da ascrivere alle proprietà antimicrobiche e antinfiammatorie rispettivamente di lattoferricina e verbascoside.**

In particolare, è in grado di inibire la crescita di numerosi batteri incluso *Staphylococcus aureus*, a concentrazioni di 2-8  $\mu\text{M}$ <sup>9,10</sup>. Inoltre, è in grado di inibire in vitro la crescita di alcuni lieviti<sup>12</sup> e di impedire la formazione del biofilm in alcune specie batteriche (*Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*)<sup>11</sup>. Per biofilm si intende una comunità strutturata di microorganismi che aderiscono ad una superficie e producono una matrice polimerica che li avvolge e li protegge<sup>22</sup>. Questa struttura favorisce la persistenza dell'infezione ed è uno dei meccanismi di resistenza agli antibiotici<sup>23</sup>. Diversi studi *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato che sia la lattoferrina che la lattoferricina sono efficaci per contrastare la formazione di biofilm e per favorirne la disaggregazione; in particolare la loro azione è dose-dipendente e sinergica con alcune terapie antibiotiche<sup>24</sup>. Il meccanismo d'azione è parzialmente sconosciuto, ma si pensa che agiscano su più fronti, per esempio stimolando la motilità batterica, ostacolando l'adesione batterica lecitina-dipendente<sup>24</sup>, oppure tramite la down-regulation della produzione di cellulosa, uno dei principali costituenti della matrice<sup>23</sup>. Nel nostro studio pilota, le caratteristiche antimicrobiche della lattoferricina sono verosimilmente responsabili del miglioramento dei parametri citologici dopo il trattamento. In particolare, si è osservato dopo i primi 7



giorni una riduzione della carica batterica coccoide e bastoncellare, nonché della *Malassezia* spp., che si è mantenuto fino al giorno 21 di trattamento. È interessante notare che dopo due settimane di utilizzo la carica di *Malassezia* spp. si era ridotta, e tale si è mantenuta anche dopo una settimana dalla sospensione del trattamento. In questo studio clinico, trattandosi di cani di proprietà, non è stato possibile comparare i dati con un gruppo di controllo e quindi valutare l'eventuale attività del placebo (prodotto senza principi attivi). Studi precedenti con altri prodotti otologici hanno mostrato la presenza di miglioramenti clinici anche tramite l'utilizzo esclusivo del veicolo contenuto in alcuni prodotti otologici, in completa assenza di principi attivi farmacologici. Questo miglioramento era verosimilmente attribuibile all'attività di pulizia e rimozione di cerume ed essudato<sup>25</sup>. Tuttavia, non essendo il prodotto oggetto del nostro studio, utilizzato come lavaggio auricolare ma come prodotto topico in emulsione, appare meno probabile che l'attività antimicrobica sia da associare solo ad una asportazione meccanica del materiale auricolare.

**Glicerofosfoinositolo lisina contribuisce a ridurre la TEWL in medicina umana.**

La verbascoside è una molecola fenolica presente naturalmente nel regno vegetale, con una elevata attività antinfiammatoria e antiossidante<sup>13</sup>. La sua efficacia nel ridurre le citochine pro-infiammatorie e i radicali liberi è stata dimostrata in alcuni modelli *in vivo* di colite, parodontite e trauma spinale<sup>14,15,16</sup>. Non sono ancora stati pubblicati studi sull'attività di questa molecola nel cane.

Il GPI è un derivato ottenuto dalle lecitine del girasole; esso ha un'azione antinfiammatoria poiché interviene nel sistema fisiologico di autoregolazione della cascata dell'infiammazione, con un meccanismo simile a quello con cui agiscono i glucocorticoidi<sup>26</sup>, ma senza gli effetti collaterali che essi comportano. La sua attività è stata testata su soggetti umani affetti da dermatite allergica e infiammatoria con buoni risultati sulla riduzione del rossore, del prurito e dell'eccessiva presenza di sebo e forfora<sup>27</sup>. Non vi sono invece studi in medicina veterinaria in merito. Le proprietà antinfiammatorie di GPI e verbascoside sono ragionevolmente le responsabili del miglioramento delle condizioni della pinna e del condotto auricolare osservate durante il trattamento; si è evidenziato un miglioramento rapido e progressivo delle condizioni del canale auricolare con riduzione di eritema, erosioni e ulcere ove presenti. Anche i parametri legati alle condizioni della pinna sono migliorati sensibilmente con diminuzione di eritema, alopecia, escoriazioni e lichenificazione. In medicina umana il

GPI può contribuire a normalizzare i valori di TEWL<sup>18</sup>. In questo studio, non è stato possibile effettuare alcuna misurazione della TEWL per valutare se anche nel cane si possono ottenere gli stessi risultati. Peraltro, in medicina veterinaria, non esistono altri studi sull'impiego di questa molecola come antinfiammatorio cutaneo. Sarebbe interessante, per questo motivo, ottenere più dati nel cane sulle lesioni eritematose cutanee e auricolari con sovracrescita batterica o da lieviti, ed anche sulla eventuale modificazione della TEWL.

La persistenza di alcune lesioni, sebbene di gravità inferiore, al termine del trattamento è probabilmente legata al mancato controllo delle malattie sottostanti, *in primis* la dermatite atopica. Per quanto riguarda il prurito, si è osservato un miglioramento del parametro entro la prima settimana di utilizzo, che si è mantenuto durante le successive settimane di terapia con il topico auricolare. Anche in questo caso, il prurito residuo è con molta probabilità legato alla presenza delle malattie sottostanti.

Come già accennato in precedenza, lo studio ha numerose limitazioni. *In primis*, il numero di animali incluso è basso. Questo è fondamentalmente legato alla difficoltà di selezionare proprietari disponibili ad eseguire frequenti controlli clinici. Inoltre, come accennato in precedenza, non è stato usato un placebo per ragioni etiche. In futuro, sarebbe interessante poter eseguire uno studio multicentrico in doppio cieco per valutare meglio e confermare ulteriormente l'effetto del prodotto testato e per valutare l'eventuale miglioramento delle lesioni correlato solo al veicolo.

**Saranno necessari ulteriori studi per confermare l'efficacia del prodotto.**

Ulteriori limitazioni sono legate alle metodiche di valutazione utilizzate in questo studio, che non sono al momento validate. È stata descritta e validata una metodica semiquantitativa per la valutazione della citologia cutanea, con punteggi da 0 a 4+, con criteri simili a quelli utilizzati in questo studio ma che non prevedono un numero preciso di cellule per ciascun punteggio<sup>28</sup>. Per questo motivo si è preferito utilizzare un sistema che, benché non validato, permettesse di valutare più precisamente il numero di microorganismi. Per quanto riguarda invece la valutazione delle condizioni cliniche del canale auricolare e dei dotti, si è scelto di utilizzare una scala a 5 punti e una versione modificata del CADESI, rispettivamente, perché al momento non esistevano metodiche validate. Recentemente, è stata proposta una metodica che utilizza un punteggio clinico obbiettivo per la valutazione dell'otite esterna del cane<sup>29</sup>. Sarebbe opportuno utilizzare questa metodica per futuri studi.

Concludendo, dai dati emersi il prodotto può essere considerato un trattamento efficace per controllare la sovracrescita microbica mista in corso di otite esterna eritematosa ceruminosa.

## RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia l'Istituto Farmaceutico Candioli spa per aver fornito il prodotto utilizzato in questo studio.

### PUNTI CHIAVE

- La lattoferricina è una molecola ad azione antimicrobica nei confronti di numerose specie batteriche, tra cui *Staphylococcus aureus*, ed in grado di ridurre la formazione di biofilm.
- La verbascoside è un derivato fenolico ad azione antiossidante e antinfiammatoria; la sua attività è stata dimostrata in modelli di colite, parodontite e trauma spinale.
- Il glicerofosfoinositolo lisina ha un effetto antinfiammatorio ed è in grado di migliorare la transepidermal water loss (TEWL) e le caratteristiche cutanee dei pazienti umani affetti da dermatite allergica.

## Use of lactoferricin, verbascoside and glycerophosphoinositol emulsion in otitis externa treatment: a pilot study

### Summary

*Otitis externa is a common clinical problem that requires complex pharmacological therapies. The aim of this paper was to evaluate, in course of external erythematous otitis with microbial overgrowth, a topical otologic emulsion containing lactoferricin, verbascoside and glycerophosphoinositol lysine. Ten cases of erythematous otitis with bacterial and/or yeasts overgrowth were included according to good general practice guidelines. Visits were performed at day 0 (V1 inclusion), day 7 (V7) and day 14 (V14) plus 7 days (V21) after withdraw of treatment. Each time complete reevaluation of clinical parameters (VAS and modified CADESI) and cytological smears of cerumen were done. Every sample was quantitatively judged for epithelial cells, cocci, rods and Malassezia spp. Statistical analysis was performed with Shapiro-Wilk and Kruskal-Wallis tests for normally distributed data; Friedman test was used for non parametric data and repeated analysis. A P-value <0.05 was considered statistically significant. A statistically significant decrease of all parameters was observed after 7 days of treatment, improving until one week after topical discharge. This pilot study suggests the efficacy of a daily use for two weeks of an emulsion containing lactoferricin, verbascoside and glycerophosphoinositol lysine in decrease clinical and microbial overgrowth in recurrent otitis externa.*

### BIBLIOGRAFIA

1. Miller WH, Griffin CE, Campbell KL. Otitis externa. In: Muller and Kirk's small animal dermatology. Philadelphia: Saunders Company, 2013, pp. 741-773.
2. Rosychuk RA. Management of otitis externa. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice Sep;24(5):921-52, 1994.
3. Lloyd DH. Alternatives to conventional antimicrobial drugs: a review of future prospects. Veterinary Dermatology 23:299-304, 2012.
4. Kim JS, Ellman MB, Yan D, *et al.* Lactoferricin mediates anti-inflammatory and anti-catabolic effects via inhibition of IL-1 and LPS activity in the intervertebral disc. Journal of Cellular Physiology 228:1884-96, 2013.
5. Gifford JL, Hunter NH and Vogela HJ. Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. Cellular and Molecular Life Science 62:2588-2598, 2005.
6. Jenssen H. Anti herpes simplex virus activity of lactoferrin/lactoferricin - an example of antiviral activity of antimicrobial protein/peptide. Cellular and Molecular Life Science 62:3002-3013, 2005.
7. McCann KB, Lee A, Wan J *et al.* The effect of bovine lactoferrin and lactoferricin B on the ability of feline calicivirus (a norovirus surrogate) and poliovirus to infect cell cultures. Journal of Applied Microbiology 95:1026-1033, 2003.
8. Sinha M, Kaushik S, Kaur P, *et al.* Antimicrobial lactoferrin peptides: the hidden players in the protective function of a multifunctional protein. International Journal of Peptides 2013:390230, 2013.
9. Hoek KS, Milne JM, Grieve PA, Dionysius DA, *et al.* Antibacterial activity of bovine lactoferrin-derived peptides. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 41:54-59, 1997.
10. Bellamy W, Takase M, Wakabayashi H, *et al.* Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. Journal of Applied Bacteriology 73:472-9, 1992.
11. Wakabayashi H, Yamauchi K, Kobayashi T, *et al.* Inhibitory effects of lactoferrin on growth and biofilm formation of Porphyromonas Gingivalis and Prevotella Intermedia. Antimicrobial Agents And Chemotherapy: 3308-3316, 2009.
12. Choi H, Hwang JS, Lee DG. Antifungal effect and pore-forming action of lactoferricin B like peptide derived from centipede Scolopendra subspinipes mutilans. Biochimica et Biophysica Acta 1828:2745-2750, 2013.
13. Vertuani S, Beghelli E, Scalambra E *et al.* Activity and stability studies of verbascoside, a novel antioxidant, in dermo-cosmetic and pharmaceutical topical formulations. Molecules 16:7068-7080, 2011.
14. Mazzon E, Esposito E Di Paola R *et al.* Effects of verbascoside biotechnologically produced by Syringa vulgaris plant cell cultures in a rodent model of colitis. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 380:79-94, 2009.

15. Paola RD, Oteri G, Mazzon E, *et al.* Effects of verbascoside, biotechnologically purified by *Syringa vulgaris* plant cell cultures, in a rodent model of periodontitis. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 63: 707-717, 2011.
16. Genovese T, Paterniti I, Mazzon E, *et al.* Efficacy of treatment with verbascoside, biotechnologically produced by *Syringa vulgaris* plant cell cultures in an experimental mice model of spinal cord trauma. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 382:331-345, 2010.
17. Corda D, Dal Toso R, Bonvento G, *et al.* Glycerophosphoinositol derivatives as modulators of cytosolic A2 phospholipase, EU Patent EP1332149B1, 02.11.2005.
18. Falconi Klein E, Carrera C, Richelmi P. Evaluation of protective and dermo-balancing of a product for normalizing scalp psoriasis, by clinical trial use of polarized light camera and TEWL. Biobasic Europe (Milan) University of Pavia, (Report n. 0201L07-05F) May 2003.
19. Yahagi S, Izutsu Y, Okano Y, *et al.* Glycerophosphoinositol is a novel modulator of cytosolic phospholipase A2 (cPLA2): its anti-inflammatory effects and a possible mechanism. 25th IFSCC Congress, Barcelona, 6-9 October 2008.
20. Hill PB, Lau P, Rybnicek J. Development of an owner-assessed scale to measure the severity of pruritus in dogs. *Veterinary Dermatology* Oct;18(5):301-8, 2007.
21. Olivry T, Marsella R, Iwasaki T *et al.* Validation of CADESI-03, a severity scale for clinical trials enrolling dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology* 18:78-86, 2007.
22. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 21, 284(5418):1318-22, 1999.
23. Xu G, Xiong W, Hu Q. Lactoferrin-derived peptides and Lactoferricin chimera inhibit virulence factor production and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Microbiology*, 109(4): 1311-8, 2010.
24. Ammons MC, Copié V. Mini-review: Lactoferrin: a bioinspired, anti-biofilm therapeutic. *Biofouling* 29(4):443-55, 2013.
25. Noli C, Belova S, Bensignor E *et al.* L'uso di una soluzione detergente auricolare a base di clorexidina 0,15% e Tris-EDTA nell'otite batterica. *Veterinaria*, 26 (3):39-45, 2012.
26. Bonina FP, Gimillaro D, Melandri F, *et al.* Protective effect of topical formulations based on glycerophosphoinositol choline salt. *Dermatologia Ambulatoriale* 4, 2006.
27. Motolese A, Simonelli M. Effect of glycerophosphoinositol salt of choline 1% cream on mild-to-moderate inflammatory and allergic dermatitis. *Dermatological Experiences* 10:135-40, 2008.
28. Budach SC and Muller RS. Reproducibility of a semiquantitative method to assess cutaneous cytology. *Veterinary Dermatology*, 23: 426-431, 2012.
29. Nuttal T and Bensignor E. A pilot study to develop an objective clinical score for canine otitis externa. *Veterinary Dermatology*, 25: 530-537, 2014.

PM1757\_v1

**actea™**

**NOVITÀ**  
**Innovazione Candioli**

# Il nuovo approccio in dermatologia

Natura e tecnologia al servizio di cani e gatti:  
binomio vincente per la massima efficacia e tollerabilità



**actea™**  
**OTO**

Gocce auricolari  
ceruminolitiche,  
lenitive  
ed igienizzanti

**actea™**  
**DERMO**

Lozione  
dermatologica  
protettiva, lenitiva  
ed igienizzante

**actea™**  
**SHAMPOO**

Shampoo  
protettivo,  
lenitivo  
ed igienizzante

**actea™**  
**ORAL**

Gel stomatologico  
protettivo  
Riduce la placca  
e controlla l'alitosi

con



## Formula esclusiva brevettata\*

Mix di molecole di origine naturale (Lactoferricina, GPI e Verbascoside) per un efficace controllo dell'infiammazione, del prurito e della sovracrescita batterica e fungina.

\*patent pending

ACTEA™ e LAS™ sono marchi depositati da Candioli S.p.A.

[www.candioli-vet.it](http://www.candioli-vet.it)

**Candioli**  
FARMACEUTICI