

# **ATTIVITÀ ANTIVIRALE NEI CONFRONTI DI ORF VIRUS DI UN MEDICAMENTO (MIX 557) A BASE DI AZADIRACHTA INDICA (ALBERO DEL NEEM) E *HYPERICUM PERFORATUM***

**V. Galligioni, F. Carnevali, S.A. van der Esch, A. Scagliarini**

*1Dip. di Sanità Pubblica Vet. e Patologia Anim. Alma Mater Studiorum, Univ. di Bologna*

*2ENEA, UT Biorad, C.R. Casaccia, Roma*

**I Quaderni ZooBioDi N. 3/2010 pag 96-102**

## **RIASSUNTO**

*Orf virus (OV) è il prototipo dei virus del genere Parapoxvirus ed è responsabile di un'infezione della cute negli ovi-caprini nota come ectima contagioso. Non esistono farmaci antivirali autorizzati per la terapia dell'ectima contagioso negli animali e nell'uomo nonostante sia stata dimostrata l'efficacia in vitro di diversi composti di sintesi della famiglia dei nucleotidi aciclici fosfonati. In questo studio, è stata valutata l'efficacia antivirale di un medicamento brevettato ENEA a base di sostanze naturali estratte da Azadirachta indica (albero del Neem) e Hypericum perforatum. I risultati ottenuti indicano che le proprietà cicatrizzanti del medicamento possono favorire una più rapida risoluzione delle lesioni negli animali trattati. La dimostrazione di una specifica attività antivirale del prodotto necessita di ulteriori approfondimenti.*

*Parole chiave: Orf virus, Azadirachta indica, Hypericum perforatum*

## **ABSTRACT**

**Antiviral activity against Orf virus of a medical device (MIX 557) based on Neem (Azadirachta indica (A. Juss)) and St John's Wort (Hypericum perforatum (L.)) extracts.**

Orf virus (OV) is the prototype of the Parapoxvirus genus and is the causative agent of an exanthemous disease in sheep and goats known as contagious pustular dermatitis or also ecthyma contagiosum, which is a zoonotic disease. Orf virus infection is a professional zoonotic disease that interests mainly those workers who come in direct contact with infected animals or their products. The virus penetrates through skin lesions and replicates in epidermal cells, the lesions become evident and progresses from a rash towards a pustular stadium ending up with crust formation. The crust, which contains millions of viral particles, dries up and detaches from the infected animal thus contaminating the surrounding environment. No authorised drugs exist for the treatment of ecthyma contagiosum in animal as in human although synthetic products from the acyclic nucleoside phosphonate family exist for which the efficacy in vitro has been demonstrated. In this study the antiviral efficacy of a medical device based on natural substances extracted from the neem tree (Azadirachta indica (A. Juss)) and Hypericum perforatum (L.) has been evaluated. The results demonstrate that the wound healing properties of this medical device might favour a faster healing of the treated animals while the demonstration that it has anti-viral properties deserves further attention.

## **INTRODUZIONE**

Orf virus (OV) è il prototipo dei virus del genere Parapoxvirus ed è responsabile di un'infezione della cute negli ovi-caprini nota come ectima contagioso, che ha carattere zoonosico. L'ectima contagioso è una malattia a diffusione mondiale, maggiormente presente nelle aree ad elevata densità ovi-caprina. In queste regioni la malattia tende ad endemizzare provocando talvolta gravi perdite economiche legate alla morte o alla scarsa crescita degli agnelli o alle complicazioni mammarie nelle pecore adulte che nei casi più gravi possono avere esito letale (Gilray et al., 1998). L'infezione si realizza per via transcutanea, il virus penetra attraverso lesioni e replica nelle cellule epidermiche. Dopo 3 o 4 giorni post-infezione, le lesioni diventano evidenti e progrediscono dallo stadio di eritema a pustola, risolvendosi con la formazione di croste. Le croste contengono milioni di particelle virali, che una volta essiccate, si distaccano dall'animale contaminando l'ambiente. La diffusione e l'endemizzazione di questa infezione nei greggi sono correlate.

all'elevata resistenza del virus orf nell'ambiente e alla limitata durata dell'immunità che non è in grado di proteggere gli animali nelle successive reinfezioni. Nonostante la diffusione e l'elevata incidenza dell'infezione, non è ancora disponibile alcun vaccino in grado di proteggere completamente gli animali. Non esistono farmaci antivirali autorizzati per la terapia dell'ectima contagioso negli animali e nell'uomo nonostante sia stata dimostrata l'efficacia in vitro di diversi composti della famiglia dei nucleotidi aciclici fosfonati (Dal Pozzo et al., 2005) e la molecola (S)-1-[3-hydroxy-2- (phosphonomethoxy) propyl]cytosine (Cidofovir, HPMPC) abbia dimostrato attività anti-OV anche in vivo (Scagliarini et al., 2007a; Sonvico et al., 2009). L'obiettivo di questa sperimentazione in vivo è stato quello di valutare l'effetto terapeutico e l'eventuale azione antivirale del medicamento Brevetto ENEA, denominato MIX 557, a base di estratti oleosi di *Azadirachta indica* (albero del Neem) e *Hypericum perforatum*. che ha già dimostrato di possedere proprietà cicatrizzanti che permettono di gestire le lesioni esterne senza complicazioni batteriche o parassitarie, in qualunque stadio del processo si intervenga (Carnevali et al., 2007a-b; van der Esch et al., 2007).

## MATERIALI E METODI

Per l'infezione è stato utilizzato ceppo di OV IT 988/04 isolato da materiale crostoso prelevato da animali con infezione naturale. L'inoculo è stato preparato a partire da 1 gr di crosta tritata e sospesa in una soluzione di 10 ml di PBS con 10% di penicillina, streptomina e anfotericina B (Gibco, UK). La sospensione è stata centrifugata a 12000 xg per 30 minuti a 4°C. Dal surnatante di questa soluzione sono stati preparati degli inoculi da 200 µl con cui sono state infettate le singole lesioni tramite tampone. Lo studio in vivo è stato effettuato secondo quanto disposto ex lege (D.Lvo 116/92) e previa valutazione ed approvazione del Comitato Etico Scientifico per la sperimentazione animale dell'Università di Bologna. Due gruppi da 5 agnelli ciascuno, sono stati infettati tramite scarificazione di circa 2,5 cm del piatto interno di entrambe le cosce (Nettleton et al, 1996). La lesione dell'arto sinistro è stata trattata, mentre quella dell'arto destro non ha subito trattamento, fungendo da controllo in ogni animale. Il trattamento è stato effettuato utilizzando due diverse formulazioni, una rappresentata dal medicamento Mix 557, l'altra, simile per aspetto, contenente un placebo (olio d'oliva). Gli esperimenti sono stati effettuati in doppio cieco, a partire dal 4°giorno post-infezione, ogni animale è stato trattato 1 volta al giorno per 6 giorni consecutivi spruzzando sulla lesione il preparato e lasciando asciugare per 3 minuti, in modo da favorire l'assorbimento della soluzione. Per valutare lo sviluppo della lesione, le zone infette sono state esaminate giornalmente per un periodo totale di 22 giorni. Le lesioni sono state fotografate e misurate per monitorare lo spessore a livello della zona di scarificazione sia della lesione trattata che di quella controlaterale di controllo non trattata. Le croste formate a seguito dell'infezione sono state rimosse e conservate a -80°C. L'effetto del trattamento sulla replicazione virale è stato valutato tramite prove in vitro di crescita virale su cellule di testicolo ovino, TOB (Scagliarini et al., 2007), e tramite quantificazione del DNA virale totale mediante Real Time PCR. La Real-Time PCR messa a punto per la quantificazione di OV (Gallina et al., 2006) si basa sull'amplificazione di un frammento di 70 bp di una regione molto conservata del gene B2L. L'analisi della reazione è stata seguita mediante apposito software in dotazione allo strumento Rotor gene 3000 (Corbett research, Australia). I dati ottenuti sono stati analizzati con test One Way ANOVA, seguito da Tukey test per evidenziare differenze statisticamente significative.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Dopo 3-4 giorni dall'infezione, tutti gli agnelli hanno cominciato a sviluppare le tipiche lesioni da OV, caratterizzate da intenso eritema, edema lungo le linee di scarificazione e la comparsa di pustole. In questa fase non si è evidenziata differenza statisticamente significativa ( $P>0,05$ ) tra gli spessori delle lesioni

sviluppate da tutti gli animali indicando che queste stavano progredendo normalmente e non erano influenzate da fattori individuali. Gli animali trattati con Mix 557 hanno mostrato spessori cutanei inferiori, anche se non in maniera statisticamente significativa, a livello di arto sinistro (trattato) in confronto al controlaterale, mentre una differenza statisticamente significativa ( $P < 0.05$ ) è stata riscontrata tra gli spessori relativi alle lesioni trattate con Mix 557 e quelle trattate con placebo a partire dal 3° giorno di trattamento. Questo dato può inoltre indurre a pensare che Mix 557, favorisca la risoluzione della lesione. E' infatti noto che l'estratto oleoso di *Azadirachta indica* potrebbe inibire la diffusione del virus da cellula a cellula (McKeever et al., 1988) mentre in combinazione con *Hypericum perforatum* (Mix 557) potrebbe favorire la guarigione della lesione grazie alle dimostrate proprietà cicatrizzanti (Carnevali et al., 2007a-b). Un'altra ipotesi dell'attività del Neem potrebbe essere correlata alla sua azione su VEGF espresso da orf virus. Le lesioni da orf virus presentano una vascolarizzazione notevole, legata alla produzione di Vascular Endothelial Growth Factor virale (VEGF-E), soprattutto nelle prime fasi della replicazione virale (Meyer et al., 1999). Il VEGF-E presenta caratteristiche comuni con gli altri VEGF dei mammiferi, compresa la capacità di stimolare la proliferazione di cellule endoteliali e la permeabilità vascolare sia in vitro che in vivo (Savory et al., 2000; Scagliarini et al., 2006). I risultati preliminari di questo studio, perciò, farebbero ipotizzare che Mix 557 possa contrastare indirettamente l'azione lesiva di OV inibendo la produzione di VEGF-E e quindi depotenziando il processo di angiogenesi indotto dal virus, con conseguente diminuzione di eritema ed edema a livello di lesione. Recentemente, Priyadarsini et al. (2009) hanno dimostrato come il limonoide azadiractina presente nel Neem abbia attività anticarcinogenetiche tramite la modulazione dell'ossidazione lipidica e proteica, l'aumento delle difese antiossidanti e l'inibizione della proliferazione cellulare e angiogenesi. Anche la componente lipofilica del medicamento MIX 557 proveniente dall'*Hypericum perforatum* contribuisce efficacemente a ridurre la reazione infiammatoria legata all'infezione in quanto è stato dimostrato che l'iperforina presente nell'estratto lipofilico di iperico possiede spiccate proprietà antiossidanti (Heilman et al. 2003) oltre che inibenti la formazione di radicali ossidativi fortemente reattivi, del rilascio di elastasi dai leucociti (Feisst and Werz 2004), e rilascio di cyclooxygenasi, di 1, 5-lipoxygenasi (Albert et al., 2002) e di IL-6 (Gobbi et al. 2004) con attività antinfiammatoria dell'estratto oleoso di iperico in toto (S. Sosa et al., 2007).

Il virus contenuto nelle croste provenienti da tutti i soggetti è risultato vivo e vitale, in quanto in grado di provocare effetto citopatico (CPE). Non è stata evidenziata una differenza tra il CPE prodotto dal virus presente nelle croste raccolte dall'arto trattato e quello prodotto dall'arto non trattato degli animali dei due gruppi. Solo in due soggetti del gruppo trattato con Mix 557 è stata rilevata una netta differenza nel CPE provocato dalle croste raccolte dall'arto destro (non trattato) e sinistro (trattato). I risultati preliminari ottenuti tramite quantificazione del DNA virale in Real Time PCR mostrano come il trattamento con placebo sia stato inefficace nei confronti di OV, seppure con un elevato grado di variabilità individuale. Nei soggetti trattati con Mix 557, la Real Time PCR ha fornito dei dati controversi sulla possibile efficacia antivirale del trattamento in quanto solo due soggetti presentavano una differenza statisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) nella quantità di DNA virale nelle lesioni non trattate, questo risultato supporta peraltro i dati ottenuti sulle cellule infettate col materiale crostoso proveniente dagli stessi animali.

In conclusione i risultati del nostro studio, dimostrano che le lesioni trattate con il medicamento Mix 557 hanno sviluppato una minore flogosi rispetto a quelle non trattate e a quelle trattate con placebo. In due soggetti la riduzione dello spessore cutaneo è stata anche accompagnata sia da una minore concentrazione di DNA virale che da una ridotta quantità di virus vitale nelle croste delle lesioni trattate rispetto a quelle non trattate, con valori statisticamente significativi. I nostri risultati, seppure preliminari, fanno ipotizzare che il medicamento Mix 557 sia in grado di contrastare l'azione istio-lesiva di orf virus grazie alle sue proprietà cicatrizzanti anche se con i dati ottenuti in questo studio, non è possibile concludere che Mix 557

sia in grado di esplicitare un reale effetto antivirale, quanto piuttosto di ridurre la diffusione del virus a livello cutaneo favorendo la cicatrizzazione delle lesioni più velocemente dell'effetto istiolesivo indotto dal virus.

## **BIBLIOGRAFIA**

- ALBERT, D., ZÜNDORF, I., DINGERMAN, T., MÜLLER, W. E., STEINHILBER, D., WERZ, O. (2002) Hyperforin is a dual inhibitor of cyclooxygenase-1 and 5-lipoxygenase. *Biochem. Pharmacol.* 64: 1767–1775.
- CARNEVALI F, CASTRIGNANO'F, VAN DER ESCH SA. (2007a). Early appearance sacral pressure ulcer in elderly patient treated with innovative topical remedy Mix 557 having healing properties: a case report. *EWMA, Glasglow UK*, 2-4/5.
- CARNEVALI F, LAZZERINI P, VAN DER ESCH SA. (2007b). Chronic pressure ulcer in elderly patient treated with innovative topical remedy Mix 557 having healing properties: a case report. *EWMA, Glasglow UK*, 2-4/5.
- FEISST, C. and WERZ, O. (2004) Suppression of receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> mobilization and functional leukocyte responses by hyperforin. *Biochem. Pharmacol.* 67: 1531–1539.
- GALLINA L, DAL POZZO F, MC INNES CJ, CARDETI G, GUERCIO A, BATTILANI M, CIULLI S, SCAGLIARINI A. (2006). A real time PCR assay for the detection and quantification of orf virus. *J Virol Methods*, 134(1-2): 140-5.
- GOBBI, M., MOIA, M., FUNICELLO, M., RIVA, A., MORAZZONI, P., PENNINI, T. (2004) In vitro effects of the dicyclohexylammonium salt of hyperforin on interleukin-6 release in different experimental models. *Planta Med.* 70: 680–682.
- HEILMAN, J., WINKELMANN, K., STICHER, O. (2003) Studies on the antioxidative activity of phloroglucinol derivatives isolated from hypericum species. *Planta Med.* 69: 202–206.
- MCKEEVER DJ, JENKINSON DM, HUTCHISON G, REID HW. (1988). Studies of the pathogenesis of orf virus infection in sheep. *J Comp Pathol*, 99(3): 317-28.
- NETTLETON PF, BREBNER J, POW I, GILRAY JA, BELL GD, REID HW. (1996). Tissue culture-propagated orf virus vaccine protects lambs from orf virus challenge. *Vet Rec*, 138(8): 184-6.
- PRIYADARSINI RV, MANIKANDAN P, KUMAR GH, NAGINI S. (2009) The neem limonoids azadirachtin and nimbolide inhibit hamster cheek pouch carcinogenesis by modulating xenobiotic-metabolizing enzymes, DNA damage, antioxidants, invasion and angiogenesis. *Free Radic Res*, 43(5): 492-504.
- SAVORY LJ, STACKER SA, FLEMING SB, NIVEN BE, MERCER AA. (2000). Viral vascular endothelial growth factor plays a critical role in orf virus infection. *J Virol*, 74(22): 10699-706.
- SCAGLIARINI A, DAL POZZO F, GALLINA L, GUERCIO A, VACCARI F, BATTILANI M, CIULLI S, PROSPERI S. (2006). In vitro activity of VEGF-E produced by orf virus strains isolated from classical and severe persistent contagious ecthyma. *Vet Microbiol*, 114(1-2): 142-7.
- SCAGLIARINI A, MCINNES CJ, GALLINA L, DAL POZZO F, SCAGLIARINI L, SNOECK R, PROSPERI S, SALES J, GILRAY JA, NETTLETON PF. (2007a). Antiviral activity of HPMP (cidofovir) against orf virus infected lambs. *Antiviral Research*, 73(3): 169-74.
- SOSA S. ROBERTO PACE, ANNA BORNANCIN, PAOLO MORAZZONI, ANTONELLA RIVA, AURELIA TUBARO AND ROBERTO DELLA LOGGIA (2007),. Topical anti-inflammatory activity of extracts and compounds from *Hypericum perforatum* L. *J. Of Pharmacy. and Pharmacology* 59: 1–7.
- VAN DER ESCH SA, CARNEVALI F, CRISTOFARO M. (2007). Mix 557: a topical remedy with repellent, biocidal and healing properties for treating myiasis both in mammals as in human. *EWMA, Glasgow, UK*, 2-4/5.