

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITA' DI BOLOGNA

Dottorato di ricerca in
Epidemiologia e Controllo delle Zoonosi
XIX Ciclo
Coordinatore Prof. Luigi Morganti

Settore scientifico disciplinare VET/05

Virus animali come modello nello studio in vitro dell'attività
di molecole antivirali: applicazioni future in medicina
veterinaria e nei confronti di virus filogeneticamente correlati
responsabili di patologie umane.

Tesi di dottorato di:
Dott.ssa Fabiana Dal Pozzo

Docente guida:
Prof. Santino Prosperi
Dott.ssa Alessandra Scagliarini

Coordinatore:
Prof. Luigi Morganti

Marzo 2007
Sede Amministrativa:
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale
Facoltà di Medicina Veterinaria
Università di Bologna

Alla mia "fragolina" e a Steven

RINGRAZIAMENTI

Il primo ringraziamento va al Prof. Santino Prosperi per avermi dato la possibilità di fare il Dottorato di Ricerca nel Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale.

Quali parole usare per ringraziare la Dott.ssa Scagliarini? Ale, grazie mille per avere creduto in me! Sono stata fortunata ad averti come relattrice per la tesi di laurea e oggi per la tesi di Dottorato. E' stata importante e tante volte determinante l'amicizia che si è instaurata tra noi e che è andata al di là del lavoro. Non voglio essere malinconica, ma ricorderò sempre con tanto piacere il clima allegro che c'è sempre stato all'interno del tuo gruppo di ricerca, un gruppo di cui ho avuto la gioia di far parte. Credo poi che sia doveroso ringraziarti per avere contribuito a cambiare radicalmente la mia vita: senza di te non avrei mai fatto quella determinante esperienza di studio in Belgio.....che per fortuna non è stata solo di "studio".....

Vorrei dire un grosso grazie a tutte gli amici con i quali ho diviso il mitico studio "dottorandi e borsisti" del 3° piano!!! E' stata un'esperienza bellissima non soltanto per il lavoro, ma anche e soprattutto per l'amicizia che si è instaurata tra noi! Grazie mille a tutti voi: Laura, Francesca V e Francesca M, Elena, Andrea C e Andrea B, Milena e Viola! Lo stesso affetto va anche a Sara e Mara!!

Ringrazio poi tutto il "3° piano": Emanuele, Mauro, Elena, Patrizia, Valentina, Fabio, Andrea, Martina, Enrico e Caterina.

Un ringraziamento speciale va anche ai Prof. Robert Snoeck e Graciela Andrei del Rega Institute di Leuven in Belgio: grazie mille per avermi ospitato per più di un anno presso il vostro laboratorio e per avermi seguito nel lavoro che ho svolto.

Un grazie molto grande va anche a tutti gli amici del Rega e in particolare ad Anita, Lies, Ilya, Sophie, Tim.....

In ultimo, ma certamente non per importanza, voglio ringraziare i miei genitori, che in gran parte hanno contribuito a darmi la possibilità e l'appoggio per potere fare il Dottorato e per fare l'esperienza di studio in Belgio.

INDICE

<u>INTRODUZIONE</u>	1
SEZIONE GENERALE	
A. <u>I FARMACI ANTIVIRALI</u>	3
1. Storia della scoperta e dello sviluppo di farmaci antivirali	3
2. Attuale utilizzo clinico degli antivirali in medicina umana	13
2.1 Anti-HIV	13
2.2 Anti-HBV	14
2.3 Anti-HCV	14
2.4 Anti-herpesvirus	15
2.5 Anti-citomegalovirus	15
2.6 Anti-influenza	16
3. Sviluppo di prodrugs nella terapia antivirale	17
4. Nuove strategie antivirali: RNA interference	18
5. Antivirali di origine naturale	19
6. Interferone	22
B. <u>TERAPIA ANTIVIRALE IN MEDICINA VETERINARIA</u>	24
1. Introduzione	24
2. Primi studi in vitro ed in vivo di antivirali nei confronti di virus animali	26
3. Virus animali come modello nello studio di farmaci antivirali	27
C. <u>POXVIRUS</u>	30
1. Classificazione dei poxvirus	30
2. Poxvirus come agenti di zoonosi nell'uomo	31
3. Terapia delle infezioni da poxvirus	34
3.1 Composti con target cellulari	35
3.2 Composti con target virali	36
3.3 Interferone	40

4. Orf virus	41
4.1 Eziologia: aspetti generali	41
4.2 Epidemiologia	44
4.3 Patogenesi	46
4.4 Sintomatologia	48
4.5 Diagnosi	54
4.6 Profilassi	55
4.7 Terapia	57
D. <u>PARAMYXOVIRUS</u>	59
1. Classificazione dei paramyxovirus	59
2. Morbillivirus: patogeni per l'uomo e per gli animali	60
3. Terapia delle infezioni da morbillivirus	62
3.1 Composti di sintesi	63
3.2 Composti naturali	69
4. Virus del comurro	70
4.1 Eziologia: aspetti generali	70
4.2 Epidemiologia	75
4.3 Patogenesi	77
4.4 Sintomatologia	84
4.5 Diagnosi	87
4.6 Profilassi	88
4.7 Terapia	89
5. Virus del cimurro come modello di malattie dell'uomo	90
 SEZIONE SPERIMENTALE	
<u>A. MATERIALI E METODI ORF VIRUS</u>	92
1. Substrati cellulari	92
2. Ceppi di orf virus e preparazione degli stock virali	93
2.1 Titolazione virale	93
3. Composti antivirali	94
4. Test di citotossicità	96

5. Prove antivirali in vitro	97
6. Prova della carica virale	99
6.1 Titolazione virale	100
6.2 Quantificazione DNA virale	100
7. Allestimento di colture organotipiche di cute ovina	101
7.1 Infezione dei raft e aggiunta dei composti antivirali	103
<u>B. MATERIALI E METODI VIRUS DEL CIMURRO</u>	105
1. Substrato cellulare	105
2. Virus	105
3. Titolazione virale	105
4. Composti antivirali	106
5. Test di citotossicità	106
6. Prove antivirali in vitro	107
7. Studi del meccanismo d'azione della RBV e dell'EICAR	108
7.1 Prova della carica virale	108
7.2 Prova del time of addition	109
7.3 Prova antivirale in presenza dei nucleosidi	110
8. Studio del ciclo replicativo del virus del cimurro	111
8.1 Titolazione virale	111
8.2 Quantificazione RNA virale	112
<u>A. RISULTATI ORF VIRUS</u>	114
1. Test di citotossicità e attività antivirale con gli ANPs	114
2. Test di citotossicità e attività antivirale con i precursori lipofili	116
3. Prova della carica virale	120
3.1 Titolazione virale	120
3.2 Quantificazione DNA virale	121
4. Colture organotipiche di cute ovina e prove antivirali ex vivo	123
<u>B. RISULTATI VIRUS DEL CIMURRO</u>	126
1. Citotossicità e attività antivirale della RBV e dell'EICAR	126

2. Studi del meccanismo d'azione della RBV e dell'EICAR	127
2.1 Prova della carica virale	127
2.2 Prova del time of addition	129
2.3 Prova antivirale in presenza dei nucleosidi	130
3. Studio del ciclo replicativo del virus del cimurro	131
<u>A. DISCUSSIONE ORF VIRUS</u>	135
<u>B. DISCUSSIONE VIRUS DEL CIMURRO</u>	139
SEZIONE ICONOGRAFICA	145
BIBLIOGRAFIA	150

INTRODUZIONE

In questi ultimi anni, le recenti epidemie e l'emergenza bioterrorismo hanno riproposto la concreta possibilità di diffusione di nuovi agenti infettivi dagli animali all'uomo e la crescente necessità di modelli di studio rappresentati da agenti infettivi animali utilizzabili per la messa a punto di presidi terapeutici destinati all'uomo.

Lo studio dei virus responsabili di patologie animali risulta necessario per approfondire le conoscenze della malattia, ma può fornire dati importanti anche ad arricchire le conoscenze relative ad alcune patologie dell'uomo causate da virus filogeneticamente correlati. Un interesse sempre maggiore viene rivolto agli animali e alle loro patologie spontanee, come modello di studio di analoghe malattie dell'uomo. La scoperta degli antivirali è relativamente recente ed il loro utilizzo è attualmente limitato alla patologia umana, ma è in costante aumento l'interesse per questo gruppo di farmaci. Negli ultimi decenni si è evidenziata una crescente necessità di mettere a punto farmaci ad azione antivirale in grado di curare malattie ad alta letalità con elevato impatto socio-economico, per le quali non esiste ancora un'efficace profilassi vaccinale. L'insorgenza di nuove patologie virali con elevato impatto sulla salute pubblica e sull'economia mondiale come ad esempio l'influenza aviaria e la SARS, come pure la possibilità di utilizzare agenti virali responsabili di zoonosi come possibili armi bioterroristiche, oltre alla necessità di mettere a punto composti per la terapia di malattie a decorso cronico caratterizzate dall'insorgenza di ceppi resistenti, hanno costituito un ulteriore stimolo alla ricerca di nuove molecole antivirali. L'uso degli antivirali in medicina veterinaria non rappresenta ancora una realtà con l'eccezione di alcuni approcci terapeutici effettuati in caso di cheratite erpetica nel gatto. Da molti anni i virus animali e le malattie da essi provocate costituiscono un modello di studio per patologie umane provocate da virus filogeneticamente correlati ed in particolare per lo studio di farmaci antivirali destinati all'uomo. A questo proposito il virus della diarrea virale bovina (BVDV) e il virus dell'immunodeficienza felina (FIV) sono stati ampiamente utilizzati come modelli rispettivamente per gli studi di efficacia di molecole contro il virus dell'epatite C (HCV), dell'immunodeficienza umana (HIV).

Lo scopo di questo lavoro sperimentale è stato quello di utilizzare due diversi virus animali come modelli per lo studio dell'efficacia di farmaci antivirali. L'idea

progettuale si colloca in un contesto scientifico di grande ed attuale impatto sociale. L'innovatività dell'approccio consiste nell'individuare e studiare possibili sostanze ad azione antivirale nello studio di virus animali filogeneticamente correlati a virus di interesse umano, impiegando, quando possibile, metodologie alternative all'utilizzo di animali (colture organotipiche) per studi di efficacia *ex vivo*. In particolare in questo studio sono stati effettuati saggi di efficacia antivirale nei confronti del virus orf, agente causale dell'ectima contagioso. L'interesse nei confronti di questo virus deriva dal suo possibile utilizzo come modello di studio per l'identificazione di antivirali efficaci verso i poxvirus, ma anche dalla necessità di disporre di una terapia specifica nel caso di forme di ectima contagioso sia negli animali che nell'uomo. Le nostre ricerche si sono inoltre concentrate sul virus del cimurro canino riconosciuto da tempo come modello per lo studio della neuropatogenesi della panencefalite subacuta sclerosante indotta dal virus del morbillo. Il cimurro quindi può rappresentare un modello per lo studio di molecole efficaci nella terapia del morbillo umano e di patologie neurologiche croniche dell'uomo.

A. I FARMACI ANTIVIRALI

1. Storia della scoperta e dello sviluppo dei farmaci antivirali

Il concetto di sviluppo di farmaci ad azione specifica antivirale è piuttosto recente e viene fatto risalire al 1946 quando van Rooyen e Rhodes nell'edizione del "Virus Diseases of Man" considerarono per la prima volta l'urgenza di antivirali nei confronti di diverse infezioni dell'uomo, tra cui il vaiolo. Da quel momento, molti inefficaci tentativi furono fatti utilizzando antibiotici, tra cui sulfamidici, e l'inutilità di questi esperimenti condusse al dogma che i virus non solo non fossero sensibili all'azione degli antibiotici, ma che lo sviluppo di una terapia selettiva fosse irrealizzabile. Era infatti opinione generale che, essendo i virus parassiti obbligati il cui metabolismo è intimamente legato a quello della cellula ospite, qualsiasi farmaco in grado di inibirne la replicazione avrebbe danneggiato irreparabilmente anche le normali funzioni cellulari. A questo bisogna aggiungere le difficoltà legate alla mancanza di conoscenze relative al ciclo replicativo virale, il che rendeva arduo qualsiasi tentativo volto all'individuazione di bersagli metabolici virus-specifici contro cui dirigere l'attacco chemioterapico. Solo alla fine degli anni '50, venne prima descritto l'interferone (Isaacs and Lindenmann, 1957) e successivamente venne scoperta la Idossuridina (IDU) (Prusoff, 1959). L'IDU ed altri analoghi nucleosidici come la Trifluorotimidina (TFT) (Kaufman, 1964) furono dapprima descritti come farmaci ad azione anti-neoplastica, per la loro interferenza con la sintesi del DNA, e successivamente ne venne osservata la capacità di inibire la crescita di alcuni virus a DNA, come gli herpesvirus. L'utilizzo a scopo terapeutico antivirale dell'IDU e del TFT venne approvato, a causa della loro azione citostatica, solo per un uso topico nel trattamento delle cheratiti erpetiche dell'uomo. Attualmente sia l'IDU che il TFT sono ancora in commercio sotto forma di collirio o di pomata oftalmica. La Vidarabina (ara-A) fu scoperta nel 1964 e successivamente fu approvata nel 1976 come primo antivirale per un utilizzo non solo topico ma anche sistemico, grazie alla ridotta tossicità rispetto ai precedenti analoghi nucleosidici. In particolare il suo utilizzo per via endovenosa è ancora oggi indicato nell'infezione da HSV e da VZV anche in soggetti immunocompromessi.

Negli stessi anni a livello mondiale si stavano combattendo grazie alla vaccinazione, due grandi sfide nei confronti di gravi infezioni virali dell'uomo: la poliomielite e il vaiolo. Nei confronti di entrambe le malattie, furono sviluppati negli anni '60 chemioterapici con specifica attività antivirale, ma la vaccinazione rimase il principale strumento di profilassi.

A partire dagli anni '60, l'interesse nei confronti dei farmaci antivirali venne rivolto anche verso il virus dell'influenza, e nel 1964 fu scoperta l'Amantadina, che nonostante avesse dimostrato una spiccata attività anti-influenza A, venne inizialmente usata come farmaco anti-parkinsoniano. Successivamente venne sintetizzata una molecola analoga chiamata Rimantadina caratterizzata da una minore tossicità, ma dello stesso spettro d'azione. In seguito ad un loro utilizzo clinico nella profilassi e nella terapia dell'influenza, si assistette alla comparsa di ceppi virali resistenti che indussero ad un sempre loro minore utilizzo.

Le ricerche condotte nello studio del meccanismo d'azione di queste due molecole, promossero scoperte scientifiche legate alla replicazione del virus dell'influenza ed anche lo sviluppo negli anni '90 di una seconda generazione di farmaci anti-influenza, quella degli inibitori delle neuroaminidasi virali. In particolare fu sviluppato prima lo Zanamivir e successivamente un analogo con un'elevata biodisponibilità orale, l'Oseltamivir. Queste ultime due molecole rappresentano attualmente i farmaci anti-influenza da utilizzare sia nella profilassi che nella terapia. L'Oseltamivir è inoltre il primo esempio di prodrug: infatti dopo essere stato somministrato per via orale, esso viene modificato a livello epatico ad opera di esterasi cellulari e viene liberato il suo derivato farmacologicamente attivo.

Nel 1972 venne scoperta la Ribavirina (RBV), un analogo pirimidinico che dimostrò di possedere un ampio spettro d'azione, sia nei confronti dei DNA che degli RNA virus. Il suo utilizzo è approvato per aerosol nel trattamento delle polmoniti causate dal virus respiratorio sinciziale

Nel 1977 fu scoperto l'Aciclovir (ACV) che ha rappresentato il prototipo degli antivirali nucleosidici di seconda generazione, caratterizzati da una minore tossicità ed una maggiore selettività. L'ACV, noto per la sua attività anti-herpesvirus, a differenza degli altri suoi predecessori nucleosidici, è una molecola specifica, selettiva e sicura grazie alla capacità di riconoscere come target solo la DNA polimerasi virale. Negli anni

successivi, vennero sintetizzati numerosi analoghi nucleosidici di seconda generazione, tra cui la Bromovinildeossiridina (BVDV), il Ganciclovir (GCV) e il Penciclovir (PCV). Come l'ACV anche queste molecole erano caratterizzate da uno spettro d'azione rivolto soprattutto agli herpesvirus, da una elevata selettività, e da una scarsa biodisponibilità orale. Quest'ultimo aspetto rappresentò lo stimolo per lo sviluppo e la sintesi di prodrugs da potere essere somministrati anche per via orale ed aventi però lo stesso spettro d'azione e le stesse caratteristiche di maneggevolezza dei composti di origine. Vennero così prodotti, dalla fine degli anni '80, il Fanciclovir (FCV) prodrug del PCV, poi il Valaciclovir (VACV) prodrug dell'ACV e infine il Vanganciclovir (VGCV) prodrug del GCV. Ciascun prodrug viene convertito da esterasi cellulari nel corrispondente composto progenitore.

Agli inizi degli anni '80, il virus dell'immunodeficienza umana (HIV) e la sindrome dell'immunodeficienza acquisita (AIDS) iniziano a rappresentare un problema sanitario e socio-economico di importanza mondiale. La prima molecola ad essere utilizzata nella terapia dell'HIV fu la Zidovudina (AZT) che legandosi alla trascrittasi inversa virale agisce come terminatore di catena. In seguito analoghi dell'AZT vennero sviluppati e vennero raggruppati con il termine di inibitori nucleosidici della reverse trascrittasi (NRTIs). Negli anni '90 venne individuato un ulteriore sito target nella reverse trascrittasi virale e vennero così sviluppati una serie di composti chiamati inibitori non nucleosidici della reverse trascrittasi (NNRTIs), tra i quali ricordiamo la Nevirapina. Un'ulteriore classe di composti antivirali con spettro d'azione specifico anti-HIV è rappresentata dagli inibitori delle proteasi (PIs), tra cui la prima molecola ad essere immessa in commercio fu il Saquinavir. Nel 2003 è stata infine approvata la prima molecola che agisce bloccando l'ingresso virale nella cellula, l'Enfuvirtide. La continua ricerca di farmaci anti-HIV con meccanismo d'azione diversi è soprattutto motivata dalla comparsa di ceppi virali resistenti e dalla necessità di praticare terapie basate sull'associazione di più farmaci per ritardare il fenomeno della resistenza.

Nel 1986 fu sintetizzato l'HPMPA (De Clercq et al., 1986) che rappresentò il progenitore di una importante nuova classe di antivirali quella degli analoghi nucleotidici o nucleosidi aciclici fosfonati (ANPs) che al momento vede tre composti in commercio: il Cidofovir (approvato nella cura della retinite da citomegalovirus nei pazienti affetti da HIV, ma potenzialmente efficace verso molti altri virus a DNA),

l'Adefovir (nella cura dell'epatite B cronica, sotto forma del suo prodrugs Adefovir dipivoxil) e il Tenofovir (per il trattamento dell'HIV, sotto forma del suo prodrugs Tenofovir disoproxil fumarate).

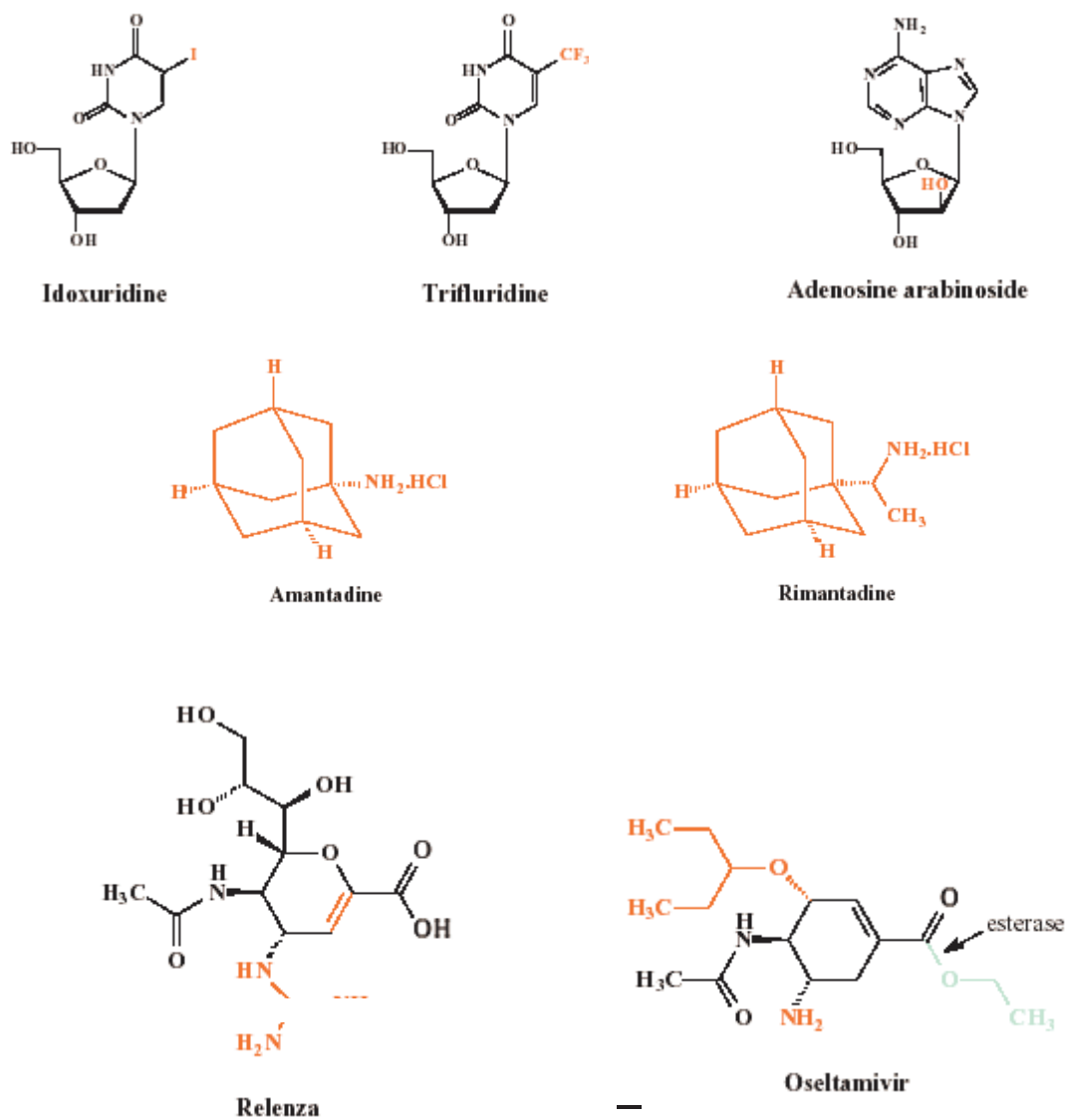
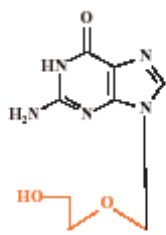
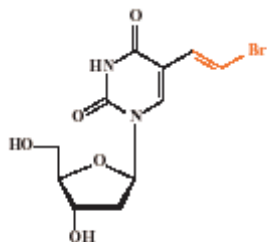


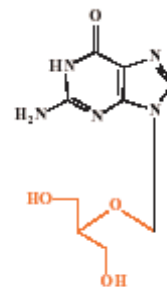
Figura 1: Rappresentazione di alcune molecole antivirali



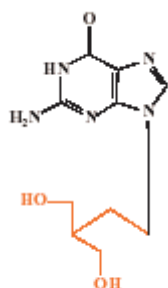
Aciclovir



Brivudin

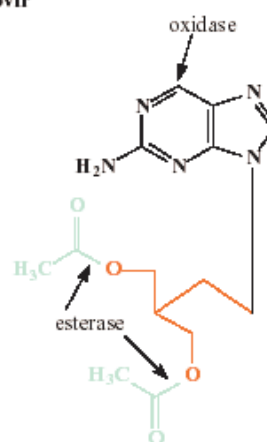


Ganciclovir

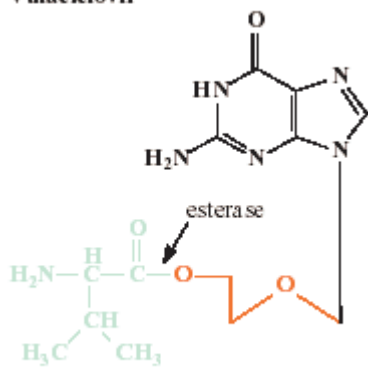


Penciclovir

Famciclovir



Valaciclovir



Valganciclovir

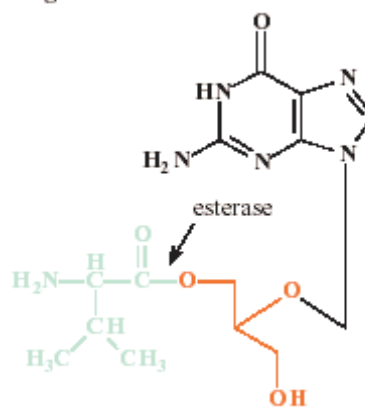
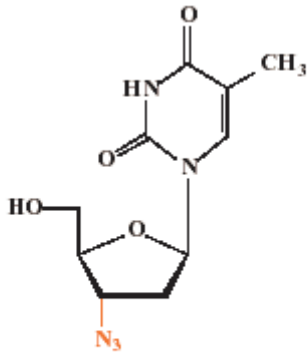
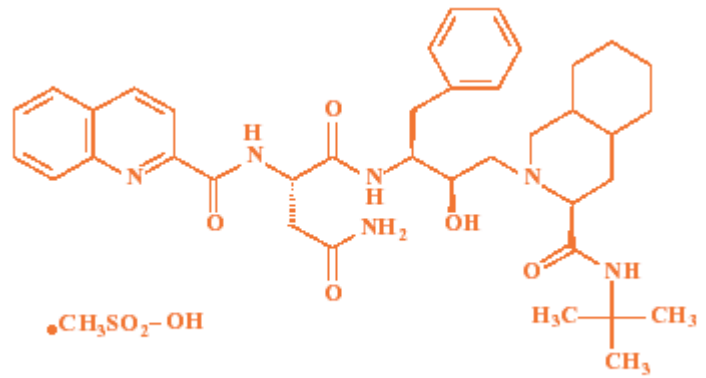


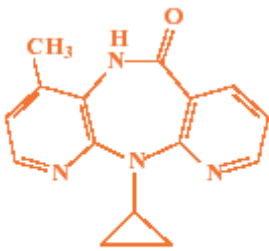
Figura 2: Rappresentazione di alcune molecole antivirali



3'-Azido-2',3'-dideoxythymidine, AZT
Zidovudine



Saquinavir

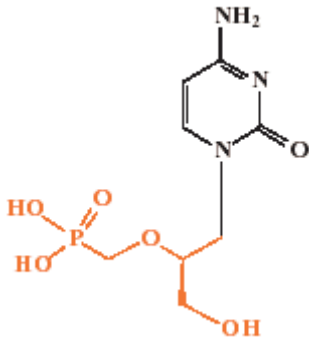


Nevirapine



T-20, Enfuvirtide

HPMPC
Cidofovir



PMEA
Adefovir

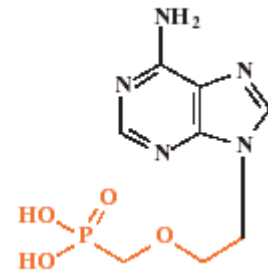
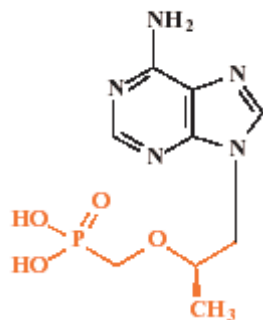
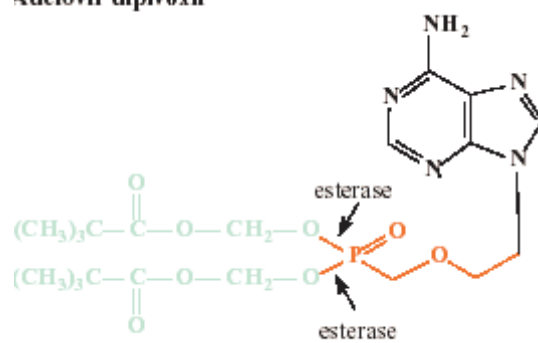


Figura 3: Rappresentazione di alcune molecole antivirali

PMPA
Tenofovir



Adefovir dipivoxil



Tenofovir disoproxil

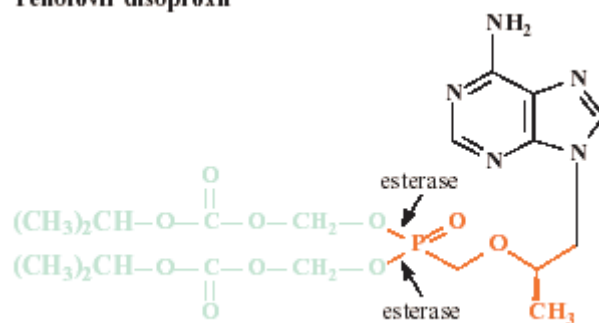


Figura 4: Rappresentazione di alcune molecole antivirali

TABELLA.1: Tabella riepilogativa dei farmaci antivirali attualmente in commercio ed autorizzati per un utilizzo clinico in medicina umana

CLASSE DI FARMACI	ANTIVIRALE	ORAL PRODRUG	NOME COMMERCIALE	MECCANISMO D'AZIONE	SPETTRO D'AZIONE
ANALOGHI DEI NUCLEOSIDI	Idossuridina (IDU)		Herpid [®] , Stoxil [®] , Idoxene [®] , Virudox [®]	Intercalante catena DNA	HSV-1 e 2; VZV
	Trifluorotimidina (TFT)		Viropitic [®]	Intercalante catena DNA	HSV-1 e 2; VZV
	Vidarabina (ara-A)		ICA-A [®] , Vira-A [®]	Inibitore DNA polimerasi	HSV-1 e 2; VZV
	Ribavirina, RBV		Virazole [®] , Virazid [®] , Viramid [®]	Meccanismo pleiotropico	Ampio spettro DNA e RNA virus
	Aciclovir, ACV	Valaciclovir (VACV)	Zovirax [®] (ACV)e Zelitrex [®] (VACV)	Terminatore della catena DNA	HSV-1 e 2; VZV
	Bromovinildeossiridina, BVDU		Zostex [®] , Zonavar [®]	Inibitore competitivo nucleotidi pirimidinici	HSV-1; VZV; BVDV
	Ganciclovir, GCV	Valganciclovir (VGCV)	Cytovene [®] , Cymeven [®] (GCV) e Valcyte [®] (VGCV)	Terminatore della catena DNA	HSV-1 e 2; CMV
	Penciclovir, PCV	Famciclovir (FCV)	Denavir [®] (PCV) e Famvir [®] (FCV)	Terminatore della catena DNA	HSV-1 e 2; VZV
	Zidovudina, AZT		Retrovir [®]	Inibitore nucleosidico della reverse trascrittasi	HIV-1 e 2
	Lamivudina, 3TC		Epivir [®] , Zeffix [®]	Inibitore nucleosidico della reverse trascrittasi	HIV-1 e 2; HBV
	Didanosina		Videx [®]	Inibitore nucleosidico della reverse trascrittasi	HIV-1 e 2
ANALOGHI DEI NUCLEOTIDI	Cidofovir, CDV, HPMPC		Vistide [®]	Terminatore di catena	Herpes, papilloma, polyoma, adeno, poxvirus
	Adefovir, PMEA	Adefovir dipivoxil	Hepsera [®] (Adefovir dipivoxil)	Terminatore della catena DNA	HIV; HBV; altri retrovirus; herpesvirus (HSV, CMV)

	Tenofovir, PMPA	Tenofovir disoproxil fumarate, TDF	Viread® (Tenofovir disoproxil fumarate)	Inibitore nucleotidico della reverse trascrittasi	HIV-1 e 2; altri retrovirus; HBV
INIBITORI NON NUCLEOSIDICI DELLA TRASCRITTASI INVERSA	Nevirapina		Viramune®	Inibitore della reverse trascrittasi	HIV-1
	Delavirdina		Rescriptor®	Inibitore della reverse trascrittasi	HIV-1
	Efavirenz		Sustiva® , Stocrin®	Inibitore della reverse trascrittasi	HIV-1
INIBITORI DELLE PROTEASI	Saquinavir		Invirase®	Inibitore delle proteasi	HIV-1 e 2
	Neflavinir		Viracept®	Inibitore delle proteasi	HIV-1 e 2
	Ritonavir		Norvir®	Inibitore delle proteasi	HIV-1 e 2
	Indinavir		Crixivan®	Inibitore delle proteasi	HIV-1 e 2
ALTRE CLASSI DI FARMACI	Enfuvirtide		Fuzeon®	Inibitore dell'ingresso virale	HIV-1
	Foscarnet, PFA		Foscavir®	Inibitore DNA polimerasi	HSV-1 e 2; VZV; CMV; HIV
	Fomivirsen		Vitravene®	Blocco dell'espressione proteica	CMV
	Amantadina		Symmetrel®, Amantan® , Mantadix®	Inibizione dell'uncoating virale	Influenza A
	Rimantadina		Flumadine®	Inibizione dell'uncoating virale	Influenza A
	Zanamivir		Relenza®	Inibitore neuroaminidasi virale	Influenza A e B
	Oseltamivir		Tamiflu®	Inibitore neuroaminidasi virale	Influenza A e B

2. Attuale utilizzo clinico degli antivirali in medicina umana

Prima di valutare le potenzialità cliniche di un antivirale, così come di tutti i farmaci in genere, occorre considerarne delle caratteristiche come la struttura chimica, lo spettro d'azione, il meccanismo d'azione, la via di somministrazione, il dosaggio, ma anche la durata del trattamento, la farmacocinetica, l'interazione con altri farmaci, eventuali effetti tossici e lo sviluppo di resistenza. Questi aspetti sono valutati in parte in vitro, grazie a metodiche di laboratorio che definiscono ad esempio la conformazione del composto, e quindi il tipo di legami chimici che lo caratterizzano e che ne influenzano poi l'attività biologica; altri aspetti invece sono il frutto di sperimentazioni in vivo che chiariscono per esempio il dosaggio e la durata del trattamento, così come la comparsa di effetti tossici localizzati nel punto di somministrazione o piuttosto sistemici (De Clercq, 2004).

Al momento ci sono circa 40 farmaci disponibili in commercio aventi azione antivirale e approvati nei confronti di importanti malattie dell'uomo. Alcuni importanti esempi sono riportati in Tabella 1.

2.1. Anti-HIV

La maggior parte degli antivirali sono stati approvati nei confronti del virus dell'HIV. I composti anti-HIV possono essere suddivisi in quattro gruppi: a) gli inibitori nucleosidici della reverse trascrittasi (NRTIs) aventi come capostipite la Zidovudina, b) gli inibitori nucleotidici della reverse trascrittasi (NtRTIs) come il Tenofovir, c) gli inibitori non nucleosidici della reverse trascrittasi (NNRTIs) come la Nevirapina, d) gli inibitori delle proteasi (PIs) come il Saquinavir. Di recente acquisizione anche una quinta categoria, quella degli inibitori dell'ingresso virale, che però al momento possiede un unico membro, l'Enfuvirtide. Mentre inizialmente è stato applicato un protocollo mono-farmacologico che però è stato caratterizzato dalla rapida emergenza di fenomeni di resistenza, già da alcuni anni si utilizza un approccio pluri-farmacologico con la combinazione di due o più antivirali appartenenti a classi diverse, questo protocollo prende il nome di "highly active antiretroviral treatment" (HAART). HAART ha ridotto drasticamente la mortalità, ma la replicazione virale non viene completamente soppressa. Di conseguenza i fenomeni di resistenza sono ancora possibili e causati per lo più dall'elevato grado di mutazioni genomiche associate alla

replicazione del virus dell'HIV, e anche dall'incostanza del trattamento dovuta all'insorgenza di fenomeni di tossicità (lipodistrofia, diabete mellito, problemi cardiovascolari). Poichè l'insorgenza della resistenza agli antivirali si continua ad osservare, occorre sviluppare nuove molecole aventi diversi meccanismi d'azione. Al momento ci sono diverse nuove classi di anti-retrovirali in fase di studio preclinico e clinico e tra questi vi sono gli inibitori dell'ingresso virale e gli inibitori dell'integrasi virale (Meadows and Gervay-Hague, 2006).

2.2 Anti-HBV

Nel corso dell'epatite cronica indotta dall'infezione con HBV, il trattamento con l'interferone α pegilato (PEG α interferon) rappresenta la terapia antivirale più efficace sia in pazienti sierologicamente negativi che positivi. In entrambi i casi, la somministrazione dell'interferone α pegilato può essere effettuata una volta alla settimana con sostanziale riduzione degli effetti collaterali in corso di terapia sistemica con l'interferone standard. La pegilazione, cioè il legame ad una molecola di polietilene glicole (PEG), rallenta l'eliminazione della molecola e ne aumenta l'emivita. Il trattamento con PEG α interferon sembra avere anche maggiore successo rispetto alla monoterapia con Lamivudina, con la quale si è osservata la comparsa di resistenza. In caso di resistenza alla Lamivudina, il protocollo terapeutico prevede il cambio di terapia a favore dell'Adefovir dipivoxil.

2.3 Anti-HCV

Come nel corso dell'epatite cronica da HBV, anche in quella causata dall'HCV è l'interferone α pegilato (PEG α interferon) a rappresentare un'innovazione rispetto all'utilizzo dell'interferone standard. Nei pazienti affetti da infezione cronica da HCV, la terapia ottimale prevede la somministrazione di PEG α interferon una volta alla settimana, in associazione alla Ribavirina giornalmente. A seconda del genotipo coinvolto nell'infezione, dopo sei mesi di terapia antivirale tra il 40 e l'80% dei pazienti sottoposti a questo regime terapeutico ottiene una risposta positiva (RNA virale non rilevabile). Per migliorare l'efficacia della terapia antivirale in corso di epatite cronica, nuove strategie antivirali sono in fase di sperimentazione e tra questi vi sono derivati nucleosidici, ma anche gli RNA interference.

2.4 Anti-herpesvirus

Gli herpesvirus (herpes simplex tipo 1 e 2, HSV-1 e HSV-2) e il virus della varicella zoster (VZV) hanno una diffusione molto elevata, con una prevalenza sierologia nella popolazione di circa il 90%. Il problema maggiore nel trattamento di queste infezioni è legato al fenomeno della riattivazione, un rischio che aumenta con il diminuire dello stato di immunocompetenza del paziente. Mentre HSV-1 è prevalentemente il responsabile dell'herpes labiale, HSV-2 è la causa dell'herpes genitale. In entrambe queste infezioni, Aciclovir, Penciclovir e i loro corrispondenti prodrugs, BVDV e Foscarnet sono gli antivirali correntemente utilizzati. Mentre l'herpes labiale non viene generalmente trattato con antivirali nel corso dell'infezione primaria se non nei pazienti immunocompromessi, nel corso delle forme ricorrenti si utilizzano applicazioni topiche o terapie antivirali di lunga durata a seconda della frequenza e della gravità delle lesioni. L'infezione primaria dell'herpes genitale viene trattata con antivirali ad uso topico o sistemico a seconda della gravità dei sintomi. Nelle forme ricorrenti di herpes genitale si utilizza una terapia intermittente a breve termine o a lungo termine a seconda della frequenza con cui si manifestano i sintomi. Nel trattamento delle infezioni oculari da herpesvirus, la terapia topica si avvale della Vidarabina, dell'Idossuridina, della Trifluorotimidina, oltre che dell'Aciclovir in crema. Mentre però con la sola terapia antivirale è possibile arrestare lo sviluppo e ridurre la durata delle ulcere corneali, per arrestare l'infiammazione dello stroma e della congiuntiva è necessario associare l'uso di antiinfiammatori come i corticosteroidi. L'Aciclovir per via sistemica riduce drasticamente la mortalità in corso di encefalite acuta causata dall'HSV.

L'Aciclovir è anche il farmaco più indicato per ridurre il rischio di complicazioni (polmonite, ed encefalite) in corso di varicella, soprattutto negli adulti o nei soggetti immunodepressi. In corso di herpes zoster, in seguito alla riattivazione del VZV, oltre all'Aciclovir sono indicati nella terapia del dolore che accompagna e segue il rash cutaneo, il BVDV, il Famciclovir e il Valaciclovir (Wutzler, 1997; Nikkels e Pierard, 2002).

2.5 Anti-citomegalovirus

La sieroprevalenza del citomegalovirus (CMV) nella popolazione è stimata tra il 30 e il 70%, con scarse manifestazioni cliniche associate all'infezione primaria in soggetti

immunocompetenti, mentre in caso di riattivazione in soggetti immunocompromessi, il CMV è responsabile di gravi complicanze cliniche. Un'altra grave condizione è quella che si realizza nel corso dell'infezione congenita, quindi verticale tra la madre e il feto; in questo caso circa il 5-10% dei neonati soffrono di disturbi neurologici. Attualmente però non esistono antivirali approvati nell'utilizzo in corso di infezione congenita a causa degli elevati rischi di tossicità per il feto durante un trattamento a lungo termine.

La terapia anti-CMV si avvale dei seguenti composti: Ganciclovir e il suo prodrug Valganciclovir, Aciclovir, Foscarnet e Cidofovir (approvato però solo nella terapia della retinite da CMV in pazienti HIV positivi). Il GCV rappresenta l'antivirale di prima scelta, seguito dal VGCV che gode di una maggiore biodisponibilità orale. In caso di resistenza nei confronti del GCV si ricorre alla terapia con il Foscarnet. Di recente acquisizione è il Fomiversen che, a differenza dei precedenti composti, non ha come target la DNA polimerasi virale, bensì l'mRNA virale andando a bloccare l'espressione proteica. Il Fomiversen è approvato nella terapia topica della retinite da CMV. (Vogel et al., 1997; Biron, 2006).

2.6 Anti-influenza

Come già anticipato, nei confronti dell'influenza sono disponibili due classi di antivirali: quella degli inibitori dell'uncoating virale, e quella degli inibitori delle neuroaminidasi. Alla prima classe appartengono l'Amantadina e la Rimantadina, il cui utilizzo però è stato fortemente ridotto a causa della comparsa di fenomeni di resistenza nel corso del loro utilizzo clinico. Gli inibitori delle neuroaminidasi (NIs) hanno mostrato una notevole efficacia sia nella profilassi che nella terapia dell'influenza. In particolare, lo Zanamivir sembrerebbe più indicato nella terapia dell'influenza soprattutto se somministrato localmente con uno spray nasale nelle prime fasi dell'infezione, quando la febbre rappresenta il segno clinico discriminante. L'Oseltamivir per via orale invece è particolarmente indicato per la prevenzione. Per entrambi gli NIs, non stati ancora segnalati fenomeni di resistenza, un fatto che ne incoraggia il loro utilizzo come agenti antivirali nel corso delle epidemie stagionali di influenza. Inoltre una maggiore attenzione sulla disponibilità di antivirali efficaci nei confronti dell'influenza è stata stimolata dai timori di una possibile pandemia causata dall'influenza aviaria in seguito alla trasmissione del virus dagli animali all'uomo e da

uomo a uomo. Anche in questa eventualità, l'utilizzo degli NIs sarebbe indicato per contenere la diffusione dell'infezione, ma anche a scopo terapeutico (Hayden, 2006).

3. Sviluppo dei prodrugs nella terapia antivirale

I prodrugs rappresentano un esempio di sviluppo di nuove molecole con caratteristiche di specificità e di selettività maggiori rispetto ai composti progenitori. I prodrugs sono definiti come antivirali che necessitano di una conversione metabolica *in vivo* prima di entrare nelle cellule infette ed esplicare, anche previa un'ulteriore modificazione metabolica, la propria attività antivirale (De Clercq e Field, 2006).

Lo sviluppo dei prodrugs è per esempio motivata dal tentativo di migliorare la biodisponibilità orale del composto progenitore, rendendone più semplice la somministrazione e quindi il protocollo terapeutico. Ne sono un esempio il Famciclovir, il Valaciclovir e il Valganciclovir che possono essere somministrati per via orale, raggiungono rapidamente elevate concentrazioni nel sangue e godono di un'emivita più elevata, garantendo livelli ematici farmacologicamente attivi per più tempo. Per esempio mentre l'Aciclovir ha una biodisponibilità orale del 15-20%, con il Valaciclovir è superiore al 70%.

Alcuni prodrugs hanno permesso di ridurre la tossicità osservata *in vivo* con il composto progenitore, come nel caso dell'Adefovir dipivoxil (prodrug dell'Adefovir) che è commercializzato a differenza del composto da cui deriva.

La somministrazione orale, rispetto ad una somministrazione topica o parenterale, offre la possibilità di trattare più facilmente una popolazione ampia e a rischio d'infezione. Questa strategia è soprattutto importante per malattie infettive che hanno un'elevata contagiosità e letalità, ed è per questo che l'Oseltamivir gode di maggiore successo rispetto allo Zanamivir nell'ipotesi di una pandemia di influenza. Lo stesso principio è alla base dello sviluppo di prodrugs del Cidofovir e di altri nucleosidi aciclici fosfonati (ANPs) attivi nei confronti dei poxvirus, nell'eventualità di un attacco bioterroristico con l'utilizzo di armi biologiche come il vaccinia virus o il monkeypoxvirus. I derivati alcoxialchilici del Cidofovir godono inoltre di una minore nefrotossicità (Ciesla et al., 2003).

4. Nuove strategie antivirali: RNA interference

L'RNA silencing o RNA interference (RNAi) è un meccanismo che comporta la mancata espressione di una o più proteine target e viene indotto dalla presenza nella cellula di RNA a doppio filamento (dsRNA). Questo processo è noto da tempo come meccanismo antivirale innato nelle cellule di piante e di insetti. L'RNAi è un processo indotto dalla presenza di dsRNA (che può essere di origine virale oppure endogeno cioè cellulare), che viene clivato ad opera di un enzima cellulare chiamato Dicer in frammenti più piccoli di circa 21 nucleotidi, gli small interfering RNA (siRNA). Questi ultimi vengono incorporati all'interno di un complesso multiproteico chiamato RISC, dove avviene la separazione delle due eliche di RNA che possono così appaiarsi a sequenze di mRNA complementare. All'interno dello stesso RISC, avviene anche il taglio dell'mRNA a cui il siRNA si era appaiato, con conseguente inibizione della sintesi proteica di quella proteina target (Figura 1) (van Rij e Andino, 2006).

L'RNAi rappresenta una nuova strategia antivirale in quanto solo a partire dal nuovo millennio si è cominciato a ipotizzare una sua applicazione nella terapia antivirale. In particolare si tratta di introdurre nella cellula infetta degli siRNA che possano avere come target geni essenziali ai fini della replicazione virale. Un ostacolo all'utilizzo dell'RNAi è rappresentato dall'instabilità genetica nel corso della replicazione virale, una caratteristica per esempio dell'HIV o del poliovirus, che rende difficile la scelta del siRNA e quindi del target genico. Questo problema potrebbe essere superato andando a individuare come target: a) geni della cellula ospite, aumentando però la tossicità cellulare dell'antivirale, b) geni responsabili di meccanismi immunopatologici che si scatenano in seguito all'infezione e che sono alla base del danno cronico al tessuto infetto (per esempio in caso di infezione da HBV, HCV), c) sequenze geniche altamente conservate, d) più sequenze geniche contemporaneamente, per ottenere un effetto sinergico. Attualmente sono già stati effettuati molteplici esperimenti *in vitro* nei confronti di virus ad RNA (orthomyxo-, paramyxo-, corona-, flavivirus) e a DNA (herpes- e papillomavirus) con risultati incoraggianti. Molti esperimenti *in vivo*, con l'utilizzo di modelli animali, hanno invece sollevato il problema della somministrazione degli siRNA. Essi possono essere somministrati tal quali come acidi nucleici nudi oppure complessati con carrier lipidici. Un'alternativa è l'utilizzo di vettori plasmidici, che però è soggetta a limitazioni legate all'utilizzo nella clinica della terapia genica.

Nonostante gli ostacoli ancora presenti per un utilizzo dell'RNAi nella terapia, questa tecnologia rappresenta un'innovazione ed una speranza nella messa a punto di una nuova classe di antivirali.

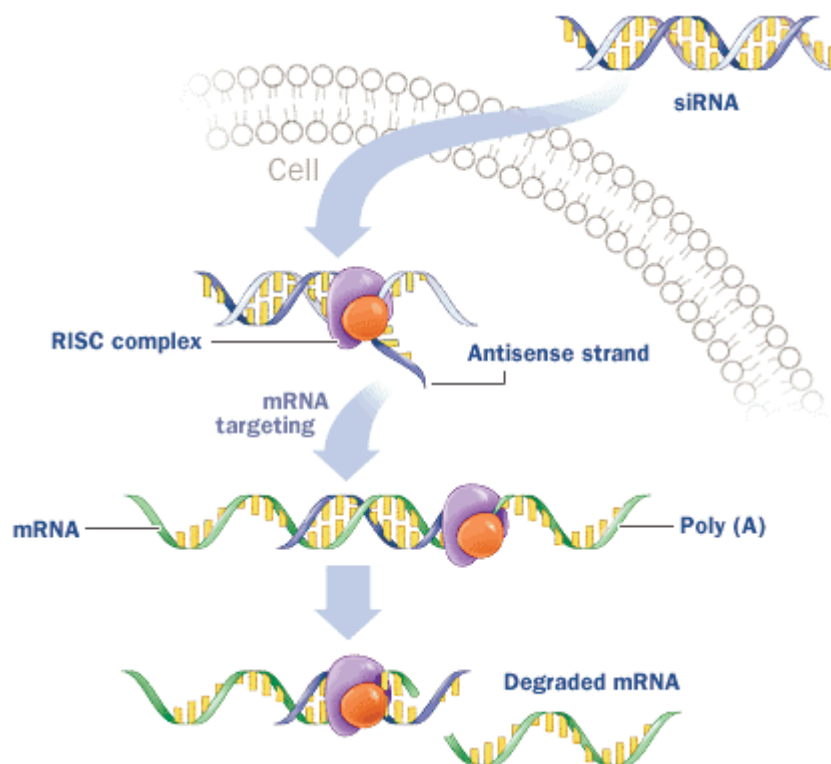


Figura 5: Rappresentazione schematica del meccanismo alla base dell'RNA interference.

5. Antivirali di origine naturale

L'utilizzo delle piante e di erbe a scopo medicinale risale all'epoca preistorica e nonostante ne siano note centinaia con proprietà farmacologiche, molte altre migliaia sono ancora da esplorare (Cowan, 1999). Diverse molecole sono state isolate dalle piante, ma la maggior parte della farmacopea dei composti di origine vegetale con proprietà medicinale ed anche antivirale deve essere ancora esplorata (Jassim e Naji, 2003). Le piante sono da sempre state utilizzate dall'industria farmaceutica per l'isolamento di composti attivi, e circa il 40% dei farmaci moderni contengono principi attivi di origine naturale, sia utilizzando la sostanza naturale estratta dalle piante, che una sua versione sintetica (Jassim e Naji, 2003). Correntemente c'è un crescente interesse nell'utilizzo dei prodotti naturali rispetto a quelli di sintesi nella prevenzione e cura dei problemi di salute. Dati che si riferiscono agli Stati Uniti in merito al consumo

di farmaci di origine vegetale, sottolineano un incremento di vendite del 37% tra il 1995 e il 1996.

Le piante hanno una capacità pressoché illimitata di sintetizzare composti aromatici, la maggior parte dei quali sono metaboliti secondari: quelli che sono stati attualmente caratterizzati non superano il 10% del totale. In molti casi, queste sostanze sono utilizzate dalla pianta per difendersi dagli insetti, dai microrganismi o dagli erbivori, grazie per esempio ad un caratteristico odore o colore (Cowan, 1999). I composti che hanno proprietà antimicrobiche e nello specifico antivirali, rientrano in questa categoria di sostanze e possono essere suddivisi in diversi gruppi a seconda delle loro caratteristiche biochimiche.

1. Un gruppo molto ampio di molecole è costituito dai fenoli e polifenoli ed include gli acidi fenolici, i chinoni, i flavoni e i flavonoidi, i tannini e i cumarinici. Le catechine sono un esempio di flavonoidi aventi proprietà antivirale dimostrata nei confronti del virus respiratorio sinciziale (RSV), dell'herpes simplex tipo 1 (HSV-1), del poliovirus tipo 1, del virus della parainfluenza. La galangina è un flavone avente efficacia antivirale verso il virus HSV-1 e il coxsackievirus B tipo 1. I polifenoli hanno dimostrato un'attività antivirale con ampio spettro d'azione e i meccanismi alla base della loro efficacia potrebbero essere ricercati nell'inibizione del legame del virus con la cellula ospite o piuttosto nell'inibizione di enzimi della replicazione virale. Quest'ultimo meccanismo sembrerebbe però dovuto ad un'interazione aspecifica dei polifenoli con gli enzimi della replicazione.

2. Un altro gruppo di molecole è quello dei terpenoidi e degli olii essenziali, nell'ambito del quale diversi terpeni hanno per esempio dimostrato attività anti-HIV e anti-herpesvirus.

3. Anche nel gruppo degli alcaloidi sono state descritte sostanze attive verso il virus dell'HIV.

4. Le lectine e i polipeptidi sono un altro interessante gruppo di molecole presente nelle piante e per le quali è già stata dimostrata attività antivirale verso il virus dell'HIV e il citomegalovirus. La meliacina è un peptide che ha dimostrato notevoli proprietà antivirali sia in vivo nei confronti del virus HSV-1, sia in vitro verso il virus dell'afta. Il suo meccanismo d'azione sembrerebbe quello di inibire il virus nella fase d'ingresso e di uscita dalla cellula ospite.

Il propoli è un composto molto complesso perché costituito da un insieme di sostanze tra cui terpenoidi, flavonoidi, fenoli. Sono state elencate diverse proprietà biologiche del propoli, e tra quelle antivirali sono note la sua efficacia verso il virus dell'influenza, il virus HSV-1, il virus della stomatite vescicolare e il poliovirus.

L'utilizzo nella clinica di prodotti di origine vegetale deriva molto spesso da tradizioni ed usanze popolari. Per esempio sono molto utilizzati in India degli estratti di specie diverse di *Phyllanthus* per trattare disturbi epatici, intestinali e urinari. Negli ultimi anni è stata chiarita l'attività di molte specie di questa pianta e tra queste anche dell'estratto acquoso di *Phyllanthus niruri*: la sua proprietà antivirale è stata osservata in prove *in vitro* nei confronti del virus dell'epatite B dell'uomo (HBV) e *in vivo* su marmotte affette dal virus dell'epatite della marmotta (WHV) che rappresenta un modello da tempo utilizzato nello studio del virus dell'epatite B dell'uomo (Jassim e Naji, 2003).

Nei confronti dell'epatite C (HCV) l'estratto acquoso del *Viscum album*, contenuto in un farmaco in commercio in Germania, ha dimostrato di ridurre la carica virale e di normalizzare la funzione epatica in pazienti affetti da epatite cronica.

Un altro farmaco in commercio in Germania sotto forma di crema e contenente estratti di foglie di *Melissa officinalis* ha mostrato di essere efficace e ben tollerato nel trattamento topico dell'herpes labiale recidivante.

L'utilizzo delle piante a scopo medicinale prevede spesso la combinazione di più specie e generi diversi in quanto da un lato questo approccio ridurrebbe gli effetti tossici di alcune piante, dall'altro migliorerebbe gli effetti terapeutici in base a fenomeni di sinergismo tra principi attivi diversi (Jassim e Naji, 2003). Le stesse motivazioni giustificano anche la combinazione di piante officinali con i farmaci ortodossi, anche se in questo caso non sempre si ottiene un incremento dell'attività antivirale rispetto all'utilizzo dei due composti separatamente (Jassim e Naji, 2003).

Recentemente un sempre crescente interesse è stato rivolto alla ricerca di antivirali di origine naturale che vengono considerati una possibile alternativa ai farmaci convenzionali, soprattutto in considerazione dell'insorgere del fenomeno della resistenza.

6. Interferone

L'interferone (INF) è una citochina prodotta dall'organismo in risposta a diversi stimoli, tra cui anche ad un'infezione virale. Sono stati descritti al momento tre tipi di interferone, suddivisi a seconda del recettore cellulare al quale si legano: INF di tipo I, di tipo II e di tipo III. L'INF di tipo I è quello coinvolto nella risposta antivirale e antitumorale e comprende diverse molecole, tra cui le più importanti sono l'INF α e INF β . L'escrezione da parte della cellula infetta di INF avviene in risposta ad un aumento intracellulare del dsRNA, che avviene a sua volta come conseguenza della replicazione virale. L'INF interagisce con il recettore specifico e tramite più vie metaboliche avviene l'attivazione a cascata di enzimi cellulari e l'induzione da un lato della degradazione dell'mRNA (sia virale che cellulare) e dall'altro l'inibizione della sintesi proteica (sia virale che cellulare) (Figura 2).

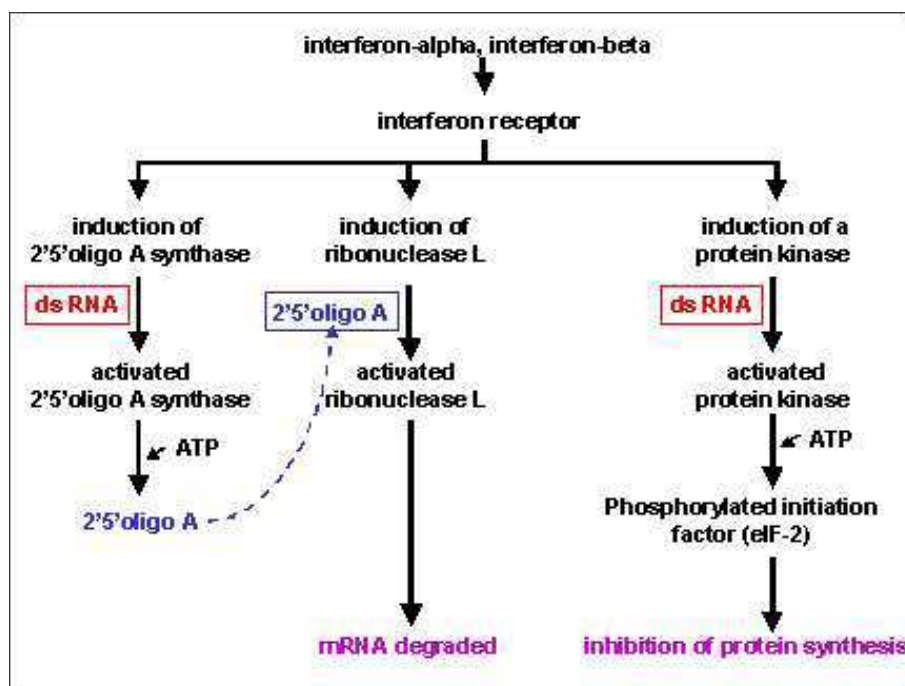


Figura 6: Attivazione dei meccanismi antivirali indotti dall'INF α e β .

L'interferone quindi è un antivirale anche se agisce per effetto indiretto.

Diversi tipi di interferone sono approvati attualmente, non solo nella terapia antivirale (INF α), ma anche in quella antitumorale e contro la sclerosi multipla (INF β). La somministrazione di INF causa diversi effetti collaterali tra cui aumento della

temperatura corporea, affaticamento, nausea, dolori muscolari. Recentemente è stato approvato l'utilizzo clinico dell'interferone pegilato (PEG interferon) che può essere somministrato una volta alla settimana a differenza di quello standard che veniva somministrato tre volte alla settimana. Il PEG α interferon viene utilizzato da solo nella terapia dell'epatite B cronica, o in associazione con la Ribavirina nel trattamento dell'epatite C cronica. Il PEG β interferon rappresenta attualmente il farmaco standard nella terapia della sclerosi multipla. La sua efficacia è stata provata dopo molteplici prove cliniche anche se l'esatto meccanismo d'azione non è stato ancora chiarito. INF α INF β e INF γ hanno dimostrato di inibire *in vitro* la crescita del virus della SARS, e il PEG α interferon ha indotto una significativa riduzione della replicazione e dell'escrezione virale in prove *in vivo* in macachi infetti con il virus della SARS. L'utilizzo dell'INF è stato anche proposto nella prevenzione o nel trattamento delle lesioni da poxvirus nel caso di un attacco bioterroristico con il variola virus (De Clercq, 2006).

B. TERAPIA ANTIVIRALE IN MEDICINA VETERINARIA

1. Introduzione

Nella medicina veterinaria sono molte le malattie di origine virale che colpiscono gli animali di importanza zootecnica e quelli d'affezione. Nonostante questo, l'utilizzo degli antivirali nella terapia o nella profilassi non rappresenta un'eventualità concreta, con l'eccezione di alcuni interventi terapeutici soprattutto nel corso della cheratocongiuntivite erpetica nel gatto.

Mentre nel caso delle malattie batteriche e parassitarie è diffusa da tempo l'idea e la consapevolezza del ricorso agli antibiotici e agli antiparassitari, sia a scopo preventivo che terapeutico, nel caso delle malattie virali esiste ancora indifferenza e rifiuto all'utilizzo degli antivirali. Da un lato, non sono ancora disponibili farmaci antivirali ad uso veterinario, dall'altro le nozioni scientifiche, in merito all'attività di antivirali ad uso umano nei confronti di virus animali, sono ancora scarse, tanto da delegittimarne un loro utilizzo.

Negli animali di importanza zootecnica, l'ingresso nell'allevamento di un agente eziologico virale viene contrastato con l'applicazione di misure di profilassi diretta ed indiretta (in presenza di un vaccino efficace). Alla comparsa della malattia in allevamento, a seconda della contagiosità, della letalità e dei danni economici ad essa associati, vengono decise misure di isolamento degli animali malati, dei sospetti infetti, oppure misure di abbattimento che dipendono dalla gravità e dall'infettività dell'agente eziologico coinvolto.

Nei piccoli animali, in cui a differenza di quelli da reddito, l'utilizzo dei farmaci non trova limitazioni come i tempi di sospensione legati alla presenza di residui negli alimenti, e in cui da parte del proprietario c'è una maggiore attenzione per la salute animale per ragioni di tipo affettivo, è in generale più diffuso e più richiesto un approccio di tipo terapeutico. Nonostante quindi ci possano essere le condizioni favorevoli perché l'utilizzo degli antivirali anche in veterinaria acquisti sempre maggiore interesse, l'approccio che viene comunemente seguito prevede l'uso di farmaci con effetto sintomatico, e non il ricorso a misure terapeutiche specifiche mirate

ad eliminare il virus. Il decorso e l'esito dell'infezione quindi sono in funzione delle condizioni generali di salute dell'animale, della risposta immunitaria del soggetto e della patogenicità del virus coinvolto.

I virus che hanno come target le cellule del sistema immunitario (ad esempio il virus dell'immunodeficienza felina FIV, o il virus del cimurro del cane) e che quindi inducono uno stato d'immunodepressione riducendo la capacità del soggetto di reagire all'infezione, sono un esempio di virus nei confronti dei quali la presenza di una terapia antivirale sarebbe di ottimo ausilio per contrastare efficacemente l'infezione.

Il ricorso alla vaccinazione è una possibilità di ostacolare preventivamente la diffusione di una malattia virale nell'ambito di una popolazione animale recettiva. Purtroppo la vaccinazione non è sempre possibile ed inoltre non esistono vaccini efficaci nella prevenzione dell'infezione nei confronti di tutte le malattie virali. Esistono infatti virus, come il coronavirus felino responsabile della peritonite virale infettiva del gatto, con un'elevata variabilità genetica e antigenica che condizionano la possibilità di produrre un vaccino efficace contro una popolazione virale in continuo cambiamento. Altri virus, come ad esempio il virus orf responsabile dell'ectima contagioso degli ovi-caprini, sono particolarmente evoluti ed adattati all'ospite, e sono in grado di eludere la risposta immunitaria attraverso meccanismi che rendono inefficace anche la risposta dell'animale ad un vaccino. Nei casi in cui la vaccinazione non rappresenta un'alternativa possibile alla prevenzione della malattia, l'uso degli antivirali potrebbe trovare applicazione anche come strumento profilattico.

L'assenza nella medicina veterinaria di una cultura legata all'uso degli antivirali ha probabilmente più origini. Da un lato esiste un fattore di tipo temporale, legato cioè all'effettiva comparsa degli antivirali anche in medicina umana e che risale a non più di 50 anni fa. Dall'altro il disinteresse potrebbe anche essere legato ad un fattore di tipo economico, cioè di costi legati all'utilizzo di queste molecole. In realtà negli ultimi anni, i proprietari di cani e gatti sono maggiormente disposti ad affrontare costi elevati nella cura dei propri animali. Mentre la virologia umana e le conoscenze sulle basi molecolari della patogenesi di patologie umane sono molto avanzate, la virologia veterinaria non può contare ancora su studi altrettanto approfonditi. Questo rappresenta un ostacolo alla ricerca di molecole con funzione antivirale e di target metabolici virus-specifici contro cui dirigere l'attacco chemioterapico. Nello sviluppo di farmaci antivirali è necessario

migliorare le conoscenze della virologia di base, al fine di individuare i momenti del ciclo replicativo virale più idonei all'intervento di una molecola antivirale.

2. Primi studi in vitro ed in vivo di antivirali nei confronti di virus animali

In bibliografia esistono alcuni esempi di studi condotti per lo più *in vitro* per valutare l'efficacia di antivirali nei confronti di virus animali. La maggior parte dei lavori si concentrano sugli herpesvirus animali, tra cui in particolare l'herpesvirus felino tipo 1 (FHV-1) e l'herpesvirus equino tipo 1 (EHV-1).

La sieroprevalenza del FHV-1 nei gatti è di circa il 97% e, come nel caso del HSV-1, in seguito ad infezione primaria si instaura la latenza a livello neuronale. La vaccinazione in alcuni casi non protegge dall'infezione e dalla eventuale comparsa della malattia, inoltre non risolve il problema della latenza e quindi della possibile riattivazione con trasmissione del virus ad altri ospiti recettivi (Field et al., 2006). Nonostante le similitudini tra HSV-1 e FHV-1 nel causare le lesioni a livello oculare nei rispettivi ospiti, le prove *in vitro* hanno evidenziato una scarsa attività antivirale dell'Aciclovir (ACV) nei confronti dell'herpesvirus felino (Collins, 1983; Nasisse et al., 1989; Weiss, 1989). In prove eseguite *in vivo*, il gatto ha mostrato un'elevata sensibilità agli effetti tossici del ACV somministrato per via sistemica (Nasisse et al., 1997). In un altro esperimento *in vivo*, l'ACV ad uso topico invece ha indotto una riduzione delle lesioni superficiali oculari in gatti con FHV-1 (Williams et al., 2005). Recenti prove *in vitro* hanno mostrato una maggiore efficacia antivirale di nucleosidi diversi all'ACV, come il Penciclovir e il Ganciclovir, ma anche di derivati nucleotidici come il Cidofovir (Maggs e Clark, 2004; Sandmeyer et al., 2005; van der Meulen et al., 2006). Queste molecole potrebbero essere considerati validi candidati per la terapia della cheratocongiuntivite erpetica del gatto. Diversi studi sono anche stati condotti testando l'attività antivirale dell'interferone nei confronti del FHV-1. Sono stati testati *in vitro* sia degli interferoni ricombinanti di origine umana, sia di origine felina e una riduzione della crescita virale su colture cellulari di felino è stata osservata con entrambi i tipi di interferone (Fulton e Burge, 1985; Siebeck et al., 2006).

L'EHV-1 rappresenta un altro interessante candidato per lo sviluppo di antivirali in veterinaria a causa delle perdite economiche associate alla presenza del virus in un allevamento equino e alla mancanza di un vaccino efficace (Field et al., 2006). Prove *in*

in vitro sono state eseguite testando ad esempio il Penciclovir (de la Fuente et al., 1992), l'HPMPA e il Cidofovir (Gibson et al., 1992), e dimostrandone l'attività antivirale nei confronti dell'EHV-1. Il beneficio clinico del Cidofovir è stato inoltre sottolineato da una prova *in vivo* (Gibson et al., 1992).

L'effetto terapeutico dell'INF è stato valutato in corso di coinfezione in gatti da virus della immunodeficienza felina (FIV) e virus della leucemia felina (FeLV). In questo studio, nel corso di una terapia di lungo termine con un interferone ricombinante felino, è stato osservato un miglioramento della sintomatologia clinica a breve termine e una riduzione della mortalità nel lungo periodo (de Mari et al., 2004).

Una sperimentazione clinica è stata recentemente eseguita per verificare l'efficacia dell'applicazione topica di una crema a base di Imiquimod 5% nel trattamento della papillomatosi cutanea degli equini causata dal Papillomavirus bovino tipo 1 e 2 (BPV-1 e 2). I sarcoidi sono tumori cutanei che possono evolvere in forma maligna e diffondere sulla superficie corporea dell'animale. L'Imiquimod non è un farmaco antivirale, ma piuttosto un immunostimolatore poiché induce la produzione di INF α ; il suo utilizzo è stato approvato per la risoluzione dei papillomi cutanei nell'uomo. La sperimentazione *in vivo* ha dato risultati incoraggianti e rappresenta uno studio pilota per lo sviluppo di farmaci antivirali specifici nei confronti di questa patologia equina.

3. Virus animali come modello nello studio di farmaci antivirali

Fino ad ora lo studio degli antivirali applicato alla veterinaria è per lo più avvenuto nell'ambito di ricerche in cui gli animali erano utilizzati come modello di studio di patologie od infezioni umane. L'utilizzo degli animali avviene però in due contesti diversi. Da un lato ci sono animali impiegati ai fini sperimentali che vengono infettati con virus patogeni per l'uomo e successivamente trattati con molecole antivirali. In questo caso si cercano di mimare la patogenesi e la sintomatologia della malattia così come esse sono note nell'infezione naturale nell'uomo. Questo utilizzo degli animali come modello di studio riconosce come limite la difficoltà di riprodurre fedelmente la malattia e di non offrire alcun vantaggio nello studio di antivirali efficaci verso patogeni animali. Questo approccio viene seguito durante la sperimentazione di molecole antivirali nei primi test *in vivo*, per accertarne per esempio l'efficacia dopo prove eseguite *in vitro*, per valutare effetti tossici indesiderati e per verificare la via di

somministrazione del farmaco più appropriata. Il topo viene da tempo utilizzato come modello nello studio dell'efficacia di composti antivirali verso il vaccinia virus e il cowpox virus (Roy et al., 2003; Neyts et al., 2004). In entrambi i casi a seconda della via d'ingresso del virus cambia la patogenesi della malattia e quindi cambiano i parametri da considerare nella valutazione dell'efficacia dell'antivirale. Il topo è anche molto utilizzato nei primi test *in vivo* di farmaci antivirali nei confronti del virus dell'immunodeficienza dell'uomo HIV (Spitzenberger et al., 2006).

Accanto ad un utilizzo puramente sperimentale degli animali, esiste invece un approccio molto più dinamico ed interdisciplinare che offre cioè spunti interessanti per la ricerca non soltanto in medicina umana ma anche in veterinaria. In questo caso infatti, vengono utilizzati animali che sono identificati come modello in quanto soggetti ad infezioni comuni all'uomo o comunque causate da patogeni strettamente correlati a quelli noti in medicina umana. E' il caso per esempio del virus della diarrea virale bovina (BVDV) che viene riconosciuto come modello nello studio di molecole ad efficacia antivirale nei confronti del virus dell'epatite C (HCV) (Tabarrini et al., 2006). Il BVDV e il HCV sono entrambi pestivirus e sono strettamente correlati da un punto di vista genetico, inoltre condividono molti aspetti di biologia molecolare alla base della replicazione virale. Essi condividono quindi proteine strutturali e ad attività enzimatica che vengono identificati come possibili target di agenti antivirali. Un altro fattore che giustifica l'uso del BVDV in studi di efficacia *in vitro*, deriva dalla maggiore maneggevolezza in coltura di ceppi citopatogeni rispetto al HCV.

Nell'ambito delle ricerche sui papillomavirus dell'uomo (HPVs) un'importanza elevata è stata svolta dalle conoscenze acquisite nei confronti dei papillomavirus animali sul tema della patogenesi, del ruolo della risposta immunitaria dell'ospite e dei fattori ambientali nello sviluppo dei tumori. In particolare, il coniglio, il bovino e il cane e i rispettivi papillomavirus sono stati assunti da anni come modello di studio dello sviluppo dei papillomi (Campo, 2002). In particolare, il papillomavirus del coniglio (CRPV) e il suo ospite recettivo rappresentano anche un modello da utilizzare nello studio di efficacia di molecole antivirali (Christensen, 2005). Questo modello animale è già stato utilizzato per esempio durante sperimentazioni *in vivo* di nucleosidi aciclici fosfonati (tra cui anche il Cidofovir) (Christensen et al., 2000). In queste prove, i composti sono stati somministrati per via topica in crema o introdotti all'interno della

lesione papillomatosa, e il Cidofovir inclusi altri nucleosidi hanno dimostrato una notevole attività, andando a ridurre le dimensioni e la crescita della lesione. Il modello CPRV/coniglio rappresenta un sistema molto versatile nel saggio pre-clinico di molecole antivirali, ma anche nell'approfondimento delle conoscenze in merito all'interazione virus-ospite. Molte delle molecole testate nei confronti del CPRV, si sono poi dimostrate attive anche nei confronti dei HPV (Christensen, 2005).

Il virus dell'immunodeficienza felina (FIV) provoca nei gatti una sindrome molto simile a quella nota nell'uomo e causata dal virus dell'immunodeficienza umana (HIV), ed è per questi aspetti comuni che da tempo il FIV e il gatto sono stati assunti come modello nello studio della patogenesi, dello sviluppo di vaccini o di farmaci antivirali (Burkhard e Dean, 2003). In bibliografia sono presenti diversi esempi circa l'utilizzo del FIV per test antivirali *in vitro* (D'Ursi et al., 2006) o *in vivo* (Uckun et al., 2003). Ad esempio, studi recenti sono stati condotti per testare *in vitro* molecole come gli inibitori della fusione del virus alla cellula ospite: i risultati ottenuti sono stati promettenti e sottolineano l'importanza della ricerca di molecole anti-retrovirali aventi nuovi target nel ciclo replicativo virale (D'Ursi et al., 2006). Le prove *in vivo* condotte su gatti infettati sperimentalmente con il virus FIV, hanno lo scopo di confermare l'attività di molecole antivirali con efficacia nota *in vitro* o in altri modelli animali come il topo infettati con il virus HIV; nel caso del modello FIV/gatto, il vantaggio è utilizzare un sistema in cui poter valutare l'andamento dell'infezione tra il virus e il proprio ospite naturale (Uckun et al., 2003).

Studi di efficacia *in vitro* di molecole antivirali sono stati anche condotti nei confronti del coronavirus felino, l'agente eziologico della peritonite infettiva felina. Recentemente maggiore interesse è stato rivolto a questo virus in seguito alla comparsa e alla conseguente emergenza sanitaria della SARS causata da un coronavirus umano. Studi comparati di efficacia *in vitro* di molecole ad attività antivirale sono stati eseguiti utilizzando il virus della FIP e quello della SARS (Balzarini et al., 2006).

C. POXVIRUS

1. Classificazione dei poxvirus

La famiglia *Poxviridae* include alcuni dei più importanti patogeni per l'uomo, gli animali domestici e selvatici. I poxvirus sono molto numerosi ed hanno alcune caratteristiche morfologiche e genetiche in comune. Si tratta di grandi virus con aspetto ovoidale o a mattoncino di dimensioni comprese tra i 400 e i 200 nanometri: sono gli unici virus ad essere visibili anche al microscopio ottico. I virioni sono provvisti di envelope che contiene il core virale. Il genoma non è segmentato ed è costituito da una singola molecola di DNA a doppio filamento (dsDNA). La replicazione virale avviene nel citoplasma della cellula ospite con l'ausilio di enzimi codificati ed espressi dal virus nel corso del proprio ciclo replicativo. Nell'ambito di questa famiglia si distinguono due sottofamiglie, quella dei *Chordopoxvirinae* che infetta ospiti vertebrati e quella degli *Entomopoxvirinae* che infetta gli artropodi (ICTVdB Management (2006). 00.058. Poxviridae. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA).

TABELLA 1

Famiglia	Sottofamiglia	Genere	Specie virale prototipo
Poxviridae	Chordopoxvirinae	<u>Orthopoxvirus</u>	<i>Vaccinia virus</i> (VACV)
		<u>Parapoxvirus</u>	<i>Orf virus</i> (ORFV)
		<u>Avipoxvirus</u>	<i>Fowlpox virus</i> (FWPV)
		<u>Capripoxvirus</u>	<i>Sheeppox virus</i> (SPPV)
		<u>Leporipoxvirus</u>	<i>Myxoma virus</i> (MYXV)
		<u>Suipoxvirus</u>	<i>Swinepox virus</i> (SWPV)
		<u>Molluscipoxvirus</u>	<i>Molluscum contagiosum virus</i> (MOCV)
		<u>Yatapoxvirus</u>	<i>Yaba monkey tumor virus</i> (YMTV)
	Entomopoxvirinae	<u>Alphaentomopoxvirinae</u>	<i>Melolontha melolontha entomopoxvirus</i>
		<u>Betaentomopoxvirinae</u>	<i>Amsacta moorei entomopoxvirus</i>
		<u>Gammaentomopoxvirinae</u>	<i>Chironomus luridus entomopoxvirus</i>

Nell'ambito dei *Chordopoxvirinae* esiste un ampio spettro di ospiti recettivi appartenenti alla classe dei mammiferi e degli uccelli. In questa sottofamiglia si distinguono 8 generi diversi e l'appartenenza di un virus ad un genere viene stabilita in base alla morfologia del virione al microscopio elettronico, allo spettro d'ospite e alla presenza di cross-reattività con altri membri dello stesso genere.

2. Poxvirus come agenti di zoonosi nell'uomo

Tre sono i generi che includono agenti zoonosici per l'uomo: *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus* e *Yatapoxvirus* (Lewis-Jones, 2004) (Tabella 2).

TABELLA 2: Principali poxvirus responsabili di zoonosi

Genere	Specie virale	Ospiti
<u>Orthopoxvirus</u>	<i>Camelpox virus</i> (CMLV)	Cammello, uomo
	<i>Cowpox virus</i> (CPXV)	Piccoli roditori, bovino, gatto, cane, uomo
	<i>Ectromelia virus</i> (ECTV)	Topo, uomo
	<i>Monkeypox virus</i> (MPXV)	Piccoli roditori, scoiattoli, primati non umani, uomo
	<i>Raccoonpox virus</i> (RCNV)	Procione, gatto, uomo?
	<i>Taterapox virus</i> (GBLV)	Topo del deserto africano, uomo?
	<i>Vaccinia virus</i> (VACV)	Uomo e ?
	<i>Variola virus</i> (VARV)	Uomo
	<i>Volepox virus</i> (VPXV)	Roditori, uomo?
<u>Parapoxvirus</u>	<i>Bovine papular stomatitis virus</i> (BPSV)	Bovino, uomo
	<i>Orf virus</i> (ORFV)	Pecora, capra, camoscio, bue muschiato, uomo
	<i>Parapoxvirus of red deer in New Zealand</i> (PVNZ)	Cervo rosso della Nuova Zelanda
	<i>Pseudocowpox virus</i> (PCPV)	Bovino, uomo
	<i>Squirrelpox virus</i> (SPPV)	Scoiattolo
<u>Yatapoxvirus</u>	<i>Tanapox virus</i> (TANV)	Primati uomo incluso, insetti
	<i>Yaba monkey tumor virus</i> (YMTV)	Primati uomo incluso

Il variola virus (VARV) è l'unico orthopoxvirus ad avere come solo ospite recettivo l'uomo. Il vaccinia virus (VACV), la cui origine è sconosciuta, probabilmente non riconosce l'uomo come unico ospite naturale. Questa teoria sarebbe maggiormente supportata dall'identificazione di virus vaccinia-like come il buffalopox virus, il cantagalo virus e l'araçatuba virus. Il buffalopox virus è stato indicato come una sottospecie del vaccinia virus ed è presente in forma endemica nella popolazione bufalina in India (Dumbell e Richardson, 1993; Kolhapure et al., 1997). Il cantagalo e l'araçatuba virus sono invece stati più volte recentemente isolati in bovini in Brasile (de Souza Trindade et al., 2003; Nagasse Sugahara et al., 2004). L'origine di questi tre virus non è ancora certa, ma sulla base dell'elevata omologia con il VACV, è stato ipotizzato che, durante la campagna di vaccinazione della popolazione umana con il VACV, questo sia passato accidentalmente in ospiti animali recettivi per lo più selvatici, e che successivamente, con il contatto selvatico-domestico, esso si sia ripresentato come causa di lesioni pox-like nel bufalo o nel bovino. L'importanza epidemiologica e patogenetica di questi tre virus vaccinia-like risiede nel fatto che siano in grado di causare un elevato numero di infezioni nell'uomo, tanto da essere considerate delle zoonosi emergenti in questi Paesi (Dumbell e Richardson, 1993; Kolhapure et al., 1997; de Souza Trindade et al., 2003; Nagasse Sugahara et al., 2004).

La trasmissione delle infezioni da poxvirus dagli animali all'uomo sono riconducibili per lo più al passaggio del virus a livello cutaneo in presenza di abrasioni, tagli, morsi. Nel caso dell'infezione da tanapox virus è stato ipotizzato anche il ruolo di insetti vettori (Downie et al., 1971), mentre per l'infezione da orf virus o da pseudocowpox virus, la trasmissione all'uomo può avvenire anche per via di fomites (Haig e Mercer, 1998). L'infezione sostenuta dal MPXV può essere anche trasmessa per via inalatoria ed è al momento anche l'unica zoonosi da poxvirus a poter essere trasmessa da uomo a uomo (Di Giulio e Eckburg, 2004).

Le infezioni zoonotiche da Orthopoxvirus causano nell'uomo lesioni cutanee di aspetto simile, spesso associate a linfadenopatia e a sintomi sistemici di tipo febbrile (Lewis-Jones, 2004). L'evoluzione delle lesioni nell'arco di diverse settimane è caratterizzata dalla comparsa di vescicole-pustole, seguite dalla formazione di croste e di cicatrici (Baxby e Bennett, 1997). Nella maggior parte dei casi le lesioni sono poco numerose, ad eccezione dell'infezione da MPXV in cui è frequente una disseminazione delle lesioni

come nel corso del vaiolo. Questa zoonosi è anche quella più frequentemente associata a gravi ripercussioni generali e a fenomeni di mortalità tra i bambini (Di Giulio e Eckburg, 2004). Le infezioni sostenute dai parapoxvirus invece non sono generalmente accompagnate da febbre o da risentimento generale rimanendo localizzate a livello cutaneo; l'insorgenza di complicazioni è per lo più legata ad infezioni batteriche secondarie o a condizioni di immunodeficienza del paziente infetto (Tan et al., 1991; Hunskaar, 1986).

La diagnosi delle infezioni da poxvirus nell'uomo si basano inizialmente su dati di tipo clinico ed anamnestico, seguiti da indagini di laboratorio quali la microscopia elettronica, e la PCR che permette di distinguere non solo tra infezioni da *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus* e *Yatapoxvirus*, ma di identificare le diverse specie virali nell'ambito di uno stesso genere (Lewis-Jones, 2004).

La zoonosi causata dal cowpox virus è piuttosto infrequente ed è segnalata in Gran Bretagna ed Europa. Raramente l'infezione viene trasmessa dal bovino, più frequentemente dal gatto (Baxby et al., 1994), nonostante reservoir dell'infezione siano piccoli roditori.

Molto più importante è la zoonosi sostenuta dal monkeypox virus, che è un'infezione endemica in Africa ed in particolare in Zaire e Congo, dove i bambini sono i soggetti più a rischio (Di Giulio e Eckburg, 2004). Questa zoonosi è comparsa nel 2003 al di fuori del continente africano ed in particolare negli USA a causa dell'importazione di animali infetti, in particolare di una specie di roditore africano. L'infezione è stata successivamente trasmessa dal roditore alla marmotta e quindi all'uomo. Su 72 casi sospetti, solo 37 furono confermati da indagini di laboratorio più approfondite e circa il 26% delle persone infette richiesero assistenza ospedaliera. Non vi furono decessi, ma due bambini svilupparono una grave forma d'infezione con encefalite. Questo episodio di monkeypox negli USA ha sollevato grande attenzione sull'importazione di specie animali esotiche negli USA così come in tutto il mondo occidentale, circa il rischio di introduzione di nuovi agenti patogeni (Lewis-Jones, 2004; Frey e Belshe, 2004).

L'infezione da tanapox virus è nota nel continente africano ed è trasmessa all'uomo per contatto diretto con primati non umani, che fungono anche da reservoir del virus, ma probabilmente anche da insetti vettori (Lewis-Jones, 2004). Sono stati riportati casi di infezione da tanapox virus al di fuori del continente africano, ma per lo più legati a

incidenti di laboratorio o al ritorno da viaggi nelle aree infette con in anamnesi morsi di scimpanzè (Frey e Belshe, 2004; Stich et al., 2002).

Nell'ambito del genere *Parapoxvirus*, ci sono almeno tre virus che causano infezione anche nell'uomo: l'orf virus, lo pseudocowpox virus e il virus della stomatite papulosa. Tutti e tre riconoscono come serbatoio dell'infezione ruminanti domestici e selvatici e l'uomo rappresenta un ospite accidentale. Si tratta per lo più di zoonosi professionali e con carattere autolimitante, in cui le lesioni regrediscono nell'arco di alcune settimane. Anche i parapoxvirus dei pinnipedi, sono agenti zoonotici, come dimostrato da almeno due casi d'infezione in addetti alla cura di leoni marini e foche (Clark et al., 2005).

L'attenuazione dell'immunità dopo la cessazione della campagna di vaccinazione negli anni '80, l'aumento della circolazione di animali esotici, la possibilità che il virus possa trovare in una nuova area geografica un diverso reservoir, rappresentano tutti elementi di preoccupazione circa l'emergenza di infezioni zoonotiche sostenute da poxvirus. Mentre nei confronti del monkeypox virus esiste cross-protezione con il vaccinia virus, nel caso del tanapox virus, che è anch'esso un orthopoxvirus, o dei parapoxvirus non è stata segnalata. Il monkeypox virus è considerato insieme al vaccinia virus, il principale poxvirus candidato nel caso di un attacco bio-terroristico. Attualmente da un punto di vista immunitario la maggior parte della popolazione mondiale è altamente recettiva all'infezione in quanto anche coloro che hanno ricevuto l'immunizzazione nei confronti dello smallpox, possiedono una memoria immunitaria insufficiente a impedire l'infezione e probabilmente solo in grado di ridurre la sintomatologia. Inoltre, occorre considerare gli effetti dell'infezione su quella parte della popolazione con una ridotta capacità immunitaria, come i bambini, gli anziani, le persone affette da immunodeficienza, o i soggetti sottoposti a cure anti-rigetto post-trapianto.

3. Terapia delle infezioni da poxvirus

La ricerca di composti antivirali attivi nei confronti dei poxvirus ed in particolare del vaccinia virus (VACV) è iniziata circa 50 anni fa durante la campagna di eradicazione del vaiolo umano. Furono identificate diverse molecole attive, ma nessuna venne mai utilizzata in larga scala. Attualmente sotto la pressione imposta dal timore che alcuni poxvirus possano essere usati come armi biologiche in un attacco terroristico, e dall'emergenza di zoonosi come quella sostenuta dal monkeypox virus, la ricerca di

antivirali ha assunto nuovo impulso (Snoeck et al., 2007). In particolare sono note diverse classi di antivirali efficaci nei confronti dei poxvirus: tra questi, i composti noti da più tempo vanno ad inibire enzimi cellulari, mentre quelli più recenti hanno una maggiore selettività andando a riconoscere target virali. I poxvirus hanno un genoma molto ampio e sono in grado di codificare per molte proteine, ciascuna delle quali rappresenta un potenziale target per la terapia antivirale. Alcune di queste proteine hanno attività enzimatica e sono essenziali ai fini della replicazione virale, quindi della replicazione del DNA, della sintesi dell'mRNA, del capping e della metilazione, ma anche ai fini dell'ingresso del virus nella cellula, dell'assemblaggio del virione, della sua maturazione e del rilascio (Snoeck et al., 2007).

3.1 Composti con target cellulari

La ribavirina (RBV), l'EICAR, l'(S)-DHPA e altri analoghi nucleosidici sono stati descritti per la loro proprietà antivirale *in vitro* nei confronti del VACV: essi vanno ad inibire enzimi cellulari come l'inosina monofosfato deidrogenasi o l'adenosil omocisteina idrolasi (De Clercq, 2001).

Un gruppo recente di molecole antivirali è quello che va ad inibire le chinasi cellulari. Ad esempio il composto CI-1033 agisce come antivirale andando ad interferire con l'attivazione ad opera di chinasi cellulari di fattori di crescita virali (es. vaccinia growth factor, VGF) che favoriscono la replicazione virale ed in particolare la diffusione dell'infezione da una cellula a quelle circostanti (Yang et al., 2005). In particolare inibendo le chinasi cellulari, viene drasticamente ridotto il numero di virioni maturi (extracellular enveloped virions, EEV) che vengono rilasciati dalla cellula infetta (Yang et al., 2005). Un altro composto chiamato STI-571 agisce bloccando chinasi cellulari utilizzate dal virus per lo spostamento delle particelle virali all'interno della cellula o per l'estruzione dei virioni dalla cellula (Reeves et al., 2005). Gli inibitori delle chinasi cellulari rappresentano un gruppo promettente di antivirali che, avendo come target enzimi cellulari, sarebbero meno soggetti all'insorgenza del fenomeno della resistenza virale (Snoeck et al., 2007).

3.2 Composti con target virali

3.2.1 Analoghi nucleosidici

Questa categoria di composti antivirali include la maggior parte dei farmaci in commercio attivi nei confronti degli herpesvirus, del varicella-zoster virus e del citomegalovir (Aciclovir, Penciclovir e Ganciclovir e i loro corrispondenti prodrugs). Per diverse molecole appartenenti a questo gruppo ed aventi come target la sintesi del DNA virale, è stata dimostrata l'attività antivirale verso il VACV. Ad esempio la Vidarabina (ara-A) ha un'attività *in vitro* 10 volte superiore verso il VACV che verso l'HSV-1 e 2 (Snoeck et al., 2007). Anche l'Idossuridina (IDU) è nota come pomata oftalmica per il trattamento dell'herpesvirus oculare, ma ha attività antivirale anche nei confronti del VACV (Snoeck et al., 2007). Il composto S2242 ha dimostrato un'attività potente e selettiva verso il VACV, così come il suo prodrug H-961 la cui efficacia è stata testata in diversi modelli animali (Snoeck et al., 2007).

Dopo il loro ingresso all'interno della cellula, i derivati nucleosidici necessitano di tre successive fosforilazioni prima di interagire con il loro target enzimatico, la DNA polimerasi virale (Figura 1). La prima fosforilazione avviene ad opera di specifiche timidin-chinasi (TK) di origine virale (per gli herpes e il varicella-zoster virus) o di protein-chinasi (PK) virali (per il citomegalovirus). Le due successive fosforilazioni invece avvengono ad opera di enzimi cellulari. Nella loro forma trifosfata, i composti possono interagire come inibitori competitivi dei normali substrati della DNA polimerasi virale, cioè i dNTPs. Una volta incorporati nella catena del DNA virale possono agire come terminatori di catena, prevenendo l'allungamento della catena del DNA. Mentre però Aciclovir agisce solo come terminatore di catena, Penciclovir e Ganciclovir possono anche essere incorporati all'interno della catena di DNA (De Clercq, 2003).

Il primo step di fosforilazione è critico e discriminante i virus nei confronti dei quali i derivati nucleosidici esplicano il loro effetto antivirale. Virus che sono naturalmente sprovvisti delle chinasi o che hanno sviluppato resistenza a questi composti (come ad esempio herpesvirus TK negativi, o anche poxvirus TK negativi), non verranno inibiti dalla presenza di questi antivirali (De Clercq, 2003).

3.2.2 Analoghi nucleotidici

Tra i composti appartenenti a questo gruppo di molecole ci sono il Cidofovir (HPMPC o CDV), l'Adefovir (PMEA) e il Tenofovir (PMPA). I derivati nucleotidici sono anche chiamati nucleosidi aciclici fosfonati (ANPs) in quanto si differenziano dai precedenti derivati nucleosidici per la presenza di un gruppo fosfonato legato alla molecola, attraverso un legame stabile e resistente alle esterasi cellulari. Per la presenza di questo gruppo fosfonato, gli ANPs necessitano solo di due steps successivi di fosforilazione che avvengono ad opera di enzimi cellulari (Figura 1). In questo modo la loro attività antivirale non dipende dalla presenza-assenza delle chinasi virali, ma solamente dall'utilizzo da parte del virus della DNA polimerasi che rappresenta il target degli ANPs. Virtualmente quindi un più ampio spettro di virus sono sensibili agli ANPs rispetto ai derivati nucleosidici. Gli ANPs sono caratterizzati da un'elevata selettività nei confronti della DNA polimerasi virale: ad esempio il Cidofovir inibisce la sintesi del DNA del citomegalovirus ad una concentrazione 1000 volte più bassa di quella necessaria per la sintesi del DNA cellulare (De Clercq, 2003).

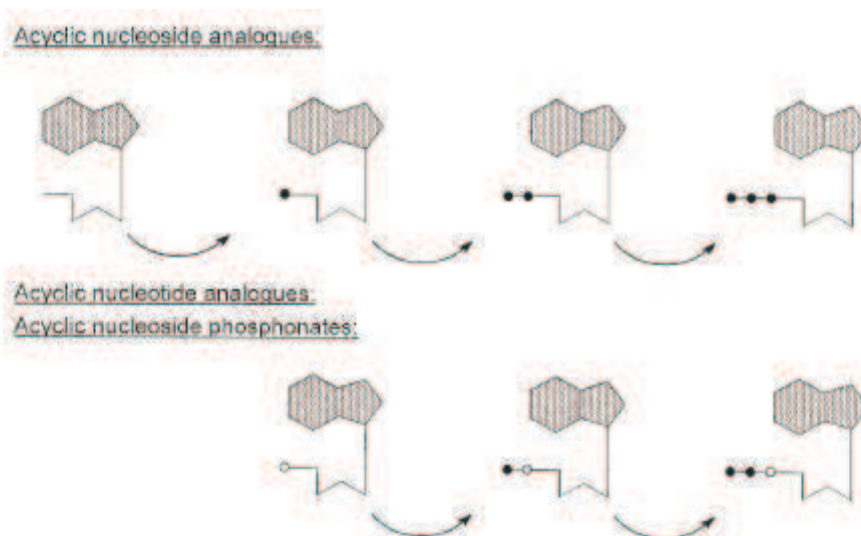


Figura 1: Rappresentazione schematica del metabolismo intracellulare dei derivati nucleosidici e nucleotidici. Mentre i primi necessitano di tre fosforilazioni, gli ultimi solo di due al fine di essere convertiti in composti farmacologicamente attivi. (da De Clercq, 2003).

HPMPA è la molecola prototipo degli ANPs ed è caratterizzata da un'attività potente e selettiva verso il VACV (De Clercq et al., 1986). Essa ha un'attività antivirale ad ampio

spettro nei confronti dei virus a DNA, tra cui gli herpes-, gli adeno-, gli hepadna-, oltre ai poxvirus. Il suo analogo citosinico è l'HPMPC che ha uno spettro d'azione ancora più ampio includendo anche i papilloma- e i polyomavirus, nei confronti dei quali però sono stati identificati altri meccanismi d'azione, come l'induzione dell'apoptosi nelle cellule HPV positive (De Clercq, 2002; Andrei et al., 2001).

L'HPMPC conferisce un'inibizione prolungata della replicazione virale che ne permette una somministrazione infrequente (una volta alla settimana per via sistemica, o una volta al giorno per via topica). Questa caratteristica è riconducibile alla lunga emivita dei suoi metaboliti (De Clercq, 2002). I meccanismi con cui l'HPMPC inibisce la DNA polimerasi dei poxvirus includono: la capacità del suo metabolita bifosfato (HPMPCpp) di competere con il dCTP nella sintesi del DNA virale, l'effetto di blocco dell'estensione della catena di DNA, l'inibizione dell'enzima 3'-5'-esonucleasi, fondamentale per ridurre gli errori di replicazione (Magee et al., 2005).

HPMPA and HPMPC furono i primi ANPs con una nota attività antivirale *in vitro* nei confronti di diversi orthopoxvirus, tra cui il cowpox virus, camelpox virus, monkeypox virus, ma anche nei confronti dei parapoxvirus come l'orf virus e lo pseudocowpox virus (De Clercq, 2002; Nettleton et al., 2000). Nuovi ANPs, tra cui HPMPO-DAPy, PMEO-DAPy and PMPO-DAPy hanno dimostrato un'attività antivirale analoga ai composti precedenti (Balzarini et al., 2004).

Il cidofovir ha una scarsa biodisponibilità orale, quindi in caso di somministrazione sistemica si ricorre alla via endovenosa, che si deve accompagnare alla somministrazione di probenecid al fine di ridurre la sua potenziale nefrotossicità (Lalezari et al., 1997). Poichè in caso di terapia di massa nei confronti di una infezione da poxvirus, la via orale rappresenterebbe la modalità di somministrazione più semplice, sono stati sintetizzati i prodrugs del cidofovir e di altri ANPs. Queste molecole consistono in una serie di eteri coniugati lipidici in cui per esempio il cidofovir è legato ad un esadecil-propanediolo a formare il HDP-CDV o all'ottadecil-etanediolo a formare l'ODE-CDV. Essendo eteri lipidici, queste molecole vengono assorbite rapidamente a livello gastro-intestinale ed immediatamente distribuiti per via ematica e linfatica. Essi raggiungono concentrazioni molto elevate a livello epatico, splenico, polmonare, tutti organi che rappresentano importanti siti target delle infezioni sistemiche da poxvirus. Inoltre, questi prodrugs mostrano un minor accumulo e una minore tossicità renale

rispetto al cidofovir (Ciesla et al., 2003). La loro maggiore lipofilicità si traduce anche in un migliore ingresso cellulare con conseguenti maggiori concentrazioni del composto attivo e maggiore attività antivirale (Kern et al., 2002).

I primi studi *in vivo* riguardo l'attività del cidofovir nei confronti del VACV vennero realizzati utilizzando topi affetti da grave e combinata sindrome da immunodeficienza (topi SCID) (Neyts e De Clercq, 1993; Smee et al., 2001). Successivamente, il cidofovir venne anche utilizzato in topi infettati sperimentalmente con il cowpox virus per via inalatoria. Un altro modello animale, quello delle scimmie, è stato utilizzato per testare l'attività del cidofovir nei confronti del monkeypox virus (Smee e Sidwell, 2003). Tutti questi studi *in vivo* utilizzando diversi modelli animali e diversi orthopoxvirus, hanno confermato le potenzialità terapeutiche del cidofovir. Anche l'HPMPO-DAPy, utilizzato *in vivo* per verificare le potenzialità terapeutiche verso il VACV, ha dimostrato di essere un ottimo candidato per lo sviluppo di un farmaco anti-poxvirus (De Clercq et al., 2005). Recentemente, i prodrugs del cidofovir sono stati studiati in diversi modelli animali e le prove antivirali *in vivo* hanno confermato la loro potenzialità nel trattamento per via sistemica di infezioni da poxvirus (Buller et al., 2004; Quenelle et al., 2004).

Attualmente il cidofovir è registrato come antivirale nella terapia della retinite da citomegalovirus in pazienti affetti da AIDS, ma la sua efficacia terapeutica è già stata sottolineata dal suo utilizzo in pazienti affetti da infezioni da poxvirus, come il molluscum contagiosum e l'ectima contagioso (Geerinck et al., 2001) e da herpesvirus e papillomavirus (Snoeck., et al., 1994).

3.2.3 Inibitori della sintesi mRNA di geni intermedi e tardivi

La Distamicina A inibisce la trascrizione di geni della fase intermedia e tardiva del ciclo replicativo del VACV. Il composto ha come target la molecola del DNA in corrispondenza di 5 coppie consecutive di A-T. Poichè nel VACV i siti promoter per la trascrizione contengono 90% di A-T, la Distamicina A può riconoscere quelle sequenze come regioni target. Nonostante si tratti di un composto tossico, esso potrebbe rappresentare un esempio per lo sviluppo di composti con una maggiore selettività verso il VACV.

3.2.4 Inibitori della morfogenesi virale

Il composto noto come TTP-6171 rappresenta un inibitore della morfogenesi virale in quanto inibisce il processo di clivaggio del precursore della proteina del core e quindi la conseguente maturazione dei virioni a particelle infettanti (Byrd et al., 2004).

3.2.5 Inibitori del rilascio virale

A questa categoria di molecole appartiene il composto noto come ST-246 che ha mostrato attività antivirale nei confronti di vari orthopoxvirus. Il suo meccanismo d'azione consiste nell'inibizione del rilascio di virioni al di fuori della cellula infetta, come dimostrato dalla riduzione della carica virale extracellulare e dall'invariata produzione di virioni intracellulari (Yang et al., 2005).

3.3 Interferone

La capacità dell'INF- α , - β e - γ di inibire la replicazione *in vitro* e *in vivo* dei poxvirus è nota da tempo (De Clercq, 2001). Molti poxvirus però sono in grado di interferire con l'attività antivirale dell'INF, andando per esempio a codificare per fattori di virulenza che blocca la trascrizione di geni indotti dalla produzione di interferone e responsabili dei meccanismi antivirali (gene H1L del VACV, gene E3L del VACV e omologo OVINFR del virus orf). Altri meccanismi di modulazione negativa dell'attività dell'INF si hanno a livello extracellulare per effetto di molecole, prodotte da diversi poxvirus, in grado di mimare lo stesso INF e bloccarne il legame extracellulare con il rispettivo recettore (gene B19R e B8R del VACV e omologhi nel myxoma virus).

Recentemente sono stati sviluppati degli agonisti dell'INF- γ che, andando a riconoscere e quindi a legare e ad attivare il dominio cellulare del recettore per l'INF- γ , by-passano l'interferenza indotta dal fattore di virulenza B8R del VACV e sono quindi in grado di mimare l'effetto antivirale dell'INF- γ e di inibire il VACV *in vitro*.

4. Orf virus

4.1 Eziologia: aspetti generali

Il virus orf con l'ausilio della microscopia elettronica appare di aspetto ovoidale al contrario del vaccinia virus o di altri *Orthopoxvirus* che hanno un caratteristico aspetto a mattoncino (Moss, 1996) (Figura 2).

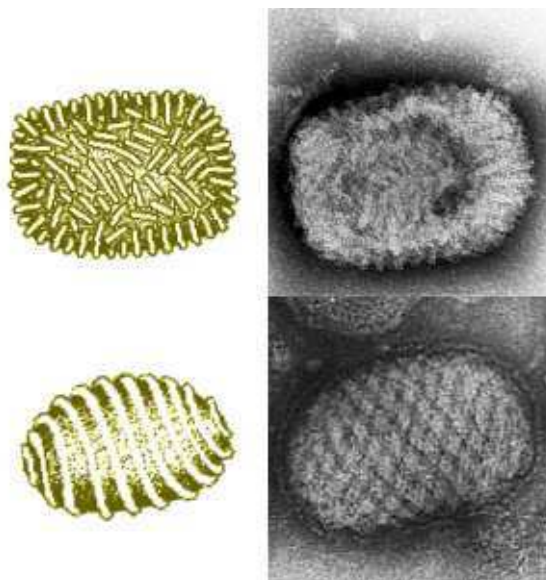


Figura 2: Le illustrazioni in alto si riferiscono all'aspetto morfologico di virus appartenenti al genere *Orthopoxvirus*, mentre quelle in basso riproducono il virus orf (Foto da <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/>).

In generale per i poxvirus, dal terreno di coltura di substrati cellulari infetti possono essere isolati virus con envelope liberi (Extracellular Enveloped Virions, EEV) o associati alla cellula (Cell-associated Enveloped Virions, CEV). Nel criolisato cellulare infetto osservato al microscopio elettronico, le particelle virali possono apparire provvisti di envelope e con superficie liscia, oppure con un aspetto a “gomitolo di lana”; questi ultimi sono i più numerosi e sono detti Intracellular Mature Virions (IMV) e devono il loro aspetto alla presenza di un filamento tubulare che avvolge a spirale tutta la superficie del virione (Smith et al., 2002).

Il genoma dei *Parapoxvirus* ha un'estensione di 130-160 Kbp, di cui gli ultimi 3 Kbp rappresentati da ITR (Inverted Terminal Repeat), e ha un contenuto in G+C di circa il 63% (Wittek et al., 1979). Negli *Orthopoxvirus* il genoma ha un'estensione maggiore, ad esempio quello del vaccinia virus è di 192 Kbp, ed ha però un minore contenuto di

G+C, circa il 30-40%. L'organizzazione genomica dei *Parapoxvirus* ha delle analogie con quella di altri poxvirus ed è possibile allineare il genoma del virus orf con quello del vaccinia (Mercer *et al.*, 1995) (Figura 3). La regione centrale, molto conservata, contiene i geni essenziali per la replicazione virale; in particolare sono noti i geni che codificano per la DNA polimerasi, la dUTPasi, la RNA elicasi, e per proteine strutturali del virus quali la proteina immunodominante dell'envelope di 39 kDa, la proteina altamente immunogena di 65 kDa probabilmente associata al core virale e la proteina di fusione di 10 kDa (Housawi *et al.*, 1998; Haig e Mercer, 1998). Le due regioni terminali ipervariabili sono sede di geni non essenziali, ma responsabili della virulenza, della patogenicità e dell'host range (Büttner e Rziha, 2002; Cottone *et al.*, 2002).

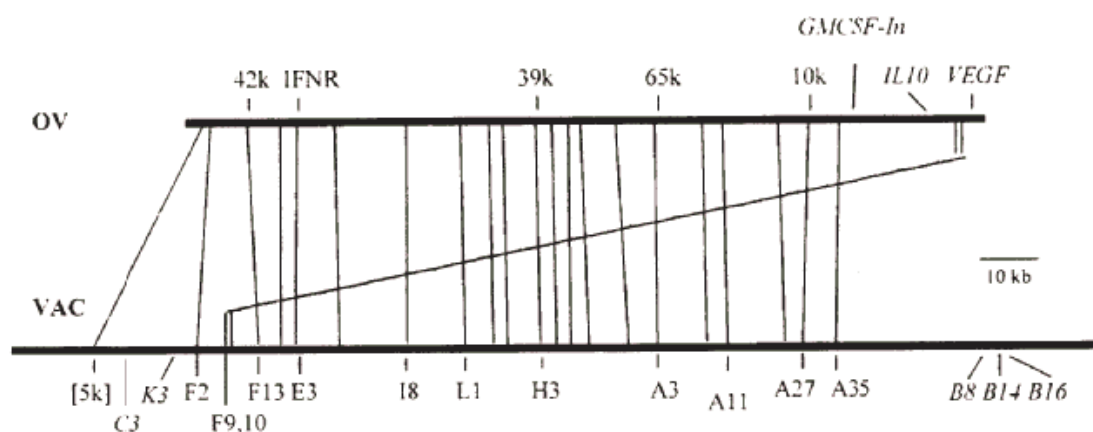


Figura 3: Allineamento del genoma del virus orf (ceppo NZ2) e del vaccinia virus (ceppo Copenhagen) (Da Mercer *et al.*, 1998).

Tutti i *Parapoxvirus* replicano facilmente in coltura cellulare e danno un effetto citopatico (CPE) caratteristico, con cellule rotondeggianti in fase di degenerazione palloniforme e con la tendenza a distaccarsi dal monostrato cellulare, lasciando aree di discontinuità nel tappeto cellulare che viene progressivamente distrutto. Per l'isolamento e la coltivazione del virus orf possono essere utilizzate diverse colture cellulari tra cui le cellule di cute embrionale ovina (Greig, 1957), le cellule di testicolo e rene ovino (Plowright *et al.*, 1959), le cellule di polmone e di milza ovina (Gassman *et al.*, 1985; Housawi *et al.*, 1991a), mentre per i ceppi isolati dall'uomo sono state utilizzate cellule amniotiche umane e di polmone embrionale umano (Gill, 1990). Come

per altri virus epiteliotripi, anche per il virus orf possono inoltre essere utilizzate colture primarie di cheratinociti (Scagliarini et al., 2005).

Il virus orf è particolarmente resistente e all'interno del materiale crostoso tra 0°C e 20°C è in grado mantenersi infettante per anni. La sua capacità di sopravvivenza nei ricoveri e nei pascoli è strettamente dipendente dalle condizioni climatiche. Nei mesi estivi infatti il virus può rimanere infettante per un massimo di 30-60 giorni se esposto direttamente all'irraggiamento solare (Boughton e Hardy, 1935). In autunno con l'abbassamento della temperatura, può invece conservare la sua capacità infettante fino alla primavera successiva; questo però non accade se il grado di umidità aumenta a causa delle piogge che, provocando la scioglimento delle croste, espongono direttamente il virus ai fattori ambientali inattivanti (McKeever e Reid, 1986; Reid, 1994).

Tutti i poxvirus replicano nel citoplasma cellulare grazie ad enzimi virali come la DNA polimerasi e la mRNA polimerasi (Figura 4).

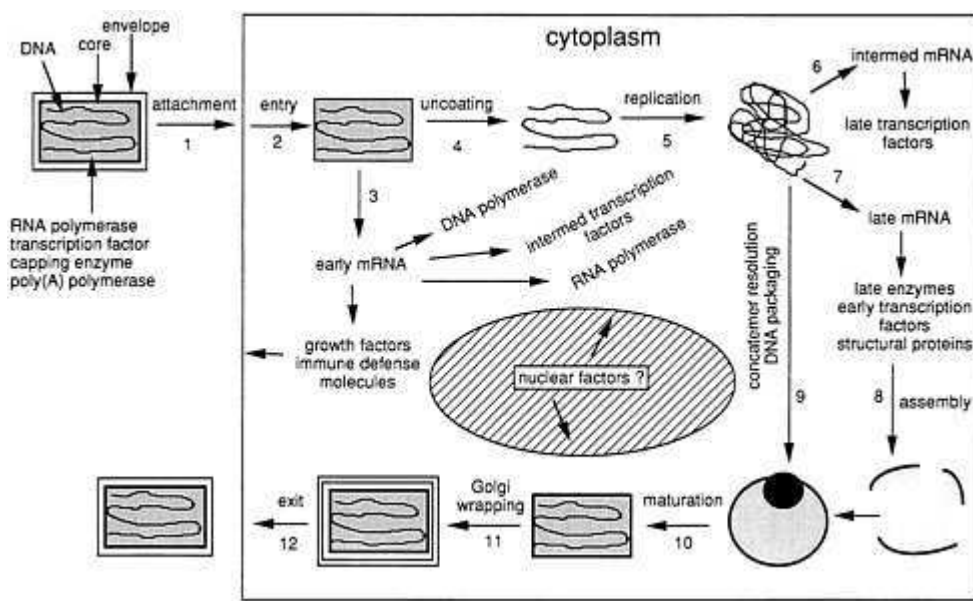


Figura 4: rappresentazione schematica della replicazione dei poxvirus (da darwin.nap.edu/books/0309058368/html/11343.html).

Il processo di replicazione virale descritto da Moss nel 1996 per i poxvirus, è estendibile anche al virus orf ed è caratterizzato dal susseguirsi di fasi tra cui l'adsorbimento, la penetrazione e l'uncoating virale, seguiti dalla trascrizione del DNA (che avviene in tre momenti diversi a seconda che vengano trascritti gene precoci, intermedi o tardivi), la

replicazione del DNA, la traduzione dell'RNA virale in proteine e loro rimaneggiamento, l'assemblaggio del virione e infine la sua liberazione.

Già dopo 2 o 3 ore dall'infezione, nel citoplasma cellulare compaiono le "fabbriche virali" o viroplasmii, sede della sintesi del DNA virale e con l'aspetto di agglomerati di materiale granulare.

La sintesi del DNA virale avviene in 2-6 ore e necessita della produzione continua di proteine enzimatiche per la maggior parte sintetizzate durante la fase di trascrizione precoce: la DNA polimerasi, la timidina chinasi, l'esonucleasi ed endonucleasi, deossitridina 5'-trifosfato nucleotidasi (dUTPasi).

4.2 Epidemiologia

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 (Mazur e Machado, 1989; Gilray *et al.*, 1998). Le epidemie negli agnelli possono inoltre portare ad un incremento dei costi di gestione, per la necessità di mantenere gli animali in vita con un'alimentazione artificiale

Negli allevamenti la malattia può raggiungere una morbilità molto alta, talvolta fino al 100%, anche se la letalità è sempre limitata, mantenendosi intorno all'1%. Un aumento del tasso di letalità fino al 10% è stato riscontrato in concomitanza con eventi stressanti come il trasporto degli agnelli, o in caso di immunodepressione (Greig *et al.*, 1984; Abu Elzein e Housawi, 1997), oppure in caso di setticemia provocata da infezioni batteriche secondarie. Sono in aumento in Italia e nel mondo, gli episodi di ectima caratterizzati da forme atipiche in cui c'è un aumento della letalità tra gli animali adulti che in queste forme "maligne" sono i più colpiti contrariamente alla norma (Scagliarini, 2002; Smith *et al.*, 2002; Di Marco *et al.*, 2000; Zamri-Saad *et al.*, 1992; Mazur e Machado, 1989; Guo *et al.*, 2003). La letalità che si osserva nel corso di un focolaio di ectima non è comunque mai riconducibile ad una diffusione sistemica del virus che rimane invece localizzato a livello cutaneo, ma piuttosto alle lesioni labiali e orali che impediscono agli agnelli la suzione e agli animali adulti la prensione e la masticazione dell'alimento: l'anoressia è la causa del defedamento, della disidratazione e della morte.

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. Il virus viene disperso nell'ambiente tramite le croste degli animali infetti che contengono elevati titoli virali e costituiscono un ottimo mezzo di conservazione dell'infettività. A causa dell'elevata resistenza del virus nell'ambiente, pascoli e ricoveri contaminati possono mantenere alte cariche virali anche per molto tempo, rappresentando così un fattore di rischio elevato per gli animali recettivi (Reid, 1994; Lewis, 1996).

La trasmissione del virus può avvenire sia per contatto diretto con animali infetti, che indiretto con i loro prodotti o con oggetti e ambienti contaminati. La presenza di abrasioni, ferite, escoriazioni e ustioni cutanee è essenziale per permettere l'ingresso del virus nella cute. Le soluzioni di continuo provocate nel corso della tosatura rappresentano un tipico esempio di trasmissione tramite *fomites* non adeguatamente sterilizzati. La marchiatura dell'orecchio e il taglio della coda possono rappresentare un'altra buona opportunità d'ingresso per il virus (Allworth et al., 1987; Housawi e Abu Elzein, 1991b). Il dipping può rivelarsi una pratica rischiosa in allevamenti con alta prevalenza di soggetti infetti poichè il disinfettante nelle vasche può essere insufficiente ad inattivare grosse quantità di virus disperse con le croste a partire da lesioni podali.

Le specie tipicamente interessate dall'infezione da orf virus sono quelle ovi-caprine, ma anche altri artiodattili si sono dimostrati recettivi, ad esempio il cammello, il dromedario, l'alpaca e il lama (Robinson e Balassu, 1981), ed alcune specie selvatiche come la renna (Kummeneje e Kosgrud, 1979), la gazzella (Yeruham *et al.*, 1994), il camoscio (Guarda, 1959), e il muflone (Zanin *et al.*, 1997). L'infezione è stata anche riscontrata nel cane (Wilkinson, 1977).

Negli ovi-caprini domestici la malattia può colpire animali di tutte le età anche se nei giovani si osservano in genere le forme cliniche più gravi. La maggiore incidenza della malattia si ha infatti nel periodo primaverile-estivo quindi nella stagione della nascita degli agnelli (Robinson e Balassu, 1981). Nelle aree dove la malattia è endemica gli adulti risultano apparentemente meno recettivi a causa delle continue reinfezioni e degli interventi vaccinali; infatti la reazione immunitaria che fa seguito all'infezione, pur non proteggendo totalmente da successive reinfezioni, contribuisce a ridurre la gravità delle forme cliniche che risultano quindi meno evidenti (Haig e Mercer, 1998).

L'infezione da orf virus è una zoonosi di tipo professionale ed interessa in particolare le categorie di lavoratori che vengono a diretto contatto con gli animali infetti o con i loro prodotti (lana, pelli, carne) (Bodnar *et al.*, 1999). Si sono verificati però anche casi d'infezione per contatto indiretto con materiale contaminato, mentre sono stati registrati pochissimi casi di trasmissione uomo-uomo o da animali selvatici (Bodnar *et al.*, 1999). Anche i riti religiosi che comportano un contatto ravvicinato con gli ovini, come quello ebraico di "kasherizzazione" o quello musulmano di "Aid el Kebir", possono rivelarsi un'ulteriore occasione di rischio per l'uomo anche al di fuori dei tipici ambienti rurali (Guibal *et al.*, 1996; Uzel *et al.*, 2005; Gunduz *et al.*, 2005). Nelle comunità agricole e nelle categorie a rischio, l'infezione non è un evento raro, ma la reale incidenza nell'uomo è per lo più sconosciuta poichè in genere le lesioni non sono gravi e non richiedono l'intervento medico.

4.3 Patogenesi

Il virus orf ha uno spiccato epiteliotropismo e causa lesioni localizzate alla cute e alle mucose penetrando attraverso soluzioni di continuo che sono indispensabili perchè il virus possa esplicare la propria invasività e infettività (McKeever *et al.*, 1988). Nei focolai naturali, le lesioni sono più frequenti negli animali alimentati con foraggi grossolani che favoriscono lo sviluppo di lesioni orali e labiali, oppure anche negli animali in lattazione in cui i microtraumi mammari dovuti alla suzione degli agnelli predispongono all'infezione in questa sede.

Il tempo di latenza tra l'infezione e la comparsa delle tipiche lesioni varia da 48 a 120 ore, a seconda del ceppo virale e dell'ospite. Ad esempio è stato evidenziato un diverso comportamento biologico del virus a seconda della specie animale infettata, in particolare tra pecore e capre (Hussain e Burger, 1989): studi comparati hanno dimostrato un decorso più lungo della malattia nella pecora rispetto alla capra (Housawi *et al.*, 1993).

McKeever *et al.* nel 1988 hanno condotto uno studio sperimentale dell'aspetto istopatologico delle lesioni da orf virus ed hanno osservato che a partire dal secondo giorno post-infezione (PI) che si osservano i primi segni della replicazione virale a livello dello strato Malpighiano dove le cellule appaiono di aspetto vacuolizzato.

Cinque giorni PI, la degenerazione palloniforme, tipica dell'infezione da orf virus, è prominente ed è accompagnata dall'infiltrazione di neutrofili, linfociti e plasmacellule; le cellule in degenerazione tendono a confluire formando ampi vacuoli e determinando la fuoriuscita del liquido protoplasmatico che determina la dissociazione dei piani cellulari superiori da quelli inferiori dell'epidermide. Al decimo giorno PI, l'epidermide è stata completamente scomposta e disgregata dai fenomeni di distruzione legati alla replicazione virale; questo comporta la superficializzazione dello strato papillare dell'epidermide che è necrotico ed intensamente infiltrato di cellule infiammatorie. Fenomeni di degenerazione sono estesi anche al derma sottostante, e in particolare alle ghiandole sebacee, ai follicoli piliferi, ai muscoli erettori del pelo. Al 15° giorno PI, lo strato papillare necrotico, l'essudato plasmatico e cellulare formano una sottile crosta, al disotto della quale, inizia la rigenerazione dell'epidermide. Successivamente, l'iperplasia dell'epidermide conferisce alla superficie della lesione un tipico aspetto papillomatoso, mentre dei rilievi papillari iperplasici si interdigitano con il derma sottostante; nel derma, persiste l'infiltrazione di polimorfonucleati, linfociti e plasmacellule. Al 30° giorno PI, l'epidermide riacquista lentamente uno spessore fisiologico, e scompaiono quindi i fenomeni di acantosi e ipercheratosi. Nel derma rimangono zone d'infiltrazione cellulare che tendono progressivamente a sparire.

Negli ovi-caprini sono stati segnalati episodi di ectima contagioso a carattere proliferativo o "maligno" o "persistent orf" (Di Marco *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2002; Zamri-Saad *et al.*, 1992; Gumbrell e McGregor *et al.*, 1997; Guo *et al.*, 2003; Mazur e Machado, 1989). Una caratteristica delle forme maligne è l'aspetto facilmente sanguinante delle lesioni, ed istologicamente la presenza di una fitta rete vascolare con iperemia e edema del derma. Il ruolo del fattore di crescita vascolare (VEGF) codificato dal virus orf nel corso dell'infezione è stato chiarito comparando il risultato dell'infezione di un virus VEGF deletato con un virus wild-type (Savory *et al.*, 2000). L'infezione con il virus ricombinante ha dato origine a lesioni macroscopicamente meno estese e con un decorso più breve del virus wild-type ed anche istologicamente, si è osservata una notevole riduzione dell'iperplasia dell'epidermide e della vascolarizzazione del derma. Queste osservazioni dimostrano che il VEGF codificato dall'orf virus in corso d'infezione svolge un ruolo centrale nella patogenesi delle

lesioni. Il ruolo del VEGF è stato ipotizzato anche nella patogenesi delle forme “maligne” di ectima contagioso, proprio per il loro aspetto altamente vascolarizzato e in alcuni casi simil-tumorale. Non è ancora chiaro se la causa di queste lesioni atipiche sia da ricondurre alla particolare virulenza esplicita da alcuni ceppi virali, o se invece si tratti di una serie di fattori concomitanti e predisponenti, quali stati infettivi o d’immunodeficienza (Guo et al., 2003; Smith et al., 2002). Sono riportati casi di ectima contagioso con aspetto proliferativo in soggetti che hanno riportato gravi traumi da ustione (Hooser *et al.*, 1989); inoltre diversi casi particolarmente esuberanti con lesioni buccali e podali vengono ricondotti all’azione traumatizzante di arbusti presenti nei pascoli (Acciarri, 1968). Recentemente è stato realizzato uno studio finalizzato a comparare l’attività angiogenetica *in vitro* di VEGF espressi da orf virus isolati da forme classiche e maligne, ma nessuna differenza è stata identificata, supportando l’ipotesi che il VEGF virale non sia coinvolto nel determinare le forme iperproliferative di ectima contagioso (Scagliarini et al., 2006).

Forme atipiche con aspetto proliferativo definite giant orf sono state descritte anche nell’uomo, particolarmente nei soggetti immunodepressi (Degraeve et al., 1999; Tan *et al.*, 1991; Hunskaar, 1986; Savage e Black, 1972), o in pazienti colpiti da dermatite atopica; ma anche in pazienti sani (Pether *et al.*, 1986; Gurel et al., 2002). Nell’uomo così come negli ovi-caprini, l’origine delle forme maligne di ectima rimane ancora da chiarire.

4.4 Sintomatologia

L’Ectima contagioso si manifesta con lesioni localizzate alla cute e alle mucose sia negli animali che nell’uomo. L’estensione delle lesioni è variabile, talvolta sono al limite della visibilità, mentre nelle forme maligne sono particolarmente estese e gravi.

Negli ovi-caprini la localizzazione delle lesioni è prevalentemente labiale ed interessa in particolare la giunzione muco-cutanea tra la cute perilabiale e la mucosa orale (Kummeneje e Krosgrud, 1979; Yeruham *et al.*, 1994), con un’estensione talvolta anche a carico delle narici (Gumbrell e McGregor, 1997). Le lesioni labiali e orali sono più frequenti negli agnelli (Figura 5A). Le dimensioni delle lesioni nella “forma labiale” sono in genere ridotte anche se, nelle forme maligne, possono confluire ed estendersi

fino ad interessare tutta la faccia. Una caratteristica delle lesioni perilabiali è la formazione di una crosta spessa, dovuta alle sollecitazioni meccaniche che provocano l'accumulo di sangue coagulato e di siero. Le lesioni a livello delle mucose, in particolare di quella orale, possono assumere un aspetto proliferativo a causa delle continue perdite di sostanza che portano ad un prolungamento dei processi riparativi e ad iperplasia epiteliale. Sono frequenti nelle femmine in lattazione le lesioni a livello mammario (Gilray *et al.*, 1998) (Figura 5B). Esse in genere iniziano dal capezzolo, in cui le microlesioni sono provocate dalla suzione da parte degli agnelli, e poi si estendono ai due quarti, fino a determinare la perdita di funzionalità temporanea oppure, nei casi più gravi, anche permanente, esitando in mastiti complicate da infezioni batteriche secondarie che a loro volta possono avere come ulteriore complicazione, la morte dell'animale per setticemia (Lewis, 1996).



A



B

Figura 5: Localizzazione delle lesioni a livello orale negli agnelli (A) e mammario nelle femmine (B).

La localizzazione delle lesioni al cercine coronario è piuttosto comune (Greig *et al.*, 1984) e comporta di solito un'alterazione dell'andatura con zoppicature più o meno evidenti, ciò avviene anche in funzione della complicazione batterica. Nella "forma podale" la lesione in genere origina dal cercine coronario e dagli spazi interdigitali, fino però a potersi estendere a tutto l'arto portando anche a decubito permanente. Le lesioni che interessano la cute perioculare e il padiglione auricolare sono meno frequenti e di solito sono conseguenti alla marchiatura; in seguito invece al taglio della coda, possono essere interessate dalle lesioni il piatto interno della coscia e la regione perineale (Housawi, 1991a; Abu Elzein e Housawi, 1997).

L'aspetto delle lesioni in corso di ectima contagioso è piuttosto costante. Le prime lesioni si rendono evidenti dopo un periodo d'incubazione di circa 3-4 giorni, e sono caratterizzate da arrossamento ed edema intorno al sito d'inoculazione; l'arrossamento tende ad aumentare d'intensità nelle successive 24 ore. Insieme all'iperemia e all'aumento di temperatura della parte, sulla cute in corrispondenza della scarificazione si formano delle papule che in 2-3 giorni lasciano il posto a delle vescicole. Le vescicole, evolvono in pustole in circa 24 ore e nei giorni successivi, le pustole possono ulcerare determinando la fuoriuscita dell'essudato purulento. In questo stadio a distanza di 6-7 giorni dall'infezione, si forma una crosta sulla superficie della lesione primaria, mentre alla periferia spesso si sviluppano lesioni secondarie che evolvono anch'esse attraverso gli stadi di eritema, papula, vescicola, pustola e crosta. La crosta inizialmente è sottile, poi si ispessisce per i fenomeni di rigenerazione dell'epidermide e di iperplasia del derma; in assenza di complicazioni batteriche, la crosta cade nel giro di 28-35 giorni lasciando scoperta la cute neoformata senza in genere lo sviluppo di una cicatrice. La risoluzione completa delle lesioni non complicate si esplica in 4-6 settimane, tuttavia nelle infezioni naturali le complicazioni batteriche sono piuttosto frequenti (*Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium pyogenes* e *Fusobacterium necrophorum*) (Robinson e Balassu, 1981).

Negli ovi-caprini l'aspetto clinico delle lesioni maligne è di tipo proliferativo, con tendenza spesso ad ulcerare determinando un abbondante sanguinamento (Smith et al., 2002; Di Marco et al., 2000; Zamri-Saad *et al.*, 1992; Gumbrell e McGregor, 1997; Mazur e Machado, 1989; Guo et al., 2003). Una particolarità delle forme atipiche è il maggiore coinvolgimento dei soggetti adulti rispetto agli agnelli e la tendenza a persistere senza andare incontro ad una spontanea risoluzione come nel caso delle forme classiche. Anche la localizzazione delle lesioni è insolita, infatti vengono interessati in alcuni focolai la mucosa della cavità buccale e della lingua (Figura A e B), e in altri la cute degli arti (C). Le lesioni sulla lingua, le gengive, la mucosa delle guance e del palato hanno l'aspetto di estese erosioni ulcerativo-necrotiche, accompagnate da imponente edema e cianosi della lingua, aspetto questo che impone una diagnosi differenziale con la Blue-Tongue e l'afta; inoltre spesso a queste lesioni si accompagnano edema delle labbra, del canale intermandibolare e della base

dell'orecchio, ed un'imponente rialzo termico (Di Marco *et al.*, 2000; Zamri-Saad *et al.*, 1992; Acciarri, 1968; Gardiner *et al.*, 1967). L'esito delle forme atipiche è condizionato dalla regressione o meno delle lesioni e dalle condizioni generali degli animali colpiti che spesso, poichè fortemente debilitati, vengono abbattuti.

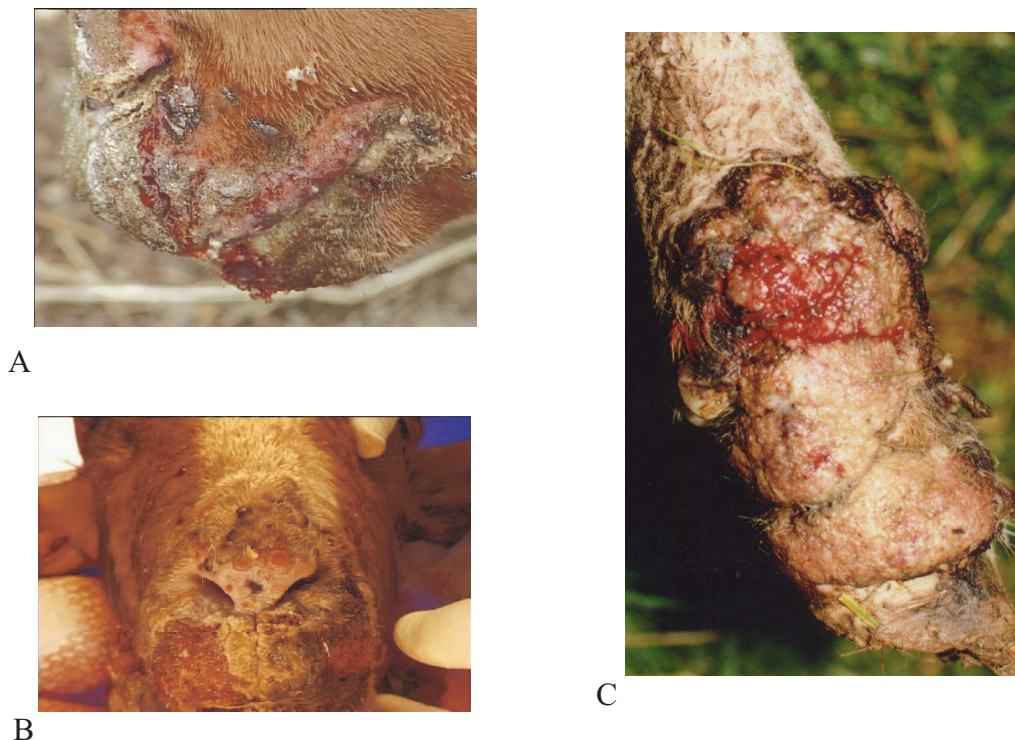


Figura 6: Lesioni proliferative con localizzazione al labbro superiore e inferiore e al naso (A e B), e a livello podale (C).

Nell'uomo le lesioni da orf virus si localizzano prevalentemente sulle parti scoperte, come le mani (Figura 6 A), gli avambracci, più raramente sono state documentate lesioni al tronco e nella regione perianale (Leavell *et al.*, 1968; Guibal *et al.*, 1996; Crumbie, 1998); non di rado sono state segnalate anche sul viso (Bodnar *et al.*, 1999).

La malattia ha generalmente un carattere benigno ed autolimitante e tende a guarire spontaneamente in 35-40 giorni senza lasciare alcun segno di cicatrice. La lesione è frequentemente unica e circoscritta, ma si possono sviluppare anche lesioni multiple; le dimensioni delle lesioni vanno da alcuni millimetri a poco più di un centimetro di diametro (Robinson e Ballasu, 1981).

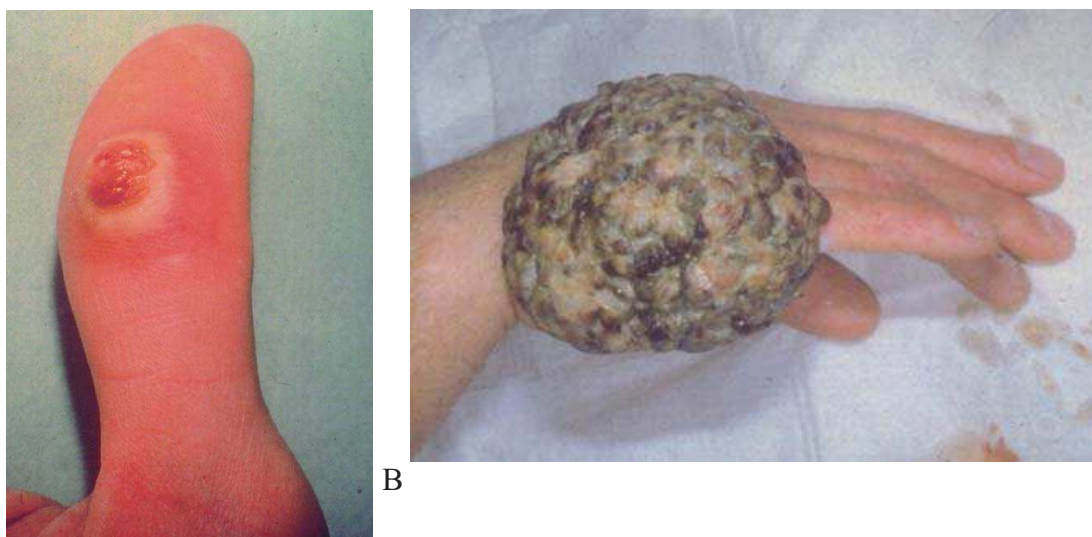
La progressione della malattia dal momento dell'infezione alla risoluzione viene suddivisa in sei stadi (Leavell *et al.*, 1968):

1. Stadio di macula e papula (1° - 7° giorno PI): macroscopicamente la lesione è una macula eritematosa rilevata, caratterizzata microscopicamente dalla vacuolizzazione delle cellule dello strato superficiale dell'epidermide.
2. Stadio target (7° - 14° giorno PI): il centro della lesione, di colore rosso, corrisponde microscopicamente a cellule con nucleo picnotico; intorno al centro rosso si forma un anello bianco composto da cellule epidermiche vacuolizzate e con corpi inclusi eosinofili intracitoplasmatici; alla periferia della lesione c'è un alone iperemico d'inflammatione.
3. Stadio acuto (14° - 21° giorno PI): la lesione è costituita da un nodulo con superficie ulcerata e con fenomeni di trasudazione; istologicamente in corrispondenza dell'area ulcerata c'è la perdita completa dell'epidermide, i follicoli piliferi appaiono dilatati e circondati da un'infiltrazione di cellule infiammatorie in tutto il derma.
4. Stadio rigenerativo (21° - 28° giorno PI): la lesione è asciutta, rivestita da una sottile crosta di colore giallo nel cui spessore ci sono piccoli punti neri riconducibili microscopicamente a cellule necrotiche con nucleo picnotico; cominciano i fenomeni di rigenerazione dell'epidermide.
5. Stadio papillomatoso (28° -35° giorno PI): il nodulo presenta sulla sua superficie dei rilievi papillomatosi che corrispondono istologicamente a fenomeni di proliferazione delle cellule epidermiche, con formazione di proiezioni digitiformi che si insinuano nel derma anch'esso notevolmente ispessito.
6. Stadio di regressione (35° giorno PI fino alla risoluzione): la cute riacquista il suo normale spessore ricoperta da una crosta secca e piatta. Prima della completa guarigione è possibile che si formino in successione due o tre croste.

Nonostante la maggior parte delle lesioni abbia un decorso come quello appena descritto, sono stati riportati numerosi casi complicati da eritema multiforme con papule arrossate diffuse su tutto il corpo: questa reazione compare di solito dopo una settimana dalla lesione primaria e persiste per 1-2 settimane (Mourtada *et al.*, 2000; Agger e Webster, 1983; Ferrando *et al.*, 1997). Un'altra complicazione descritta nell'uomo è un eritema diffuso con risentimento generale, febbre e linfadenopatia (Wilkinson, 1977). Diversi casi di penfingoide sono stati descritti nell'uomo a distanza di 2-3 settimane da

un'infezione con il virus orf: in questi casi all'infezione è seguita un'eruzione generalizzata su tutta la superficie corporea o limitata ad alcune sue parti, con vescicole tese ed emorragiche (Murphy e Ralfs, 1996). In Nuova Zelanda sono stati descritti diversi casi di Sindrome di Stevens-Johnson conseguenti all'infezione con l'orf virus (Hansen *et al.*, 1984). In un caso di ectima con lesione localizzata ad un dito, è stata segnalata la comparsa di parestesia e deformità del dito successivamente alla scomparsa delle lesioni (Uzel *et al.*, 2004).

Lesioni particolarmente gravi si osservano in pazienti colpiti da leucemia (Hunskaar, 1986) o da linfomi maligni (Savage e Black, 1972) o ancora in pazienti trapiantati e in corso di terapia anti-rigetto (Degraeve *et al.*, 1999; Geerinck *et al.*, 2001): in tutti questi casi è stato osservato il così detto "giant orf", una formazione simil-granulomatosa, anche di dimensioni cospicue, simile ad una massa tumorale pedunculata, facilmente sanguinante e ulcerabile (Figura 6 B). Un caso d'infezione atipica a carattere proliferativo e recidivante è stato osservato anche in un soggetto colpito dalla sindrome di Neozelof (Tan *et al.*, 1991), ma anche in un giovane o in un bambino non immunocompromessi e in condizioni normali di salute (Pether *et al.*, 1986; Gurel *et al.*, 2002).



A

B

Figura 7: L'immagine A rappresenta l'aspetto di una lesione semplice ad un dito, mentre in B è illustrato l'aspetto simil-tumorale di una lesione giant orf nell'uomo.

4.5 Diagnosi

La diagnosi clinica di ectima contagioso negli ovi-caprini in genere non presenta difficoltà essendo basata sull'osservazione delle tipiche lesioni con evoluzione attraverso gli stadi di eritema, papula, vescicola, pustola e crosta, ed avendo le lesioni una localizzazione caratteristica; inoltre ai fini della diagnosi clinica sono determinanti l'anamnesi individuale, ma anche collettiva del gregge.

La diagnosi differenziale deve essere effettuata nei confronti del vaiolo ovino, della blue tongue, dell'afte epizootica e della pedaina. Nel vaiolo ovino la comparsa delle eruzioni cutanee è sempre preceduta da un risentimento generale caratterizzato da febbre, irruminazione, anoressia, che non sono presenti in caso di ectima; nell'afte epizootica l'aspetto e l'evoluzione delle lesioni sono differenti dall'ectima, così anche come l'epidemiologia della malattia che è altamente diffusiva e con uno spettro d'ospite molto più ampio. La pedaina è da mettere in diagnosi differenziale con le forme podali di ectima, anche se l'aspetto delle lesioni è nettamente differente.

Maggiori difficoltà diagnostiche possono insorgere nel caso delle forme "maligne" di ectima, proprio per l'aspetto atipico delle lesioni. In questi casi, la diagnosi differenziale è soprattutto nei confronti della blue tongue che però ha in genere un quadro clinico più complesso ed un interessamento degli organi interni.

Talvolta negli animali con cute depigmentata, anche la dermatite da fotosensibilizzazione deve essere messa in diagnosi differenziale con l'ectima contagioso soprattutto in presenza di lesioni perilabiali e perioculari.

La conferma del sospetto clinico può essere ottenuta con l'ausilio della microscopia elettronica a contrasto negativo, prelevando le croste che presentano abbondanti quantità di particelle virali, riconoscibili per il loro caratteristico aspetto morfologico. L'isolamento virale può essere eseguito su diversi substrati cellulari, anche se in genere vengono utilizzate colture cellulari di origine ovina. Il tipico effetto citopatico, può non essere evidente ai primi passaggi in coltura, rendendo quindi necessario permettere al virus di adattarsi alla replicazione *in vitro*, attraverso diversi passaggi "ciechi". La ricerca di anticorpi anti-virus orf può essere eseguita a scopo epidemiologico, ma non ha valore da un punto di vista diagnostico. Tra le tecniche utilizzate, l'ELISA si è dimostrata la più idonea, per la sensibilità e la specificità nettamente più elevate rispetto ad altre tecniche come l'agar gel diffusione o la fissazione del complemento, riuscendo

a dimostrare la presenza di anticorpi nel siero già dopo 6 settimane dall'infezione (Housawi, 1992). La metodica con maggiore sensibilità e specificità è rappresentata dalla PCR sia di tipo qualitativo che quantitativo. La PCR qualitativa si avvale di una coppia di primers universale per tutti i *Parapoxvirus* (Inoshima *et al.*, 2000). Attualmente sono state messe a punto due PCR quantitative, una permette l'amplificazione di tutti i *Parapoxvirus* (Nitsche *et al.*, 2006), l'altra invece è finalizzata all'amplificazione del DNA del virus orf (Gallina *et al.*, 2006).

Nell'uomo il sospetto diagnostico di ectima contagioso può essere formulato in base all'aspetto delle lesioni e all'anamnesi quando essa fornisce l'indicazione di un contatto con animali infetti. Nelle forme giant orf la sola diagnosi clinica è più difficile e si rendono necessarie indagini collaterali, come l'esame istopatologico dopo prelievo biotico, oppure anche il ricorso alla microscopia elettronica (Scagliarini *et al.*, 2001).

La diagnosi differenziale nell'uomo deve innanzitutto prendere in considerazione altre infezioni da *Parapoxvirus* come quella da pseudocowpox virus, in cui l'aspetto clinico è sovrapponibile, perciò l'anamnesi ed un eventuale esame istopatologico servono a chiarire i dubbi diagnostici (Scagliarini *et al.*, 2001). In diagnosi differenziale vengono inoltre considerate la tubercolosi vegetante e verrucosa, la sporotricosi, la piodermite, il granuloma piogenico, il carbonchio (Scagliarini *et al.*, 2001).

4.6 Profilassi

Nella prevenzione dell'ectima contagioso è molto importante impostare un'efficace profilassi diretta, volta ad impedire l'ingresso del virus in un allevamento indenne. Il controllo deve essere soprattutto nei confronti degli animali di nuova introduzione, che sono la principale causa della diffusione del virus negli allevamenti indenni. Occorre quindi ispezionare scrupolosamente gli animali per evidenziare lesioni che, anche se vaccinali, sono in grado di diffondere il virus nell'ambiente. Gli animali di nuova introduzione devono comunque essere tenuti separati dagli altri dell'allevamento per un periodo di tempo superiore a quello di latenza, che varia dalle 48 alle 120 ore (Hussain e Burger, 1989), e durante tutto questo periodo devono essere costantemente ispezionati per evidenziare lo sviluppo di eventuali lesioni sulla cute. Non è comunque infrequente

anche la presenza di portatori asintomatici dell'infezione, che rappresentano il maggiore rischio di diffusione del virus in un nuovo allevamento (Lewis, 1996).

I locali utilizzati da greggi diversi devono essere sempre disinfettati con prodotti alcalini, come la creolina al 5% e il permanganato di potassio al 1% che sono entrambi in grado di inattivare il virus.

Molto più difficile è il controllo degli animali allevati in modo estensivo, soprattutto quando il pascolo viene frequentato da greggi diversi, poichè il risanamento ambientale è impraticabile data l'elevata resistenza del virus nell'ambiente.

Nell'uomo la profilassi dell'infezione è legata al controllo della diffusione della malattia negli animali, ma anche ad interventi di disinfezione degli ambienti e degli oggetti contaminati, nonché ad una corretta informazione dei soggetti a rischio di esposizione (pastori, macellatori, casalinghe, etc.). Il personale che viene a contatto con animali malati o con oggetti contaminati, deve proteggersi mani e braccia durante lo svolgimento delle mansioni lavorative (Scagliarini *et al.*, 2001).

Nonostante la diffusione e l'elevata incidenza dell'infezione da orf virus, non è ancora disponibile alcun vaccino in grado di proteggere gli animali completamente. La malattia viene ancora oggi controllata mediante scarificazione cutanea con virus vivo virulento derivato dalle croste di animali infetti; questa tecnica vaccinale non protegge completamente gli animali, può favorire l'insorgenza di altre infezioni, ad esempio da Pestivirus, favorisce anche la disseminazione del virus nell'ambiente attraverso le croste che si formano nell'evoluzione della lesione.

I vaccini vivi attenuati in coltura cellulare sono in grado di proteggere gli agnelli in seguito a challenge per un periodo di sei mesi (Nettleton *et al.*, 1996), una immunità che è analoga a quella prodotta in seguito ad infezione naturale (Lewis, 1996). Il problema è riconducibile alla capacità del virus di eludere la risposta immunitaria dell'ospite grazie ai fattori di virulenza (IL-10 virale, OVINFR cioè un fattore di virulenza che inibisce la risposta innata antivirale promossa dall'interferone, il GIF cioè il fattore che inibisce il GMCSF e l'IL-2 citochine dell'infiammazione), ma anche alla difficoltà di riuscire ad immunizzare i giovani animali del gregge prima che contraggano l'infezione naturale sul campo.

L'obiettivo è quello di produrre dei vaccini efficaci per una prevenzione completa e duratura dell'infezione nei soggetti recettivi, impedendo la diffusione del virus ed anche, in modo ancor più marcato, lo sviluppo delle lesioni post-vaccinali. Le possibili formulazioni vaccinali includono i vaccini a subunità, i vaccini deleti, oppure i vettori virali in grado di esprimere appropriati antigeni del virus orf (Mercer *et al.*, 1997b). L'identificazione di antigeni virali ad azione immunostimolante, come alcuni dei componenti dell'envelope, fornisce importanti spunti per la messa a punto di vaccini a subunità (Bütner e Rziha, 2002), poiché alti titoli anticorpali potrebbero essere in grado di raggiungere il sito d'infezione abbastanza rapidamente per minimizzare la replicazione virale (Haig e Mercer, 1998). L'immunogenicità della proteina F1L dell'orf virus è stata recentemente valutata per un suo possibile utilizzo come subunità vaccinale: i risultati hanno mostrato una riduzione della durata dell'infezione, e una diminuzione della carica virale nelle croste (Gallina *et al.*, 2004).

Un approccio alternativo è quello di clonare porzioni genomiche specifiche del virus orf utilizzando il vaccinia virus come vettore, pur non esistendo alcuna evidenza di cross-protezione tra i due virus (Mercer *et al.*, 1994). L'utilizzo del vaccinia in via sperimentale in grado di esprimere l'intero panel genico dell'orf virus, ha già portato ad ottenere un significativo grado di protezione negli agnelli in seguito a challenge (Mercer *et al.*, 1997a e b).

4.7 Terapia

Le lesioni che si sviluppano in caso di ectima contagioso, sono nella maggior parte dei casi autolimitanti e tendono ad una guarigione spontanea che si realizza in 3-4 settimane.

Negli animali una copertura antibiotica per via sistemica può rendersi necessaria per evitare infezioni batteriche secondarie (Greig *et al.*, 1984). In caso di grave deperimento fisico, specie negli agnelli, è necessario fornire alimenti liquidi e ad alto contenuto energetico in grado di supplire allo stato carenziale senza danneggiare ulteriormente la mucosa orale (Gumbrell e McGregor, 1997). Una terapia sintomatica diretta ad alleviare l'infiammazione e l'insorgenza di complicazioni batteriche può essere attuata mediante l'applicazione del violetto di genziana e la tintura di iodio (Robinson e

Balassu, 1981). Per il cavo orale può essere utilizzata tintura di iodio e glicerina, mentre per le lesioni podali può essere utile il dipping con soluzioni disinfettanti.

Nell'uomo generalmente non è necessario alcun trattamento terapeutico se non la disinfezione locale e la terapia antibiotica sistemica per la prevenzione delle infezioni batteriche secondarie. Nelle forme gravi, estese e progressive, in cui la risoluzione non avviene spontaneamente, sono state utilizzate in passato delle applicazioni locali di soluzioni di idossiridina al 40% in DMSO (Hunksaar, 1984 e 1986), delle pomate al nitrato ammoniacale d'argento (Scagliarini *et al.*, 2001), delle iniezioni di INF- α (Tan *et al.*, 1991), oppure in alcuni casi si è ricorsi alla crioterapia (Degraeve *et al.*, 1999). In letteratura sono però riportati esempi di recidive in seguito ad un primo trattamento con la crioterapia o con l'INF- α al quale sono seguiti l'asportazione chirurgica della lesione o nel peggiore dei casi dell'intera parte anatomica in cui la lesione si era sviluppata (Tan *et al.*, 1991; Savage e Blank, 1972). L'uso di creme a base di cortisonici nel corso di un'infezione da orf virus complicata da dermatite atopica ha causato la disseminazione delle lesioni virali (Duprè *et al.*, 1981).

Recentemente è stata dimostrata la sensibilità *in vitro* dell'orf virus e dello pseudocowpox virus al cidofovir (Nettleton *et al.*, 2000). Inoltre, una pomata all'1% di cidofovir è stata utilizzata con successo nella terapia di una forma giant orf sviluppatasi in un paziente trapiantato, in cui la regressione completa della lesione in un dito, ne ha evitato l'amputazione (Geerinck *et al.*, 2001). Questo rappresenta il primo esempio dell'applicazione di una specifica terapia antivirale, a partire dalla quale sono stati realizzati degli studi di efficacia del cidofovir crema in agnelli infettati sperimentalmente con il virus orf. Anche queste ricerche hanno evidenziato la potenzialità terapeutica in vivo del cidofovir nei confronti del virus orf (Scagliarini *et al.*, 2006).

C. PARAMYXOVIRUS

1. Classificazione dei paramyxovirus

La famiglia *Paramyxoviridae* è suddivisa in due sottofamiglie, *Pneumovirinae*, con due generi virali e *Paramyxovirinae*, con cinque generi (Tabella 1). Caratteristiche comuni ai virus di questa famiglia sono: A) la presenza di envelope con proiezioni rappresentate da proteine non strutturali chiamate F (è una proteina di fusione), e G (*Pneumovirus*), o H (*Morbillivirus*), o HN (*Paramyxovirus*) (è una proteina di attacco con funzione emoagglutinante ad eccezione dei *Pneumovirus*). B) la presenza di un nucleocapside a simmetria elicoidale. C) il genoma costituito da una molecola lineare di RNA a polarità negativa. D) l'aspetto sferico o pleomorfico dei virioni con dimensioni che variano da 150 a 200 nm di diametro e da 1000 a 10000 nm di lunghezza.

L'organizzazione genomica (con la suddivisione del genoma da sei a dieci open reading frames), l'aspetto antigenico ed anche le caratteristiche biologiche sono alla base della suddivisione in generi. Nel 2002 il numero dei generi tra i *Paramyxovirinae* è aumentato da tre a cinque per l'aggiunta degli *Avulavirus* e degli *Henipavirus*, che raggruppano rispettivamente i paramyxovirus degli uccelli e i due virus emergenti Hendra e Neph virus (ICTVdB The Universal Virus Database, version 4 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>).

TABELLA 1

Famiglia	Sottofamiglia	Genere	Specie virale prototipo
Paramyxoviridae	Paramyxovirinae	<u>Respirovirus</u>	<i>Sendai virus</i> (SeV)
		<u>Morbillivirus</u>	<i>Measles virus</i> (MeV)
		<u>Rubulavirus</u>	<i>Mumps virus</i> (MuV)
		<u>Henipavirus</u>	<i>Hendra virus</i> (HeV)
		<u>Avulavirus</u>	<i>Newcastle disease virus</i> (NDV)
	Pneumovirinae	<u>Pneumovirus</u>	<i>Human respiratory syncytial virus</i> (HRSV)
		<u>Metapneumovirus</u>	<i>Avian metapneumovirus</i> (AMPV)

Nell'ambito dei *Paramyxoviridae*, gli *Henipavirus* sono gli unici agenti di zoonosi. Sono inoltre caratterizzati dal più ampio host-range che include i chiroteri, i roditori, gli artiodattili, gli ungulati e i primati. L'Hendra virus (HeV) e il Nipha virus (NiV) sono emersi improvvisamente come virus altamente patogeni non solo per l'uomo ma anche per altri mammiferi e, per entrambi, alcune specie di chiroteri sono state identificate come il serbatoio del virus nell'ambiente (Eaton et al., 2005). A partire dal 1994 in cui è comparso per la prima volta l'HeV, si sono registrati tre outbreaks con il coinvolgimento di quattro persone e la morte di due di questi. Nel caso del NiV, negli ultimi sette anni sono state descritte ben quattro epidemie con centinaia di casi umani, un dato che indica la maggiore trasmissibilità del virus all'uomo (Bossart e Broder, 2006).

2. **Morbillivirus: patogeni per l'uomo e per gli animali**

Il genere *Morbillivirus* include virus con un elevato impatto sulla salute dell'uomo e degli animali terrestri ed acquatici.

TABELLA 2

Genere	Specie virale	Ospiti
<u>Morbillivirus</u>	<i>Canine distemper virus</i> (CDV)	Carnivori domestici e selvatici
	<i>Cetacean morbillivirus</i> (CeMV)	Cetacei
	<i>Measles virus</i> (MeV)	Primati non umani e uomo
	<i>Peste des petits ruminants virus</i> (PPRV)	Piccoli ruminanti domestici e selvatici
	<i>Phocine distemper virus</i> (PDV)	Pinnipedi
	<i>Rinderpest virus</i> (RPV)	Ruminanti domestici e selvatici

Sino al 1988 erano note solo quattro specie virali nell'ambito di questo genere, tutte responsabili d'infezione nei mammiferi terrestri. A seguito di gravi epidemie nei pinnipedi e nei cetacei, sono state identificate però due nuove specie virali che affliggono la popolazione dei mammiferi marini (Di Guardo et al., 2005). Il cetacean morbillivirus (CeMV) è una specie che include sia una variante in grado di infettare la focena, e in un primo momento indicata come "porpoise morbillivirus" (PMV), che un'altra in grado d'infettare il delfino e indicata come "dolphin morbillivirus" (DMV). Attualmente le due varianti sono classificate e riconosciute come un'unica specie virale (Di Guardo et al., 2005). Il phocine distemper virus (PDV) è una nuova specie virale

responsabile di gravi epidemie con elevata mortalità tra le foche (Di Guardo et al., 2005). L'analisi filogenetica condotta sulla base dei geni codificanti per le proteine strutturali e non, ha permesso di chiarire l'origine dei morbillivirus marini. Il PDV è altamente correlato al canine distemper virus (CDV) e quindi probabilmente da esso ne deriva, anche in considerazione del fatto che il CDV è stato identificato come la causa di epidemie tra foche nel mare Baikal e nel mar Caspio (Di Guardo et al., 2005). Il CeMV invece, è filogeneticamente correlato ai morbillivirus dei ruminanti (RPV e PPRV) e deriverebbe da un comune virus ancestrale (Di Guardo et al., 2005; Barret, 1999). L'emergenza del PDV e del CeMV sarebbe da amputare a cambiamenti nella biologia dei corrispettivi mammiferi marini e al contatto di popolazioni morbillivirus-free con animali serbatoio (Di Guardo et al., 2005; Barret, 1999).

Nonostante l'origine comune dei morbillivirus, nessuno dei patogeni animali ha fino ad ora dimostrato chiaramente di essere responsabile di zoonosi. Solo nel caso del virus del cimurro (CDV), esistono delle speculazioni su un suo coinvolgimento in patologie dell'uomo quali la sclerosi multipla e la malattia di Paget. Il ruolo del CDV è stato inizialmente proposto sulla base di evidenze epidemiologiche che riconoscevano una maggiore incidenza di queste patologie al nord dell'equatore, dove cioè esiste anche una maggiore diffusione del virus del cimurro (Chan, 1977). Le indagini di laboratorio non hanno ancora chiarito, a causa di risultati discordanti, l'esistenza di una reale partecipazione del virus del cimurro nella patogenesi di queste due malattie dell'uomo (Rima e Duprex, 2006).

Il virus del morbillo (MeV) causa un'infezione caratterizzata da un'elevata mortalità infantile nei Paesi in via di sviluppo, dove probabilmente hanno un ruolo determinante la mancanza di un programma vaccinale, la concomitanza di altre patologie, tra cui quelle da malnutrizione, e la presenza di ceppi virali a maggiore patogenicità (Rima e Duprex, 2006). Il virus del morbillo riconosce l'uomo come unico serbatoio, ma l'infezione può essere trasmessa dall'uomo ai primati non umani, rappresentando per queste specie animali un rischio per la loro sopravvivenza (Jones-Engel et al., 2006). Il morbillo è caratterizzato dalla comparsa di un'esantema cutaneo diffuso, accompagnato da tosse secca, febbre, congiuntivite e fotofobia. Come tutti i morbillivirus, causa immunodepressione predisponendo il paziente ad infezioni opportunistiche (Rima e Duprex, 2006). Nell'ambito dell'infezione acuta, i pazienti immunocompromessi

possono andare incontro a polmonite interstiziale che ha spesso un esito letale. Il morbillo può inoltre essere accompagnato da altre complicazioni, tra cui cheratite e cecità, otite media e perdita dell'udito, trombocitopenia, ma soprattutto complicazioni a carico del sistema nervoso centrale (SNC). Tra queste si riconoscono tre diversi scenari, l'encefalomielite acuta demielinizzante (ADEM), l'encefalite a corpi inclusi (MIBE) e la panencefalite subacuta sclerosante (SSPE). ADEM è una forma di encefalomielite acuta che insorge nei bambini 5-6 giorni dopo la comparsa dell'esantema cutaneo, ed è caratterizzata dall'assenza del virus nel SNC e dalla presenza di lesioni probabilmente indotte da reazioni auto-immunitarie (Rima e Duprex, 2006). La MIBE si verifica tipicamente in pazienti immunocompromessi, a distanza di 2-6 mesi dall'esantema cutaneo ed è probabilmente causata dalla persistenza del virus nel SNC più che da una successiva reinfezione (Rima e Duprex, 2006). La SSPE è una complicazione molto rara (1:10000-1:25000) e si manifesta a distanza di anni dall'infezione acuta. Clinicamente è caratterizzata da un'iniziale alterazione della personalità, seguita dalla comparsa di movimenti mioclonici, e da progressivi disturbi mentali e motori, con la morte del paziente in 2-3 anni. Anche questa sindrome è accompagnata dalla persistenza del virus nel SNC e dalla presenza di alti titoli anticorpali sia nel siero che nel liquido cefalo-rachidiano. Da un punto di vista anatomico-patologico si caratterizza per la presenza di demielinizzazione ed infezione dei neuroni con comparsa di corpi inclusi citoplasmatici e nucleari. Successivamente anche le cellule della glia, gli astrociti e le cellule endoteliali vanno incontro ad infezione. Sia in caso di MIBE che di SSPE, la caratterizzazione molecolare dei ceppi virali ha evidenziato mutazioni geniche a carico delle proteine strutturali come la M, la F e la H, mentre ha rilevato la conservazione delle proteine funzionali come la N, la P e la L. In questo modo il virus del morbillo conserverebbe un'efficiente replicazione virale e sarebbe in grado di diffondere da una cellula all'altra con un particolare meccanismo che ne assicura il mantenimento dello stato di persistenza (Rima e Duprex, 2006).

3. Terapia delle infezioni da morbillivirus

La strategia più comunemente utilizzata per contrastare la diffusione dei *Morbillivirus*, sia animali che umani, è il ricorso alla vaccinazione. Ad esempio, la vaccinazione dei bovini ha permesso l'eradicazione della peste bovina dal territorio africano, con

l'eccezione di alcune regioni in Somalia e in Congo (http://www.oie.int/eng/maladies/fiches/a_a040.htm). Anche nei confronti della peste dei piccoli ruminanti, la vaccinazione rappresenta il mezzo di controllo dell'infezione che però è tutt'ora ancora presente in Africa, nella penisola araba, nel Medio Oriente e in India. Anche nei confronti del morbillo, la vaccinazione su scala mondiale rappresenta la misura di profilassi applicata ai fini dell'eradicazione. Ci sono però diverse condizioni, sia nei Paesi sviluppati che non, che comportano un calo del livello di immunizzazione ed un conseguente aumento dell'esposizione della popolazione all'infezione (Hinman, 1999). La presenza di una terapia antivirale efficace nei confronti del virus del morbillo rappresenterebbe un'alternativa al calo dell'immunità da un lato, ma anche una risposta all'infezione, nel caso delle forme acute complicate e delle forme croniche di morbillo (Barnard, 2004). Attualmente non ci sono antivirali approvati per un utilizzo terapeutico nei confronti di questo e di altri *Morbillivirus*, ma numerose molecole sia di sintesi che naturali sono oggetto di studio per la loro attività antivirale.

3.1 Composti di sintesi

3.1.1 Analoghi nucleosidici

Nell'ambito di questo gruppo di molecole diversi composti sono stati testati nei confronti del virus del morbillo e più in generale dei paramyxovirus. Tra i derivati guanosinici la ribavirina e l'EICAR sono le molecole più ampiamente studiate. La 1-(β -D-ribofuranosil)-1,2,4-triazole-3-carboxamide Ribavirina (RBV) è un analogo guanosinico con ampio spettro d'azione sia nei confronti dei virus a DNA che a RNA (Allen et al., 1978; Smeets et al., 2001; De Clercq et al., 1991; Shigeta et al., 1992; Leyssen et al., 2005).

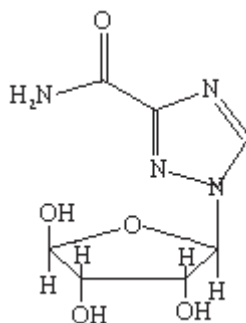


Figura 1: molecola della RBV

L'efficacia *in vitro* della RBV è stata valutata nei confronti del virus del morbillo e di altri paramyxovirus, come il virus respiratorio sinciziale, il virus della parainfluenza, l'Hendra e il Nipah virus (Shigeta et al., 1992; Wright et al., 2005; Georges-Courbot et al., 2006). L'attività antivirale della RBV nei confronti del virus del morbillo è stata valutata anche *in vivo* in alcuni modelli animali tra cui prevalentemente ratti (Wyde et al., 2000) e cavie (Honda et al., 1994; Ishii et al., 1996). In queste sperimentazioni *in vivo*, è stata valutata l'efficacia della RBV sia nel corso dell'infezione acuta, che nel corso di SSPE. Inoltre ne è stata valutata l'efficacia in funzione della via di somministrazione utilizzata: ad esempio l'aerosol è risultato efficace nei confronti della polmonite da morbillo (Wyde et al., 2000), mentre, nelle forme di SSPE, la somministrazione intracranica, ma non quella intraperitoneale, ha indotto un aumento della sopravvivenza dei criceti infetti (Honda et al., 1994; Ishii et al., 1996).

Sulla base della disponibilità della RBV in commercio, della sua efficacia *in vitro* e in modelli animali, questa molecola è stata più volte utilizzata anche nel corso di casi clinici di morbillo nell'uomo con risultati però discordanti. La RBV somministrata per aerosol e per via endovenosa è stata efficace nella terapia di una forma di polmonite sviluppatasi in un bambino immunodepresso (Gururangan et al., 1990), e anche in diverse forme di polmonite in adulti, dopo somministrazione endovenosa (Forni et al., 1994). L'efficacia della RBV è stata inoltre valutata nel corso di SSPE. L'efficacia del trattamento con RBV somministrata per via intraventricolare in combinazione con INF- α è stata osservata in diversi casi clinici. Dapprima in 2 pazienti affetti da SSPE, in cui sono stati osservati miglioramenti clinici e diminuzione dei titoli anticorpali nel siero e nel liquido cefalo-rachidiano, accompagnati da anemia transitoria (Tomoda et al., 2001). Lo stesso protocollo terapeutico, è stato seguito successivamente in altri 5 pazienti affetti da SSPE, dei quali uno solo non ha mostrato miglioramenti clinici, bensì una progressione della malattia (Hosoya et al., 2001 e 2004). Analogamente al primo esperimento, anche in questo caso gli effetti collaterali legati all'uso della RBV come anemia, mal di testa, rigonfiamento di labbra e gengive e inappetenza, sono stati limitati e transitori (Hosoya et al., 2004). La sicurezza e la buona tollerabilità della RBV somministrata per via intraventricolare in combinazione con INF- α , sono state osservate anche in una sperimentazione con 10 pazienti affetti da SSPE (Tomoda et al., 2003). Di questi pazienti, tutti hanno mostrato miglioramenti nel decorso clinico della malattia. Al

contrario, risultati negativi della terapia combinata RBV e INF sono stati descritti da Hara et al. in cui l'insuccesso terapeutico sarebbe da attribuire ad un dosaggio troppo basso di RBV (Hara et al., 2003). In altri due casi di SSPE alcuni autori hanno ricondotto l'inefficacia della terapia con RBV e INF, alla rapida progressione della malattia.

Il 5-etinil-1-β-D-ribofuranosilimidazolo-4-carboxamide (EICAR) è un analogo della RBV in seguito alla sostituzione di un N in posizione 2 dell'anello triazolico con un gruppo C-C≡CH. Lo spettro d'azione dell'EICAR è quindi molto simile a quello della RBV e comprende virus a DNA, tra cui i poxvirus, e a RNA, tra cui orthomyxo-, rhabdo-, reo-, flavivirus (De Clercq et al., 1991; Shigeta et al., 1992; Leyssen et al., 2005).

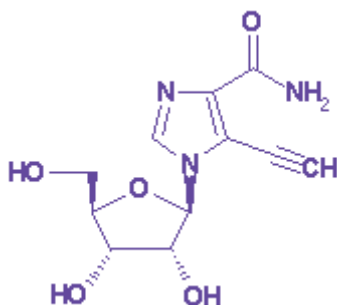


Figura 2: molecola dell'EICAR

La sua efficacia *in vitro* è stata valutata nei confronti di diversi paramyxovirus, tra cui il virus del morbillo, nei confronti di ceppi vaccinali e di isolati clinici di SSPE, il virus della parainfluenza, il virus respiratorio sinciziale, il mumps virus, il Nipah virus (De Clercq et al., 1991; Shigeta et al., 1992; Leyssen et al., 2005; Georges-Courbot et al., 2006). L'attività dell'EICAR nei confronti del virus del morbillo *in vitro* è circa 10-20 volte maggiore, a seconda del tipo cellulare utilizzato, rispetto a quella della RBV (De Clercq et al., 1991; Wyde et al., 2000). In cellule VERO, la IC₅₀ della RBV nei confronti del morbillo è di 8 µg/ml mentre quella dell'EICAR è di 0.5 µg/ml. L'attività antivirale dell'EICAR nei confronti del virus del morbillo è stata valutata in modelli animali *in vivo*. Anche in questa sperimentazione è stata confermata la maggiore potenza dell'EICAR rispetto alla RBV nel ridurre i titoli virali a livello polmonare nei ratti infettati con il virus del morbillo (Wyde et al., 2000).

3.1.1.1 Meccanismo d'azione della ribavirina

La RBV è una molecola con meccanismo d'azione pleiotropico. Essa agisce in forma fosforilata, come ribavirina 5'-monofosfato (RMP), ribavirina 5'-difosfato e ribavirina 5'-trifosfato (RTP). Le fosforilazioni avvengono in sequenza ad opera di chinasi cellulari. Ad oggi, sono stati proposti 5 diversi meccanismi d'azione:

- (1) La RMP inibisce l'enzima cellulare inosina monofosfato deidrogenasi (IMPDH). Questo blocco è di tipo competitivo in quanto la RMP, grazie ad una struttura simile all'acido inosinico IMP, si sostituisce ad esso interferendo nella conversione ad acido xantidilico XMP, il quale a sua volta non è disponibile nella via metabolica che porta alla sintesi dei nucleotidi mono-, di-, e trifosfato purinici. La conseguenza del blocco dell'IMPDH da parte della RMP è la diminuzione intracellulare del pool di nucleotidi purinici, essenziali per la sintesi degli acidi nucleici. Il blocco di questa via metabolica comporta sia l'inibizione della crescita virale, ma anche l'interferenza con il normale metabolismo cellulare (Streeter et al., 1977). Trattandosi di un meccanismo d'azione aspecifico, l'inibizione dell'IMPDH potrebbe spiegare l'ampio spettro d'azione della RBV. Il blocco dell'IMPDH è stato riconosciuto come il principale meccanismo d'azione della RBV nei confronti dei flavivirus e dei paramyxovirus (Leyssen et al., 2005).
- (2) La RTP inibisce gli enzimi guanililtransferasi e mRNA-metiltransferasi che sono entrambi coinvolti nel meccanismo di 5'-capping dell'mRNA cellulare e dell'mRNA virale. In questo modo la RTP inibisce la trascrizione di quei virus che hanno all'estremità 5' una struttura chiamata cappuccio e che si forma per l'aggiunta di una guanina ad opera dell'enzima guanililtransferasi e per la successiva metilazione ad opera dell'mRNA-metiltransferasi (Goswami et al., 1979). Questo meccanismo è stato proposto per il vaccinia virus e per il Dengue virus (Benarroch et al., 2004).
- (3) Tutti e tre i metaboliti fosforilati della RBV si sono dimostrati diretti inibitori dell'enzima RNA polimerasi (Patterson et al., 1990). Questo

meccanismo d'azione è stato dimostrato per alcuni virus a RNA, come il virus dell'epatite C (Maag et al., 2001), il virus dell'influenza (Eriksson et al., 1977), il virus HIV (Fernandez-Larsson et al., 1990).

- (4) La RTP agisce come agente mutageno in seguito alla sua incorporazione nel genoma virale. In particolare la RTP si può sostituire sia alla guanosina che all'adenosina, andando ad appaiarsi con la citidina e la timidina o l'uridina. La conseguente formazione di legami a idrogeno tra la RTP e la base pirimidinica, comporta errori della replicazione del genoma virale e conseguente diminuzione della crescita virale. Questo meccanismo d'azione è stato inizialmente scoperto nei confronti del poliovirus (Crotty et al., 2001), ed è stato successivamente osservato anche nei confronti del virus dell'afta e del virus della West Nile Fever (Graci e Cameron, 2006).
- (5) La RBV ha dimostrato anche proprietà immunomodulatorie, in particolare per la capacità di aumentare la risposta immunitaria antivirale e l'espressione di geni che aumentano la produzione di INF (Fang et al., 2000; Zhang Y et al., 2003).

L'attività antivirale dell'EICAR è stata anch'essa ricondotta principalmente all'inibizione dell'enzima IMPDH cellulare (De Clercq et al., 1991). Per entrambe le molecole all'aggiunta di guanosina al terreno di coltura cellulare, si ottiene un'inversione del loro effetto antivirale, a dimostrazione del fatto che, alla base della loro attività antivirale, c'è la deplezione del pool intracellulare di nucleotidi purinici ed in particolare di GMP, GDP e GTP (De Clercq et al., 1991, Leyssen et al., 2005). Questi risultati sperimentali però non escludono la possibilità che la RBV e l'EICAR non possano anche agire contemporaneamente con altri meccanismi d'azione quali l'inibizione del capping dell'mRNA virale o l'inibizione dell'RNA polimerasi (De Clercq et al., 1991).

Le prove antivirali *in vitro* hanno evidenziato che la RBV e l'EICAR hanno attività antivirale cellulo-dipendente, cioè essa può aumentare o diminuire in funzione del tipo cellulare utilizzato per la crescita del virus in coltura (De Clercq et al., 1991). Questa caratteristica è dovuta alle diverse capacità metaboliche delle cellule e quindi

all'efficienza con cui la RBV e l'EICAR vengono trasformate nella forma fosforilata farmacologicamente attiva.

Una caratteristica della RBV è la citotossicità che si manifesta in particolare nei confronti di cellule in replicazione e in minor misura verso cellule stazionarie o che abbiano raggiunto la confluenza in coltura (De Clercq et al., 1991). L'attività citostatica della RBV può essere ricondotta all'interferenza con il metabolismo cellulare per effetto dell'inibizione dell'enzima IMPDH, e all'inibizione del meccanismo di capping. La quantificazione della sintesi del DNA ed RNA cellulare in presenza di RBV, ha mostrato una riduzione della sintesi degli acidi nucleici (De Clercq et al., 1991; Leyssen et al., 2005). Anche l'EICAR esercita un effetto antiproliferativo, che anzi è superiore a quello misurato per la RBV (De Clercq et al., 1991; Leyssen et al., 2005). La maggiore attività come antivirale associata però ad una maggiore attività citostatica, riducono la selettività dell'EICAR in confronto alla RBV (De Clercq et al., 1991).

Al fine di ridurre la tossicità cellulare della RBV, sono state adottate diverse soluzioni, tra cui la formazioni di complessi con i liposomi (Kende et al., 1985), con le ciclodestrine (Grancher et al., 2004) o con "chemical delivery systems" (CDS) (Prokai et al., 2000). Recentemente l'efficacia *in vitro* della RBV nei confronti del virus del morbillo è stata valutata anche dopo formazione di complessi chimici con le ciclodestrine cioè dei composti ciclici oligosaccaridici aventi un core centrale idrofobico e una superficie esterna idrofilica: nell'ambito di questi complessi, la potenza della RBV è aumentata per via del migliore assorbimento della molecola attraverso la membrana cellulare (Grancher et al., 2004).

3.1.2 RNA interference

La tecnica dell'RNA interference (RNAi) è stata utilizzata nei confronti di diversi paramyxovirus, tra cui il virus respiratorio sinciziale, quello della parainfluenza e recentemente anche verso il virus del morbillo (Otaki et al., 2006; Reuter et al., 2006). In particolare Reuter e colleghi hanno sviluppato RNAi verso i 6 geni contenuti nel genoma del virus del morbillo, ed hanno osservato l'efficacia di multipli siRNA. Un'efficiente diminuzione dell'espressione virale è stata ottenuta con siRNA verso le proteine N, P ed L che insieme formano il complesso replicativo del virus. siRNA verso le proteine H e F hanno ridotto la diffusione virale da cellula a cellula, mentre siRNA

verso la proteina M ha indotto sia un aumento della trascrizione virale che un'aumento della diffusione del virus per fusione cellulare. Questi risultati sottolineano la potenzialità dell'RNAi da un lato come strumento antivirale nei confronti di alcuni geni del virus del morbillo, e dall'altro per indagare la funzione di alcune proteine virali (come la M) senza il ricorso a virus knock-out.

3.1.3 Inibitori dell'ingresso virale

La strategia basata sull'inibizione dell'ingresso virale è già stata utilizzata *in vitro* nei confronti di diversi paramyxovirus, tra cui il virus della parainfluenza, il virus respiratorio sinciziale, il Sendai virus e anche il virus del morbillo (Lambert et al., 1996). In particolare sono stati utilizzati piccoli peptidi in grado di interferire con il processo di fusione e con la formazione di sincizi in coltura (Lambert et al., 1996). Recentemente, sono state sintetizzate e testate *in vitro* anche molecole non peptidiche che hanno il vantaggio di una migliore solubilità e stabilità, con il conseguente vantaggio di potere essere facilmente somministrate per aerosol o per via orale (Plempner et al., 2005).

3.2 Composti naturali

Una grande varietà di prodotti naturali sono stati testati *in vitro* nei confronti dei paramyxovirus e del virus del morbillo in particolare. Tra questi composti vi sono piante della tradizione medicinale cinese e giapponese, bioflavonoidi estratti da piante medicinali, e proantocianidine (Barnard, 2004).

4. Virus del cimurro

4.1 Eziologia: aspetti generali

Il cimurro del cane è un virus con aspetto pleomorfico e al ME presenta di solito forma sferica o filamentosa (Figura 3).

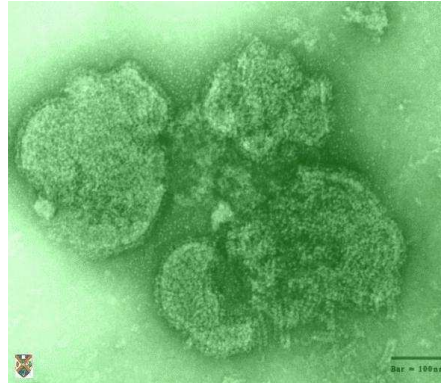


Figura 3: Canine distemper virus (CDV) al ME

Il genoma del CDV è costituito da una molecola di RNA a filamento singolo con polarità negativa (ssRNA-) di lunghezza compresa tra 15-16 kb. L'organizzazione genomica è uguale a quella degli altri *Morbillivirus* e mantiene lo stesso ordine di successione dei geni: dall'estremità 3' all'estremità 5', N-P/C/V-M-F-H-L (Figura 4) deputati a codificare per le proteine virali.



Figura 4: Schema del genoma del virus del Cimurro (da Frisk *et al.*, 1999).

Affiancate alle regioni codificanti vi sono regioni nucleotidiche non codificanti che hanno il ruolo di regolare e dirigere il processo di trascrizione fungendo da marker di riconoscimento per l'RNA virale (Shidu *et al.*, 1993). Questi tratti di genoma non codificanti sono presenti sia all'estremità 3' che 5'. Il virus contiene 6 elementi trascrizionali che codificano per 8 proteine che ritroviamo in parte associate alla faccia interna dell'envelope, in parte complessate con l'RNA nel nucleocapside; e inoltre sono presenti proteine non strutturali nelle cellule infette.

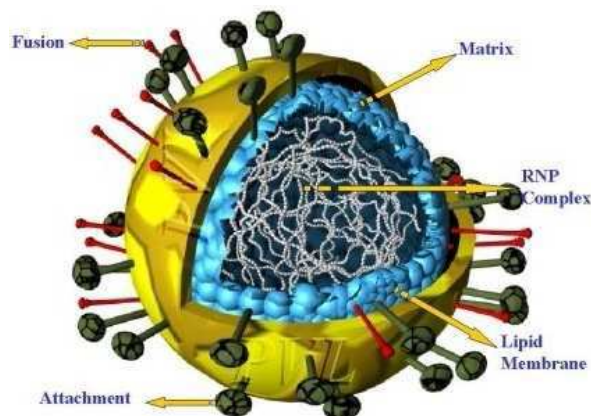


Figura 5: Rappresentazione schematica di un virione del genere *Paramyxovirus*.

La glicoproteina H è associata alla faccia esterna dell'envelope e mediante un legame specifico con un recettore, permette l'attacco del virus alle cellule. Da essa dipendono il tropismo tissutale e le caratteristiche antigeniche del virus (Chappuis., 1994). La glicoproteina F, anch'essa associata all'envelope virale, ne permette la fusione alla membrana cellulare consentendo il rilascio del nucleocapside nel citoplasma. La proteina F, inoltre, agisce come fattore di fusione tra cellule contigue favorendo la formazione di sincizi polinucleati. La proteina M chiamata proteina di matrice, è associata alla faccia interna dell'envelope e funge da collegamento tra questo e il nucleocapside. Svolge numerose funzioni tra cui riconoscimento del nucleocapside durante l'assemblaggio, formazione dell'envelope e maturazione delle nuove particelle virali. La proteina N rappresenta il maggior elemento strutturale del virione e la sua funzione è di avvolgere e proteggere il genoma virale. E' costituita da due domini: amino-terminale e carbossi-terminale. La regione N-terminale della proteina N contiene tutte le informazioni necessarie per l'interazione con l'RNA, mentre la regione C-terminale è esposta sulla superficie esterna del nucleocapside ed è preposta all'interazione con la proteina basica di matrice M, ma anche con la proteina P e L nel corso della replicazione virale (Bourhis et al., 2006). La porzione C-terminale della proteina N del virus del morbillo è caratterizzata da un disordine strutturale e quindi una flessibilità che ne permette l'interazione con diversi partners virali e cellulari (Bourhis et al., 2006). Recentemente è stato dimostrato anche un ruolo della proteina N nel complesso meccanismo di immunosoppressione indotto dai *Morbillivirus* e anche dal virus del cimurro (Kerdiles et al., 2006). La proteina L (large) è un polipeptide associato

all'RNA virale e alle proteine del nucleocapside. E' una proteina multimerica e multifunzionale perchè, insieme alla proteina P, partecipa ai meccanismi di trascrizione e di replicazione del genoma (Sidhu et al., 1993). Tra le attività enzimatiche che essa possiede ci sono quelle di RNA polimerasi per la replicazione del genoma, di mRNA guaniltransferasi ed mRNA metiltransferasi per modificazioni post-trascrizionali e capping dell'mRNA, nonché attività di poliadenilazione dell'estremità 3' (Sidhu et al., 1993). La localizzazione dei siti funzionali associati a queste attività enzimatiche non è ancora definita, ma sono presenti delle regioni altamente conservate tra i vari *Morbillivirus* nell'ambito della proteina L che corrispondono probabilmente a regioni importanti da un punto di vista funzionale (Sidhu et al., 1993).

Il gene P contiene 3 ORF sovrapposte che codificano per 3 proteine diverse chiamate P, V e C. La trascrizione dell'RNA di questo gene avviene secondo un processo detto "editing" (Cattaneo et al., 1989). Dallo stesso gene si originano due mRNA, uno per la P e uno per la V, che differiscono solo per la porzione C-terminale; la proteina C si origina dall'mRNA della P per un meccanismo di "translational choice" che avviene a livello ribosomiale durante la traduzione dell'mRNA a proteina (Haas et al., 1995). La proteina P si trova distribuita lungo il nucleocapside ed è associata alle proteine L ed N del virione. Essa funge da importante cofattore nelle fasi di trascrizione e replicazione virale. In particolare, come la proteina N, anche la P del virus del morbillo è caratterizzata da un certo disordine strutturale, importante nella fase di incapsidamento della nascente catena di RNA nel corso della replicazione (Bourhis et al., 2006).

Il ruolo delle proteine V e C non è stato ancora del tutto chiarito, ma sembra chiaro ormai un loro coinvolgimento nella patogenesi dell'infezione, come fattori immunomodulatori. In particolare è stato dimostrato che la proteina V interferisce con l'interferone- α e β , mentre la proteina C sarebbe un fattore di virulenza e di infettività del virus (von Messling et al., 2006)

La replicazione del virus del cimurro inizia con l'adsorbimento ad opera della proteina H al recettore cellulare. Affinché l'attacco cellulare possa avere luogo, il pH ambientale deve essere neutro (Castrucci *et al.*, 1980). Successivamente si assiste alla fase di penetrazione caratterizzata dalla fusione dell'envelope con la membrana cellulare ad opera della proteina F. Dopo il rilascio del nucleocapside nel citoplasma, la replicazione

inizia con una trascrizione primaria dell'RNA genomico ad opera dell'RNA polimerasi-RNA dipendente: si tratta di un complesso enzimatico costituito dall'interazione di tre proteine virali, la proteina N, P ed L. Sia la trascrizione che la replicazione dell'RNA virale avvengono in presenza di RNA virale incapsidato: solo così la polimerasi riconosce il substrato su cui agire. Vengono sintetizzati 6-10 filamenti di RNA monocistronici a partire dall'estremità 3'e nello stesso ordine in cui i rispettivi geni sono situati nel genoma. L'inizio e la fine della trascrizione sono regolati da un meccanismo di controllo rappresentato da sequenze nucleotidiche, poste all'estremità dei geni, omologhe alle sequenze coinvolte nei segnali di inizio/fine trascrizione del DNA cellulare. La "quantità" finale di mRNA trascritto per ciascun gene dipende dalla posizione occupata dal gene stesso sul genoma: l'efficienza della trascrizione decresce verso l'estremità 5'. La spiegazione di tale regolazione è dovuta al fatto che il virus necessita di molte copie delle proteine strutturali (es. N) e solo di alcune copie delle proteine ad attività enzimatica (es. L).

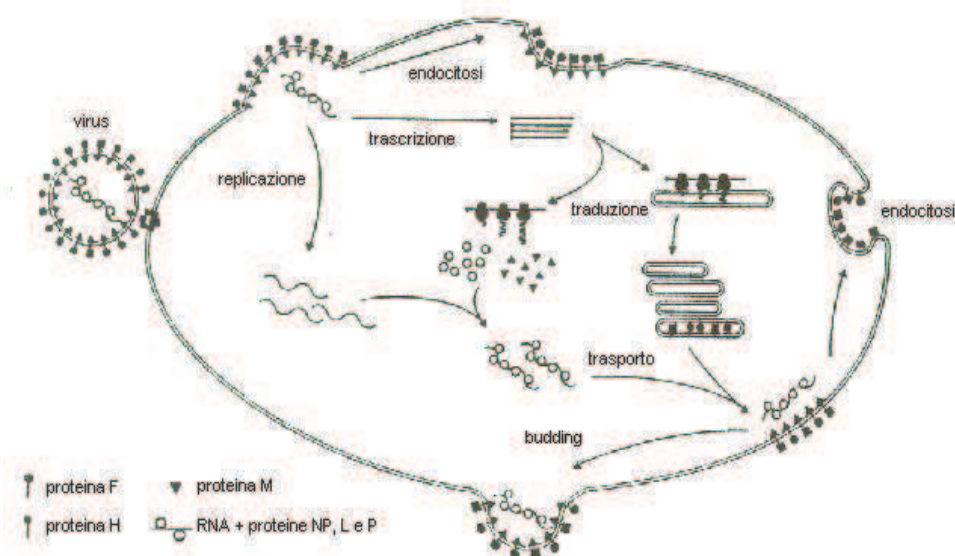


Figura 6: Ciclo di replicazione del CDV.

Le proteine strutturali vengono codificate ciascuna da un singolo mRNA, fatta eccezione per P-C-V che vengono codificate insieme in base al meccanismo di editing dell'RNA. Contemporaneamente alla trascrizione degli mRNA, si producono alcuni filamenti positivi a lunghezza genomica che fungono da intermedi replicativi per la

sintesi dell'RNA progenie. Quindi la polimerasi virale è in grado di passare dall'attività di trascrizione a quella di replicazione. L'assemblaggio del virione inizia con l'aggregazione delle proteine del nucleocapside all'acido nucleico neoformato ad opera della proteina M. La maturazione del virione avviene tramite gemmazione (budding) attraverso la membrana citoplasmatica, in particolare in zone modificate dall'inserzione di glicoproteine virali, che inserendosi spostano lateralmente le proteine cellulari, che vengono definite a "zolla". Quando il virione si distacca dalla cellula si completa la fusione dell'envelope e si osserva il ripristino dei frammenti di membrana cellulare rimasti dall'uscita del virione (Murphy *et al.*, 1995). A livello di SNC si può distinguere tra ceppi attenuati e ceppi virulenti di CDV in quanto i primi utilizzano massivamente il budding, mentre i ceppi virulenti tendono a diffondere limitando il rilascio di materiale a livello extracellulare. Quest'ultimo meccanismo di diffusione, che permette di sfuggire al controllo immunitario, costituisce la base della persistenza virale (Stettler e Zurbriggen, 1995). Il processo di replicazione si esplica con lisi cellulare e con formazione di corpi inclusi acidofili e sincizi non solo nel citoplasma, sede del processo stesso, ma anche a livello nucleare.

Plumet *et al.* descrivono una cinetica di accumulo dell'RNA del virus del morbillo ed in particolare definiscono le dinamiche con cui l'RNA polimerasi agisce nel corso dell'infezione (Figura 7).

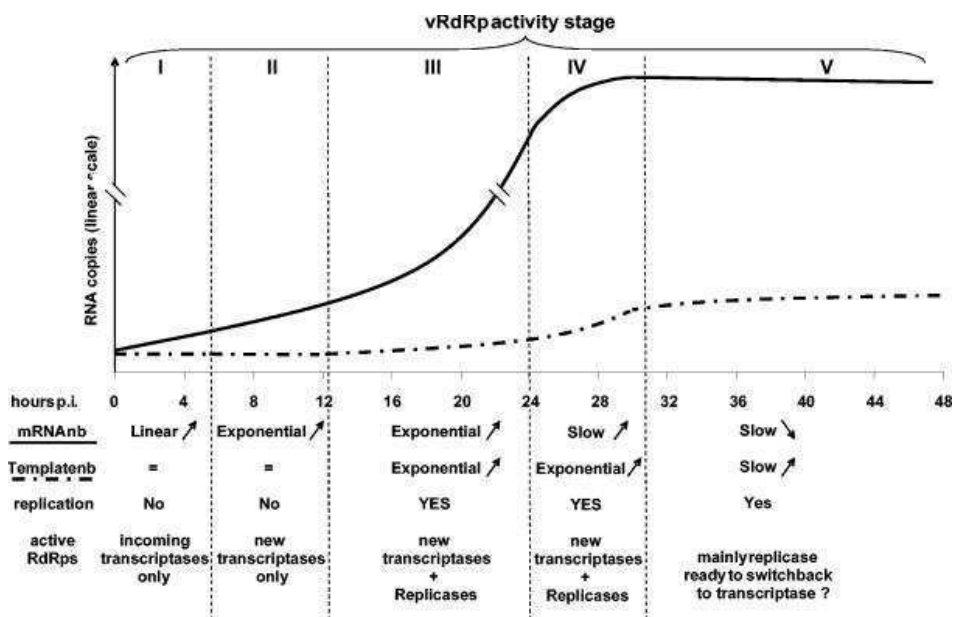


Figura 7: Rappresentazione dell'attività trascrittivica e polimerasica dell'enzima del morbillo RNA polimerasi-RNA dipendente (da Plumet *et al.*, 2005).

Fino a 5 ore post-infezione, la polimerasi agisce esclusivamente come trascrittasi e si assiste ad un accumulo lineare di mRNA. Tra 5 e 12 ore post-infezione, l'mRNA aumenta esponenzialmente in quanto fungono da trascrittasi anche enzimi neosintetizzati. Tra 12 e 24 ore, la polimerasi inizia anche l'attività replicativa e l'RNA genomico aumenta esponenzialmente. Tra le 24 e le 48 ore post-infezione, la sintesi dell'mRNA subisce un rallentamento, mentre quella del RNA genomico è ancora di tipo esponenziale (Plumet et al., 2005).

Il virus del cimurro, essendo dotato di envelope, è sensibile ai solventi lipidici, ai detergenti, ai tensioattivi e agli agenti ossidanti. La resistenza nell'ambiente esterno è scarsa soprattutto al caldo o per esposizione ai raggi solari, di conseguenza la trasmissione indiretta è estremamente rara (Chappuis, 1994). A temperature di refrigerazione resiste 8-10 giorni, e se liofilizzato, rimane infettante per 3 anni conservato in contenitori di vetro sigillato. La liofilizzazione risulta quindi un buon metodo per la conservazione dei vaccini e per gli usi in laboratorio (Bo *et al.*, 1991).

Il virus si replica a valori di pH compresi tra 7.2 e 8, anche se tollera un range di pH tra 4.5 e 9 (Appel *et al.*, 1969). La conservazione degli organi infetti come la milza, i linfonodi e l'encefalo deve essere fatta alla temperatura di almeno -70°C e ciò garantisce la stabilità del virus per anni. La milza proveniente da un animale infetto è ancora infettante dopo 30 minuti a 55°C se l'organo è intatto (Castrucci, 1980).

4.2 Epidemiologia

Il cimurro è una delle più gravi e diffuse malattie che colpiscono il cane; la sua presenza in forma enzootica è documentata in molte aree del mondo, solo le zone aride e calde sembrano essere esenti dal virus in virtù della sua estrema sensibilità alle alte temperature e ai raggi solari (Chappuis 1994).

A partire dagli anni '50, la profilassi vaccinale ha contribuito a diminuire l'incidenza della malattia, anche se l'eradicazione sembra impossibile, poiché anche diverse specie selvatiche risultano recettive al virus rappresentando quindi un serbatoio di eliminazione continua di virus soprattutto nella fase acuta dell'infezione (Frolich *et al.*, 2000). L'incidenza della malattia non dipende dall'età, anche se il numero maggiore di casi si manifesta tra il 3° e il 6° mese d'età, in quanto l'immunità passiva materna è in grado di

proteggere il cucciolo fino alla 9°-12° settimana di vita (Greene & Appel, 1991; Chappuis 1994). La malattia non sembra seguire andamento stagionale, anche se nei mesi invernali il numero di soggetti colpiti tende ad aumentare. Ciò è dovuto a fattori predisponenti la malattia, quali le basse temperature che determinano un abbassamento delle difese dell'apparato respiratorio con diminuzione delle IgA secretorie e della clearance mucociliare che facilitano l'ingresso del virus. L'infezione viene favorita nei soggetti che hanno subito forti stress in seguito ad interventi chirurgici, a gravidanza, a patologie immunodeprimenti o trattamenti terapeutici con corticosteroidi (Shell 1990). Particolarmente a rischio sono anche i cuccioli appena svezzati, nei quali si ha un calo dell'immunità passiva, o animali non sottoposti al richiamo vaccinale annuale. La frequenza della malattia dipende anche da altri fattori quali il ceppo virale e la razza del soggetto colpito. Alcuni ceppi sono sicuramente più patogeni di altri e diffondendosi nella popolazione canina fanno emergere quadri sintomatologici molto gravi, favorendo una maggiore eliminazione del virus e ampliando il raggio dei soggetti colpiti (Mochizuki *et al.*, 1999). I ceppi a media e bassa virulenza provocano infezioni persistenti che non determinano la morte del soggetto, ma lo rendono eliminatore di virus (Greene & Appel, 1991).

L'eradicazione della malattia è di difficile attuazione per molteplici fattori quali, l'estrema variabilità di specie sensibili, le differenze fra i ceppi patogeni e la presenza di animali con la malattia in forma subclinica che non manifestano sintomi ma eliminano grandi quantità di virus.

Il numero di specie recettive, in grado di sviluppare la malattia, è vastissimo e negli ultimi anni si sta ampliando in virtù della diffusione cosmopolita del virus che sembra circolare nei mammiferi acquatici e terrestri come dimostrano le recenti epidemie in popolazioni suscettibili immunologicamente e in aree vergini (Harder & Osterhaus, 1997). Tutti gli animali appartenenti alla famiglia Canidae (cane, dingo, volpe, coyote, lupo e sciacallo), alla famiglia Mustelidae (furetto, moffetta, ermellino, lontra, puzzola, donnola, martora, ghiottone e faina), alla famiglia Procionidae (panda, orsetto lavatore e orsetto d'America) risultano recettivi e possono soccombere all'infezione da CDV. L'infezione e la malattia possono anche interessare delfini, foche, focene, e occasionalmente membri della famiglia Felidae (leone, tigre e leopardo), si ipotizza che anche i primati non umani possano comprendere specie recettive (Appel 1994)

La trasmissione del virus avviene per contatto diretto tra animale infetto e animale recettivo attraverso l'aerosol e secrezioni respiratorie principalmente, ma anche secreti, escreti, essudati oculari, urina e feci. Il periodo di incubazione va dai 3 ai 21 giorni, il cane elimina il virus già dopo una settimana in concentrazioni molto elevate e il periodo di escrezione può perdurare fino a 90 giorni dall'infezione, ma normalmente è più breve. La trasmissione indiretta è piuttosto rara visto la scarsa resistenza dell'agente eziologico nell'ambiente. La trasmissione verticale, per via transplacentare, è stata dimostrata sia sperimentalmente mediante l'infezione in due cagne gnotobiotiche inseminate artificialmente, causando aborto in una e cuccioli infetti nell'altra, sia attraverso le osservazioni riguardanti casi di aborto e mortalità neonatale correlati all'infezione (Axthelm & Krakowka, 1998).

4.3 Patogenesi

4.3.1 Infezione sistemica

Dopo l'infezione per via inalatoria mediante aerosol infetti, il virus si moltiplica nei macrofagi tissutali delle prime vie respiratorie e per mezzo di questi viene trasportato, per via linfatica locale, alle tonsille, ai linfonodi retrofaringei e bronchiali. Da queste sedi il virus, a partire dal 2°-4° giorno, viene veicolato agli organi linfatici quali, timo, milza, midollo osseo, linfonodi, lamina propria dello stomaco e dell'intestino e cellule del Kupffer del fegato. In seguito alla disseminazione nei tessuti linfoidei si ha la prima fase viremica che determina l'incremento della temperatura corporea e la comparsa di leucopenia, in particolare linfopenia virus-indotta poiché inizialmente l'azione virale è diretta contro i linfociti sia B che T (Tsai *et al.*, 1982) con insorgenza di immunodepressione. Intorno al 7°-9° giorno post infezione la concentrazione del virus nel sangue scende per circa 24 ore per poi risalire e dare origine alla seconda fase viremica in cui il virus, trasportato da macrofagi, linfociti, piastrine o libero nel sangue, inizia la colonizzazione di tutte le strutture epiteliali e in seguito del sistema nervoso centrale. Il virus è anche in grado di raggiungere il tessuto osseo, l'occhio e il tessuto dentario (Mokchizuki *et al.*, 1999). Le diverse affinità tissutali dipendono dal ceppo virale coinvolto e soprattutto dalle strutture di superficie responsabili del riconoscimento e dell'adsorbimento del virus sulla cellula ospite, compito svolto dalla glicoproteina H. In seguito, oltre alla linfopenia, si riscontrano neutropenia, monocitopenia e piastrinopenia, quest'ultima dovuta a distruzione immunomediata per

formazione di immunocomplessi che vengono fagocitati dalle cellule del Kupffer, responsabili del trasporto del virus negli organi linfoidi secondari, e da ridotta produzione per infezione diretta del midollo osseo con distruzione dei megacariociti e alterazione della produzione delle altre linee ematopoietiche. La trombocitopenia che ne deriva riduce l'integrità degli endoteli con conseguente aumento della permeabilità vascolare e favorendo quindi la diffusione extravasale del virus in tutti i tessuti (Axthelm e Krakowka, 1987).

Intorno al 7°-14° giorno dall'infezione inizia a svilupparsi la risposta immunitaria strettamente influenzata dalla patogenicità del ceppo virale e dallo stato immunitario del soggetto.

I soggetti che entro il 14° giorno post-infezione sviluppano adeguati titoli anticorpali, e mostrano un'adeguata immunità citotossica cellulo-mediata, eliminano il virus da tutti i tessuti senza evidenziare i segni clinici della malattia e quindi guariscono (Appel 1987; Greene e Appel, 1991). A questo gruppo appartengono animali vaccinati correttamente, cuccioli con immunità passiva naturale e soggetti che hanno già incontrato il virus.

Negli animali con livelli intermedi di immunità cellulo-mediata e lenta risposta umorale (Jongh e Cadore, 1994), il virus può diffondere nei tessuti epiteliali con conseguente sintomatologia clinica che può risolversi se il soggetto sviluppa un'adeguata risposta immunitaria. In questo caso il virus viene eliminato dalla maggior parte dei tessuti dell'organismo, tuttavia in alcuni distretti, quali l'uvea, i tegumenti e i neuroni, può permanere per lunghi periodi causando la comparsa di sintomi nervosi ritardati ed ipercheratosi dei cuscinetti plantari.

Infine nei soggetti incapaci di produrre adeguati titoli anticorpali diretti contro il virus, si riscontra la malattia nella sua forma più grave. Il virus si diffonde in molti tessuti ed apparati tra cui il respiratorio, il gastroenterico e il sistema nervoso centrale a livello del quale replicandosi porta all'insorgenza nel soggetto infetto di convulsioni, alterazioni psichiche, tremori e alterazioni della stazione e dell'andatura. In questi casi la malattia ha esito letale entro 15-20 giorni dall'infezione (Shell, 1990).

4.3.2 Infezione del SNC

La forma nervosa può associarsi alla malattia sistemica, presentarsi come una tarda manifestazione dell'infezione da CDV (Baumgartner *et al.*, 1989; Raw *et al.*, 1992) o

essere la sola manifestazione clinica. L'esatto meccanismo con cui il virus entra nel SNC non è stato ancora del tutto chiarito. La frequente presenza di lesioni periventricolari e subependimali, testimoniata dal ritrovamento del virus nelle cellule del plesso corioideo e nell'ependima, suggeriscono la penetrazione del virus nel tessuto cerebrale attraverso cellule infette veicolate dal liquido cefalorachidiano (CSF). Nel CSF il virus può essere trasportato per mezzo di cellule mononucleate fuse con cellule ependimali (Vandeveld & Zurbriggen, 1995). Questo conferma l'ipotesi del liquido cefalorachidiano come principale veicolo ed esclude un ruolo attivo delle cellule linfoidi infette, piastrine e leucociti, nel veicolare il virus attraverso la barriera emato-encefalica a livello del SNC, anche se si ritiene che questo meccanismo venga in parte sfruttato (Summers *et al.*, 1979; Axthelm & Krakowka, 1987).

Nel SNC il virus replica nei neuroni e nelle cellule gliali ed è associato a lesioni sia della materia grigia che della materia bianca con conseguente demielinizzazione (Tipold *et al.*, 1992).

Le lesioni iniziali nella materia bianca non hanno carattere infiammatorio e sono il risultato della sola replicazione del virus nelle cellule gliali (Vandeveld *et al.*, 1985). La demielinizzazione colpisce il cervelletto, il tratto ottico e il midollo spinale. Il target principale del virus a questo livello è rappresentato dagli astrociti (Mutinelli *et al.*, 1988). In questi si possono rinvenire corpi inclusi virali intranucleari e intracitoplasmatici (Summers & Appel, 1985). Se la risposta immunitaria contro il CDV è ritardata o insufficiente si può sviluppare la malattia cronica durante la quale alle lesioni demielinizzanti si associa l'infiammazione che può condurre ad un ulteriore danno della materia bianca (Vandeveld *et al.*, 1982).

Le lesioni nella materia grigia sono il risultato dell'estensiva infezione dei neuroni, nella corteccia cerebrale e cerebellare, nei nuclei basali, nel tronco cerebrale e nel midollo spinale (Summers *et al.*, 1995), che può indurre necrosi neurale e poliencefalomalacia (Lisiak & Vandeveld, 1979).

Sebbene la tipologia delle lesioni sia molto ampia, la neuropatologia nelle infezioni naturali è abbastanza costante e dipende principalmente dal decorso della malattia determinato soprattutto dalla virulenza del ceppo virale, dall'età e dall'immunocompetenza del soggetto colpito.

I soggetti infetti che non mostrano un'adeguata risposta immunitaria sviluppano rapidamente la sintomatologia clinica e muoiono; al contrario gli animali che presentano una buona risposta anticorpale superano l'infezione evidenziando sintomi lievi o assenza di sintomatologia clinica. I cani con una ritardata ed insufficiente risposta immunitaria tendono a sviluppare una malattia neurologica cronica (Appel *et al.*, 1982). In relazione ai fattori sopra citati la forma nervosa può essere suddivisa morfologicamente in:

- encefalopatia acuta;
- meningoencefalomielite demielinizzante non purulenta acuta o cronica;
- encefalomielite post-vaccinale;
- encefalite del cane vecchio (ODE).

(Baumgartner *et al.*, 1989).

4.3.2.1 Encefalopatia acuta

Nel soggetto giovane o immunodepresso si manifesta più frequentemente questa forma nervosa dovuta alla diffusione precoce del virus attraverso la barriera emato-encefalica (Axtelm e Krakowka, 1987) e caratterizzata dalla necrosi dei neuroni.

Le lesioni riscontrabili nell'encefalopatia acuta sono soprattutto a carico della sostanza grigia e la demielinizzazione che si evidenzia non è virus-indotta ma è subordinata al danno neuronale dato dalla penetrazione del virus direttamente all'interno dei neuroni. Si possono riscontrare alterazioni neuronali che comprendono picnosi e raggrinzimento nucleare, cromatolisi e neuronofagia (Gibson *et al.*, 1965). In questa forma di encefalite la reazione infiammatoria è molto scarsa a causa della totale assenza di risposta immunitaria dell'animale colpito e dell'immunodepressione indotta dal virus.

4.3.2.2 Encefalomielite demielinizzante acuta e cronica

In animali adulti o in cuccioli immunocompetenti il cimurro causa una demielinizzazione multifocale della sostanza bianca del SNC, le cui lesioni si localizzano soprattutto nel cervelletto, nei peduncoli cerebellari, nella regione periventricolare del quarto ventricolo e nel midollo spinale (Baumgartner *et al.*, 1989; Alldinger *et al.*, 1993). Tale demielinizzazione riconosce una fase acuta ed una cronica (Axtelm e Krakowka, 1987).

Le lesioni demielinizzanti precoci compaiono circa 3 settimane post-infezione ed evolvono durante un periodo di forte immunosoppressione, dovuta agli effetti del CDV, in assenza di reazione infiammatoria (Vandeveldel *et al.*, 1982). Queste lesioni demielinizzanti sono direttamente indotte dalla replicazione del virus nelle cellule gliali della materia bianca (Vandeveldel *et al.*, 1985; Zurbriggen *et al.*, 1993). In particolare i principali bersagli nel tessuto nervoso sono gli astrociti, cellule interposte tra i neuroni e dotate di prolungamenti che formano emidesmosomi con la lamina basale dei capillari sanguigni da una parte e il rivestimento del plasmalemma dei neuroni dall'altra, fungendo da "filtro" per il materiale scambiato tra sangue e SNC.

Le lesioni nella fase acuta dell'encefalite demielinizzante sono rappresentate da vari gradi di spongiosità della materia bianca che contiene diversi macrofagi e astrociti rigonfi, senza tracce di focolai infiammatori (Mutinelli *et al.*, 1988).

Attraverso tecniche ultrastrutturali e l'immunocitochimica si è dimostrato come negli oligodendrociti sia molto difficile ritrovare proteine e particelle virali, al contrario degli astrociti e delle cellule della glia, che sono in grado di sostenere l'infezione (Zurbriggen *et al.*, 1986). Recentemente è stato dimostrato che negli oligodendrociti avviene un'infezione "restrittiva" cioè incompleta in quanto al loro interno non si ritrovano intere particelle virali, ma sequenze di acidi nucleici e mRNA corrispondenti a tutti i geni virali: è possibile che la trascrizione virale ritrovata in queste cellule interferisca con funzioni specializzate necessarie al mantenimento delle membrane mieliniche e che sia correlata con una down regulation della trascrizione del gene che codifica per la sintesi di mielina ed una generale riduzione dell'attività enzimatica (Graber *et al.*, 1993; Zurbriggen *et al.*, 1998). Nelle aree di demielinizzazione non si nota una massiva perdita di oligodendrociti a conferma che le alterazioni metaboliche con perdita della guaina mielinica avvengono prima di quelle morfologiche, caratterizzate da microvacuolizzazione e perdita di organelli, che portano alla morte cellulare (Glaus *et al.*, 1990).

Per contro non si può escludere che la morte di queste cellule sia il risultato di cambiamenti indotti dal virus in altri tipi cellulari. Infatti l'osservazione di sincizi astrocitari intorno ai nodi di Ranvier ha portato ad ipotizzare che la causa della degenerazione e successiva morte degli oligodendrociti fosse una loro mancata nutrizione da parte degli astrociti che, infettati, perderebbero la loro fisiologica funzione

trofica e libererebbero inoltre, nello spazio extracellulare, dei metabolici tossici (Zurbriggen & Vandeveld, 1994).

Nei soggetti che sopravvivono alla forma demielinizzante acuta, l'infezione progredisce in una forma cronica legata alla ripresa della risposta immunitaria nei confronti delle cellule infette e caratterizzata da una grave reazione infiammatoria che porta ad un incremento del danno tissutale. In questa fase della malattia alle preesistenti lesioni si vengono a sommare eventi di natura infiammatoria caratterizzati da infiltrazioni di linfociti, plasmacellule, monociti e macrofagi che si dispongono intorno ai vasi a formare i tipici manicotti perivascolari e successivamente invadono il parenchima (Vandeveld *et al.*, 1985). Le lesioni tipiche della forma cronica sono localizzate prevalentemente nella corteccia cerebrale e cerebellare, alle quali si associano foci necrotici (Bollo *et al.*, 1988). La reazione infiammatoria è associata alla produzione di anticorpi antivirali a livello intratecale diretti contro tutti gli antigeni virali e contro gli antigeni mielinici (Vandeveld *et al.*, 1986). In questo caso il titolo anticorpale del liquido cefalorachidiano è spesso maggiore del titolo anticorpale sierico (Bollo *et al.*, 1986). La caratteristica singolare di questa fase è che il virus scompare dalle lesioni e dalle cellule infette a differenza di ciò che accade nella fase acuta durante la quale il virus replica attivamente (Alldinger *et al.*, 1993).

Rispetto alle forme acute le aree di demielinizzazione aumentano in estensione e spesso sono accompagnate da necrosi del parenchima per cui la gravità del quadro sembra essere correlato all'intensità del fenomeno infiammatorio. La progressione della demielinizzazione è dovuta alla stimolazione dei macrofagi da parte di anticorpi antivirali di origine intratecale, in particolare il legame fra anticorpo, virus e recettori Fc delle cellule fagocitarie avrebbe come effetto quello di determinare la liberazione di fattori tossici. La sintesi di queste sostanze è forse l'espressione più grave della citotossicità immunomediata in quanto il loro compito è quello di distruggere le cellule bersaglio. Tra i fattori tossici prodotti vi sono i radicali dell'ossigeno e sostanze ossigeno-attive che conducono alla necrosi selettiva degli oligodendrociti, delle cellule gliali e delle guaine mieliniche posti nelle loro immediate vicinanze (Vandeveld e Zurbriggen, 1995).

Sebbene la risposta immunitaria porti all'eliminazione del virus nei tessuti cerebrali, è possibile che esso, in parte, riesca a proteggersi dal sistema immunitario al di fuori delle lesioni infiammatorie demielinizzanti o nella loro immediata periferia (Bollo *et al.*, 1986). Ciò spiegherebbe la continua attivazione della risposta immunitaria intratecale che determinerebbe la progressione della demielinizzazione (Botteron *et al.*, 1992). La persistenza virale è la causa principale delle lesioni croniche, anche se il meccanismo non è ancora stato del tutto chiarito. Nello sviluppo di persistenza nel SNC, sono stati proposti fattori propri dell'organismo ospite, quali una ritardata risposta immunitaria rispetto alla replicazione e alla propagazione del virus (Zurbriggen *et al.*, 1995; Muller *et al.*, 1995), ma anche fattori di origine virale, come la formazione di virus incompleti o anomali come nel caso del virus del morbillo (Tobler e Imagawa, 1984; Alldinger *et al.*, 1993), la produzione di sostanze solubili in grado di inibire la normale replicazione virale (ter Meulen e Martin, 1976) e la diffusione non citolitica del virus da cellula a cellula. Quest'ultimo fattore sembrerebbe quello più importante nel caso del CDV. In particolare, la diffusione non citolitica comporterebbe una liberazione di minime quantità di materiale virale nello spazio extracellulare con conseguente limitata esposizione degli antigeni virali al sistema immunitario (Vandervelde e Zurbriggen, 2005). Recentemente il fenomeno della persistenza del CDV nel SNC è stato principalmente ricondotto ad una differente conformazione della proteina F che partecipa normalmente alla fusione tra cellula e cellula e alla formazione di sincizi cellulari che sono il risultato della citolisi di più cellule fuse insieme (Plattet *et al.*, 2005).

4.3.2.3 Poliencefalite post-vaccinale

La poliencefalite post-vaccinale è responsabile delle forme neurologiche che compaiono 1-3 settimane dopo la vaccinazione con vaccini vivi attenuati ed è caratterizzata da lesioni massive della materia grigia con minime interessamento della materia bianca. Le lesioni, localizzate principalmente nella corteccia cerebrale e nel tronco cerebrale, consistono di necrosi neuronale, manicotti perivascolari con cellule mononucleate e a volte corpi inclusi intranucleari nei neuroni (Nessler *et al.*, 1997). I casi di encefalite post-vaccinale fino ad oggi documentati sono dovuti all'utilizzo del ceppo vaccinale Rockborn, il quale può risultare parzialmente patogeno soprattutto nei cuccioli, a causa di un elevato neurotropismo (Carmichael 1999).

4.3.2.4 Encefalite del cane vecchio (ODE)

L'encefalite del cane vecchio è una particolare forma morbosa di tipo neurologico provocata dal CDV. Si presenta come una panencefalite diffusa a cui si associano diversi gradi di demielinizzazione, che coinvolgono diverse aree corticali con una compromissione del cervelletto molto meno marcata rispetto alla meningoencefalomielite multifocale, nella quale le lesioni a carico di quest'area sono dominanti (Kimoto 1986).

E' una patologia cronica che colpisce i cani adulti, spesso vaccinati in giovane età, o che hanno contratto l'infezione senza manifestare sintomo clinici di malattia. La ODE è caratterizzata da lesioni quasi esclusivamente a carico della sostanza grigia (Nessler *et al.*, 1997).

E' stata avanzata l'ipotesi che l'evento centrale del fenomeno sia la persistenza del virus nelle cellule del SNC; in questo modo, il virus resisterebbe all'azione del sistema immunitario e riuscirebbe a danneggiare irreversibilmente il tessuto nervoso.

Le lesioni istopatologiche sono limitate al SNC e sono caratterizzate da infiltrazione perivascolare disseminata con linfociti e plasmacellule, diffusa proliferazione microgliale, astrogliosi, degenerazione neuronale e neuronofagia. Queste lesioni sono soprattutto diffuse nella zona della corteccia cerebrale. Nell'area subcorticale, nella capsula interna e nei peduncoli cerebrali si osserva demielinizzazione diffusa.

L'ODE è clinicamente ed istopatologicamente differente dall'encefalomielite multifocale da CDV nei cani adulti. La natura delle lesioni (sclerosi diffusa rispetto alla necrosi multifocale) e la loro localizzazione topografica consentono una netta distinzione tra queste patologie.

4.4 Sintomatologia

Il cimurro si manifesta con forme cliniche anche molto diverse fra loro in funzione del ceppo virale, dell'età del soggetto colpito. Si possono distinguere una forma iperacuta (tipica dei cuccioli al di sotto dei 3 mesi di vita, privi di immunità colostrale e vaccinale) e una forma acuta e sub-acuta (nei soggetti al di sopra dei 3 mesi e negli adulti).

Forma iperacuta: dopo un'incubazione di 3-5 giorni, si ha la comparsa di svogliatezza, inappetenza, congiuntivite, epifora, tosse, diarrea anche emorragica, disidratazione e

tremori muscolari. La temperatura è solitamente normale oppure vi è ipotermia. Gli esami di laboratorio evidenziano leucopenia e talvolta riduzione delle globuline. La morte sopraggiunge in pochi giorni.

Forma acuta o sub-acuta: ad un periodo d'incubazione di 3-5 giorni fanno seguito sintomi di carattere generale quali ipertermia marcata, abbattimento del sensorio, anoressia o disoressia, fotofobia, congiuntivite catarrale, scolo nasale sieroso, secchezza del tartufo e dei cuscinetti plantari, tachicardia, tachipnea, tosse e iniezione delle sclere e delle mucose. Dopo questa fase detta viremica e della durata di 4-5 giorni, segue una fase detta mucosa con sintomi che dipendono dall'apparato maggiormente colpito.

Forma intestinale: si presenta in forma di enterite catarrale talvolta emorragica, caratterizzata da diarrea fetida e feci collose e nerastre.

Forma cutanea: è caratterizzata dalla comparsa di un esantema diffuso e più frequentemente localizzato al piatto della coscia e all'addome. Un'altra manifestazione tipica è l'ipercheratosi dei cuscinetti plantari e del tartufo.



Figura 8: Lesioni cutanee a carico dei cuscinetti plantari e del piatto interno della coscia.

Forma respiratoria: si osservano uno scolo nasale muco-purulento, tosse e alterazione del respiro con caratteristiche diverse a seconda della gravità dell'infezione e della presenza di complicanze batteriche. Ad una rinite e bronchite, può seguire una broncopolmonite che non sempre ha esito letale.



Figura 9: Scolo nasale muco-purulento.

Dopo 2 o 3 settimane, la malattia può evolvere nella forma nevosa che spesso è preceduta da sintomi quali aggressività, paura o ansietà, iperestesia, mialgia e atassia locomotoria. La forma nervosa può evolvere in tre diverse forme:

Forma eccitativa: compaiono crisi epilettiche che si ripetono a distanza sempre più ravvicinata fino allo status epiletticus, seguito dal coma. La prognosi è infausta.

Forma paralitica: può seguire alla forma eccitativa ed è caratterizzata da marcato dimagrimento, ipotrofia muscolare e paraparesi che può evolvere a tetraplegia flaccida. La prognosi è infausta.

Forma mioclonica: è caratterizzata dalla comparsa di contrazioni miocloniche di diversi gruppi muscolari. Le mioclonie possono attenuarsi e scomparire oppure rimanere per tutta la vita dell'animale.



Figura 10: Tipiche manifestazioni nervose in corso di cimurro.

Accanto a una di queste forme, nella fase acuta e sub-acuta della malattia compaiono spesso caratteristici sintomi oculari. Inizialmente si osservano fotofobia e congiuntivite secca, seguita poi dalla comparsa di essudato muco-purulento e più tardi da opacamento corneale. La cornea va incontro ad ulcerazione che però si risolve spontaneamente con la formazione di una cicatrice bianca.



Figura 11: Ipoplasia dello smalto dentario e congiuntivite secca.

4.5 Diagnosi

Vista l'estrema variabilità dei quadri sintomatologici e la mancanza di lesioni patognomoniche ascrivibili all'azione del virus, la diagnosi clinica di cimurro è piuttosto complessa e richiede un accurato iter diagnostico ante-mortem e spesso è necessaria una conferma con indagini di laboratorio (Moritz *et al.*, 2000).

Nelle fasi iniziali della malattia, nelle quali non si è ancora manifestata la forma nervosa, o in animali che presentano una forma clinica lieve, è molto complicato emettere una diagnosi in seguito alla presenza di sintomi poco specifici e molto variabili. Un aiuto in questo senso può essere fornito dai risultati dell'esame emocromocitometrico che rivela, nei soggetti infetti, una marcata linfopenia e trombocitopenia. Molto importante e utile per poter fare una diagnosi è la raccolta dei dati anamnestici del soggetto interessato che illustrino il tipo di sintomi presenti, il modo e il tempo di insorgenza. Inoltre, alcuni esami di laboratorio possono aiutare a fare diagnosi.

Ad esempio ci sono diverse tecniche di diagnosi diretta che consentono di rilevare la presenza del virus nei tessuti dell'animale infetto: l'isolamento virale, l'immunofluorescenza diretta, l'immunoistochimica, la ricerca dell'acido nucleico.

L'isolamento del virus può essere eseguito mediante utilizzo di animali da laboratorio (inoculazione di cani o furetti con secreti, escreti, tamponi nasali, orali o liquido cefalorachidiano) o tramite l'utilizzo di colture cellulari (difficilmente però il virus del cimurro induce effetto citopatico al primo passaggio *in vitro*).

L'immunofluorescenza diretta può essere utilizzata per la ricerca dell'Ag virale a partire da congiuntiva, pelle, epitelio respiratorio, tonsille e leucociti. Questo metodo diagnostico può dar luogo a risultati falsamente negativi, nel caso in cui un animale infetto abbia già sviluppato una risposta immunitaria verso il virus, come nel caso delle forme croniche oppure nel caso in cui il virus al momento del prelievo non sia più presente nei tessuti sottoposti a diagnosi (Shell, 1990; Greene e Appel, 1991).

Le tecniche immunoistochimiche possono essere applicate su strisci di sangue, su prelevati biotipici da cuscinetti plantari ipercheratosici o dalla mucosa gastrica, su tessuti di origine polmonare e cerebrale (Moritz *et al.*, 2000). Queste tecniche rappresentano un metodo altamente sensibile e specifico per la ricerca del virus perché si basano sulla reazione fra Ag e Ab, tuttavia vengono utilizzate soprattutto nella diagnosi post-mortem (Baumgartner 1993).

Il ricorso alla biologia molecolare tramite la RT-PCR ha consentito l'identificazione virale a partire da tessuti e fluidi biologici per una diagnosi intra-vitam dell'infezione da CDV. Vengono utilizzati primers specifici per una regione altamente conservata del gene N (Frisk *et al.*, 1999). La RT-PCR consente di effettuare indagini epidemiologiche e filogenetiche che sono importanti nella differenziazione dei ceppi, nello studio di variazioni genomiche e nel confronto a livello genomico tra ceppi vaccinali e ceppi virulenti.

La diagnosi indiretta prevede l'applicazione di tecniche sierologiche al fine di evidenziare la presenza di anticorpi specifici diretti contro il virus nel siero di animali infetti e quindi confermare l'infezione da cimurro. Tra i test sierologici più utilizzati vi è la sieroneutralizzazione, l'immunofluorescenza indiretta (IFI), e l'ELISA

4.6 Profilassi

La misura di profilassi più efficace nei confronti del virus del cimurro è rappresentata dalla vaccinazione, anche se le misure di igiene rappresentano un valido strumento di profilassi diretta nei confronti di un virus non particolarmente resistente ai comuni solventi lipidici, ai detergenti, ai tensioattivi e agli agenti ossidanti (Chappuis, 1995).

L'immunità nei confronti del virus del cimurro può essere stimolata efficacemente con l'utilizzo di vaccini vivi attenuati, quali ad esempio l'Ondestepoort avianizzato, o il ceppo Rockborn attenuato mediante passaggi cellulari. Il vaccino vivo attenuato del cimurro viene solitamente somministrato in combinazione con altri vaccini, quali quelli per il parvovirus, l'adenovirus, il coronavirus e la Leptospira. Nell'ambito di queste preparazioni vaccinali miste, il virus del cimurro è sempre quello più instabile alla temperatura e all'azione dei raggi solari, sono quindi molto importanti le condizioni di trasporto e di conservazione (Chappuis, 1995).

I cuccioli che ricevono il colostro da una madre vaccinata o che è entrata in contatto con il virus, ricevono anche un'immunità passiva proteggente nei confronti del virus del cimurro. In questi cuccioli, la prima vaccinazione deve essere effettuata quando avviene il calo degli anticorpi materni che altrimenti andrebbero ad interferire con la risposta immunitaria del cucciolo al vaccino. La prima vaccinazione viene normalmente eseguita a 3 settimane di vita, ed è seguita da una seconda vaccinazione a 12-14 settimane. Nel caso invece di cuccioli che non ricevono il colostro materno, il primo trattamento vaccinale deve essere eseguito ai 10-12 giorni di vita (Chappuis, 1995).

Accanto ai vaccini vivi attenuati, sono in fase di studio sperimentale i vaccini ricombinanti, in particolare quelli che utilizzano i poxvirus come vettori (Chappuis, 1995). Diverse sperimentazioni sono state condotte utilizzando poxvirus ricombinanti in seguito all'inserzione del gene H o F del cimurro. Queste sperimentazioni hanno dimostrato l'efficacia e la sicurezza del vaccino in seguito a prove di challenge (Chappuis, 1995).

4.7 Terapia

Attualmente non è disponibile una terapia specifica antivirale nei confronti del cimurro. I protocolli terapeutici vengono quindi decisi sulla base della sintomatologia del paziente. Vengono comunemente somministrati antibiotici per la prevenzione e il controllo di infezioni batteriche secondarie. Inoltre spesso si rende necessario l'utilizzo di antipiretici nelle forme acute accompagnate da un notevole e prolungato rialzo febbrile. A seconda poi dell'apparato maggiormente coinvolto dall'infezione, vengono utilizzati farmaci ad azione specifica: ad esempio si fa ricorso ad antidiarroici e alla fluidoterapia nella terapia della diarrea, mucolitici e calmanti della tosse nelle forme respiratorie, pomate oftalmiche e colliri in caso di cheratite e congiuntivite, anticonvulsivanti nel trattamento delle forme nervose epilettiche e miocloniche.

5. Virus del cimurro come modello di malattie dell'uomo

Nell'ambito della neuropatologia umana vengono utilizzati frequentemente i roditori e i primati non umani come modello di studio, anche se non sempre questi modelli animali permettono di mimare tutti i segni clinici e gli aspetti istopatologici associati alla sindrome dell'uomo. Recentemente sempre maggiore interesse è stato rivolto al cervello del cane come modello di patologie neurologiche dell'uomo (Cummings et al., 1996). I vantaggi nell'utilizzo del cane derivano ad esempio dalla condivisione degli stessi spazi e quindi dall'elaborazione di comportamenti simili indotti da tali comuni ambienti di vita. Nel cervello del cane sono state riconosciute patologie spontanee comuni all'uomo, come il processo di invecchiamento caratterizzato dall'accumulo di sostanza beta-amiloide. Inoltre il cane è una delle poche specie animali in cui l'epilessia si presenta come patologia spontanea, così come nell'uomo. Lo studio delle modificazioni molecolari a livello neuronale nel cervello del cane offre numerosi vantaggi ed indicazioni per la patologia nell'uomo (D'Intino et al., 2006).

L'encefalite del cane vecchio (ODE) viene riconosciuta da tempo come una patologia simile per molti aspetti alla panencefalite subacuta sclerosante (SSPE) umana associata ad infezione da virus del morbillo (Adams 1975). Entrambe sono indotte da un *Morbillivirus* che induce uno stato di persistenza nel SNC, anche se i meccanismi patogenetici all'origine della persistenza virale sono diversi per queste due malattie

virali croniche (Hall *et al.*, 1979). Per entrambe le malattie, la comparsa dei segni clinici avviene dopo un periodo di latenza e di silenzio clinico dato che l'infezione avviene probabilmente durante l'infanzia nell'uomo e nella giovane età per il cane. Le lesioni associate a SSPE e ODE sono di carattere demielinizzante e sclerosante ed in entrambe, il virus può occasionalmente essere isolato da ospiti infetti, ma nella maggioranza dei casi questo risulta impossibile (Katz e Koprowski, 1973).

A. MATERIALI E METODI ORF VIRUS

1. Substrati cellulari

Due tipi cellulari diversi sono stati utilizzati ai fini della propagazione virale e delle successive prove antivirali.

Le colture primarie di cheratinociti di agnello (PLK) sono state isolate da tessuto prepuziale di agnelli stabulati presso la stalla del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria di Bologna. Il prelievo del prepuzio è avvenuto seguendo la direttiva comunitaria in merito alla protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali (86/609/EEC). Il tessuto prepuziale, asportato mediante circoncisione effettuata in anestesia totale, è stato tagliato in piccoli frammenti, che sono stati immersi in tripsina/EDTA 0.05% (Gibco, Invitrogen Corporation, UK) ed incubati a 37°C in oscillazione per 30 minuti. Il materiale tripsinizzato è stato filtrato e poi centrifugato a 1200 rpm per 10 minuti. Il pellet cellulare è stato risospeso in un terreno di coltura chiamato raft medium e posto in fiasche primaria (BD Falcon, USA) a 37°C e 5% di CO₂. Il raft medium è un terreno di coltura costituito da 2/3 di D-MEM (Gibco, Invitrogen Corporation, UK), 1/3 di Ham's F-12 (Gibco, Invitrogen Corporation, UK), arricchito con 10% di siero fetale bovino (SFB) (Gibco, Invitrogen Corporation, UK), 2 mM di L-glutamina (Gibco, Invitrogen Corporation, UK), 1 mM di sodio piruvato (Gibco, Invitrogen Corporation, UK), 7.5% di sodio bicarbonato (Gibco, Invitrogen Corporation, UK), 2ng/ml di fattore di crescita epidermico (EGF), 5 µg/ml di insulina, 0.5 µg/ml di idrocortisone, 5 µg/ml di transferrina, 1.5 x 10⁻³ µg/ml di 3,3',5-triiodo-2-tironina, e 0.1 nM di tossina colerica (Snoeck et al., 2002). La crescita delle PLK è stata monitorata al microscopio ottico rovesciato e il raft medium è stato sostituito ogni due giorni con nuovo terreno di coltura.

Le cellule embrionali umane di polmone (HEL) sono state ottenute dall'American Type Culture Collection (ATCC) (numero di catalogo CCL-137). Le HEL sono state coltivate in D-MEM, arricchito con 10% SFB, 2 mM di L-glutamina, 1 mM di sodio piruvato, 7.5% di sodio bicarbonato, e sono state coltivate a 37°C e 5% di CO₂.

2. Ceppi di orf virus e preparazione degli stock virali

Diversi ceppi di orf virus sono stati utilizzati ai fini delle prove antivirali: il ceppo neozelandese NZ2 (Robinson et al., 1982), e quattro distinti ceppi italiani tutti di tipo NZ2-like (Scagliarini et al., 2006). Tre di questi ceppi sono stati isolati da focolai classici di ectima contagioso (IT-Mi 90, IT-To e IT-C2) mentre il quarto ceppo italiano (IT-01) proviene da un allevamento siciliano colpito da una forma atipica o maligna della malattia, caratterizzata da lesioni proliferative e altamente vascolarizzate (Di Marco et al., 2000). Tutti i ceppi virali sono stati coltivati su due tipi cellulari diversi, le PLK e le HEL. Entrambe sono risultate in grado di permettere la replicazione virale e la conseguente formazione di un caratteristico effetto citopatico (CPE) con comparsa di placche nel monostrato cellulare e di cellule rotondeggianti in fase di degenerazione palloniforme. L'infezione di una fiasca da coltura cellulare con superficie di 75 cm², in presenza di un monostrato confluyente, è stata eseguita a partire da 500 µl di stock di ciascun ceppo virale, con l'aggiunta di 5 ml di terreno al 2% SFB. Al termine di un'incubazione di 2 ore a 37°C e in presenza di 5% CO₂, l'inoculo virale è stato rimosso e sostituito da 18 ml di terreno di crescita al 2% SFB. Al raggiungimento del 100% di CPE, con conseguente liberazione del virus dalle cellule degenerate, il surnatante è stato raccolto e centrifugato a 1500 rpm, per consentirne la separazione da detriti cellulari. Il surnatante è stato quindi raccolto, suddiviso in aliquote da 1 ml ciascuna, e quindi congelato a -80°C. Ciascuno stock virale da 1 ml è stato scongelato ed utilizzato una sola volta al fine di evitare una riduzione della carica virale conseguente e ripetuti cicli di congelamento-scongelamento.

2.1 Titolazione virale

La titolazione è stata eseguita su cellule HEL e PLK, al fine di ottenere l'inoculo virale da utilizzare nelle successive prove antivirali. Ciascuno stock virale è stato titolato in piastre da coltura cellulare da 96 pozzetti in presenza di un monostrato cellulare confluyente. Sono state eseguite delle diluizioni in base dieci di ciascuno stock virale ed ognuna è stata testata inoculandone 100 µl per pozzetto in sei ripetizioni. Al termine di un'incubazione di 2 ore a 37°C e 5% CO₂, l'inoculo virale è stato rimosso e sostituito da 200 µl per pozzetto di terreno di crescita al 2% SFB. Dopo tre giorni di incubazione a 37°C e 5% CO₂, la lettura della titolazione è stata eseguita con la conta delle placche

sviluppatasi in ciascun pozzetto e in corrispondenza di ciascuna diluizione, è stato quindi calcolato il numero medio di placche per diluizione. Il titolo di ciascuno stock virale è stato quindi espresso in termini di unità formanti placche per ml (Pfu/ml), applicando la formula:

$$\frac{\text{media del numero placche} * \text{reciproco della diluizione corrispondente}}{\text{volume di inoculo virale (0.1 ml)}}$$

3. Composti antivirali

Tra i composti di sintesi testati nei confronti del virus orf si possono distinguere due gruppi di molecole: quelle appartenenti alla famiglia dei nucleosidi aciclici fosfonati (ANPs) e quelle dei precursori lipofili degli ANPs.

Gli ANPs sono stati sintetizzati dal Prof. Holý presso l'Istituto di Chimica Organica e Biochimica di Praga (Holý, 2003; Holý et al 2003; Holý et al 2005; Balzarini et al., 2004) e sono stati utilizzati presso il laboratorio di virologia del Rega Institute for Medical Research di Leuven (Università Cattolica di Leuven in Belgio) diretto dal Prof. Snoeck, nell'ambito di un più ampio progetto di valutazione dell'attività antivirale di tali composti nei confronti di virus della famiglia Poxviridae. Gli ANPs testati nei confronti del virus orf sono indicati in Tabella 1. Nella sezione iconografica, la Figura 1 riporta le formule di struttura degli ANPs.

I precursori lipofili del CDV, del cCDV e del HPMPA sono stati sintetizzati dal Prof. Hostetler presso il Dipartimento di Medicina dell'università della California (Beadle et al., 2002; Hartline et al., 2005; Kern et al., 2002), e successivamente utilizzati presso il laboratorio di virologia del Rega Institute di Leuven. I precursori lipofili testati nei confronti del virus orf sono indicati in Tabella 2. Nella sezione iconografica, la Figura 2 riporta le formule di struttura di questi composti.

TABELLA 1. ANPs testati nei confronti del virus orf

Compounds	
1a	(<i>S</i>)-1-[3-Hydroxy-2-(phosphonomethoxy)propyl]cytosine (HPMPC)
1b	(<i>S</i>)-9-[3-Hydroxy-2-(phosphonomethoxy)propyl]adenine (HPMPA)
1c	(<i>S</i>)-9-[3-Hydroxy-2-(phosphonomethoxy)propyl]-2,6-diaminopurine (HPMPDAP)
1d	(<i>S</i>)-9-[3-Hydroxy-2-(phosphonomethoxy)propyl]-3-deazaadenine (3-deaza-HPMPA)
2a	Cyclic-(<i>S</i>)-HPMPC (cHPMPC)
2b	Cyclic-(<i>S</i>)-HPMPA (cHPMPA)
3a	9-[2-(Phosphonomethoxy)ethyl]adenine (PMEA)
3b	9-[2-(Phosphonomethoxy)ethyl]-2,6-diaminopurine (PMEDAP)
3c	9-[2-(Phosphonomethoxy)ethyl]-2-amino-6-chloropurine
3d	9-[2-(Phosphonomethoxy)ethyl]guanine (PMEG)
3e	9-[2-(Phosphonomethoxy)ethyl]-6-dimethylaminopurine
3f	9-(2-Phosphonomethoxyethyl)-2-amino-6-methylpurine
3g	9-(2-Phosphonomethoxyethyl)-2-amino-6-cyclopropylaminopurine
4	N-(3-{2-Amino-9-[2-(phosphonomethoxy)ethyl]purin-6-yl}amino)propanoic acid
5	N-(4-{2-Amino-9-[2-(phosphonomethoxy)ethyl]purin-6-yl}amino)butanoic acid
6	N-(<i>RS</i>)-{2-Amino-9-[2-(phosphonomethoxy)ethyl]purin-6-yl}iminodiacetic acid
7	N-(<i>RS</i>)-{2-Amino-9-[2-(phosphonomethoxy)ethyl]purin-6-yl}serine
8	N-(<i>RS</i>)-{2-Amino-9-[2-(phosphonomethoxy)ethyl]purin-6-yl}aspartic acid
9	N-(<i>RS</i>)-{2-Amino-9-[2-(phosphonomethoxy)ethyl]purin-6-yl}phenylalanine
10	N-(<i>RS</i>)-{2-Amino-9-[2-(phosphonomethoxy)ethyl]purin-6-yl}leucine
11a	N-(<i>RS</i>)-{2-Amino-9-[2-(phosphonomethoxy)ethyl]purin-6-yl}threonine
11b	N-{2-Amino-9-[2-(phosphonomethoxy)ethyl]purin-6-yl}-(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-threonine (L)
11c	N-{2-Amino-9-[2-(phosphonomethoxy)ethyl]purin-6-yl}-(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-threonine (D)
12	N-(<i>RS</i>)-{2-Amino-9-[2-(phosphonomethoxy)ethyl]purin-6-yl}aminomethylsulfonic acid
13	N-(<i>RS</i>)-2-{2-Amino-9-[2-(phosphonomethoxy)ethyl]purin-6-yl}aminoethylsulfonic acid
14	N-(<i>RS</i>)-2-{2-Amino-9-[2-(phosphonomethoxy)ethyl]purin-6-yl}aminoethylphosphonic acid
15	N-(<i>RS</i>)-2-{2-Amino-9-[2-(phosphonomethoxy)ethyl]purin-6-yl}aminoethoxymethylphosphonic acid
16a	2,4-Diamino-6-[2-(phosphonomethoxy)ethoxy]pyrimidine (PMEO-DAPy)
16b	5-Bromo-2,4-diamino-6-[2-(phosphonomethoxy)ethoxy]pyrimidine
17	(<i>R</i>)-{2,4-diamino-3-hydroxy-6-[2-(phosphonomethoxy)propoxy]}pyrimidine (HPMPO-DAPy)
18	Cyclic-(<i>R</i>)-{2,4-diamino-3-hydroxy-6-[2-(phosphonomethoxy)propoxy]}pyrimidine
19a	9-(<i>S</i>)-2-(Phosphonomethoxypropyl)adenine (<i>S</i>)-PMPA
19b	9-(<i>S</i>)-(3-Fluoro-2-phosphonomethoxypropyl)adenine (<i>S</i>)-FPMPA
20a	9-(<i>R</i>)-2-(Phosphonomethoxypropyl)adenine (<i>R</i>)-PMPA
20b	9-(<i>R</i>)-(3-Fluoro-2-phosphonomethoxypropyl)adenine (<i>R</i>)-FPMPA

TABELLA 2. Precursori lipofili testati nei confronti del virus orf

	Compounds
21	Hexadecyloxypropyl-CDV (HDP-CDV)
22	Octadecyloxyethyl-CDV (ODE-CDV)
23	Oleyloxypropyl-CDV (OLP-CDV)
24	1- <i>O</i> -octadecyl-2- <i>O</i> -benzyl-glycerol-CDV (ODBG-CDV)
25	Oleyloxyethyl-CDV (OLE-CDV)
26	Oleyloxyethyl-cCDV (OLE-cCDV)
27	Hexadecyloxypropyl-HPMPA (HDP-HPMPA)
28	Octadecyloxyethyl-HPMPA (ODE-HPMPA)

4. Test di citotossicità

Il test di citotossicità è stato eseguito per valutare l'interferenza dei composti sulla crescita cellulare. Il test è stato realizzato a partire dall'allestimento di piastre da 96 pozzetti, con un numero di cellule per pozzetto in grado di replicare attivamente e raggiungere la confluenza in 4-5 giorni di incubazione. Le piastre sono state preparate seminando 3.5×10^5 e 5×10^5 cellule per pozzetto, rispettivamente per le HEL e le PLK. L'inoculo, pari a 100 μ l per pozzetto, era costituito da terreno di crescita (preparato come indicato nel paragrafo 1). Dopo un'incubazione di 24 o 48 ore, rispettivamente per le HEL e le PLK, necessaria per permettere una corretta adesione delle cellule alla piastra, sono stati aggiunti 100 μ l per pozzetto di diluizioni seriali dei composti. Ciascuna diluizione è stata saggiata in doppio. In ciascuna piastra sono stati allestiti almeno 6 pozzetti di controllo cellule, nei quali sono stati aggiunti 100 μ l per pozzetto di terreno di crescita. Le piastre sono state incubate a 37°C e 5% CO₂ per tre giorni, al termine dei quali il numero di cellule per pozzetto è stato contato con Coulter Counter (Beckman Coulter, Inc.USA). Il contenuto dei pozzetti è stato rimosso ed è stato effettuato un lavaggio con 100 μ l di PBS (Gibco, Invitrogen Corporation, UK), seguito dall'aggiunta di 100 μ l di tripsina/EDTA 0.05% (Gibco, UK). Ad un esame al microscopio ottico rovesciato, quando le cellule sono apparse distaccate dal fondo del pozzetto, si è proceduto alla raccolta delle cellule di una coppia di pozzetti di controllo, quindi sono state risospese in una soluzione isotonica e si è proceduto alla conta cellulare. Sono state eseguite almeno tre diverse misurazioni di coppie di pozzetti di controllo cellule, quindi è stata calcolata la media, e tale numero medio di cellule è stato

suddiviso per due, in modo da rappresentare il 50% della crescita cellulare avvenuta in una coppia di pozzetti di controllo (CC₅₀). Il conteggio nei pozzetti trattati con diluizioni seriali dei composti, è stato eseguito in modo analogo, contando il numero di cellule presenti nella coppia di pozzetti trattati con la stessa diluizione. Conoscendo quindi: a) il numero di cellule in corrispondenza ad una crescita cellulare del 50% (n° CC₅₀), b) la concentrazione del composto e il numero di cellule contate subito al di sotto della CC₅₀ (n°<CC₅₀ e C<CC₅₀), c) la concentrazione del composto e il numero di cellule contate subito al di sopra della CC₅₀ (n°>CC₅₀ e C>CC₅₀), è stata calcolata mediante la formula sottostante la concentrazione del composto in grado di ridurre del 50% la crescita cellulare (CC₅₀):

$$C > CC_{50} = \left[\frac{(C > CC_{50} - C < CC_{50}) * (n^{\circ} > CC_{50} - n^{\circ} CC_{50})}{(n^{\circ} > CC_{50} - n^{\circ} < CC_{50})} \right]$$

La CC₅₀ di ciascun composto è stata calcolata come la media dei risultati di almeno tre prove indipendenti.

5. Prove antivirali in vitro

L'attività dei composti elencati nelle Tabelle 1 e 2 nei confronti del virus orf, è stata valutata sia su cellule HEL che PLK, in modo da confrontarne l'efficacia su tipi cellulari diversi (le HEL sono fibroblasti, mentre le PLK sono cellule epiteliali), che hanno un differente metabolismo e che sono diversamente permissive alla replicazione del virus orf. Gli stessi composti sono stati testati nei confronti dei 5 ceppi di orf virus elencati nel paragrafo 2.

Ai fini della prova, sono state allestite piastre da 96 pozzetti e monostrati cellulari confluenti di HEL o di PLK sono stati infettati con un inoculo virale dal titolo tra 20 e 60 Pfu in 100 µl di volume per pozzetto. Dopo 2 ore di incubazione a 37°C e 5% CO₂, l'inoculo virale è stato rimosso e sostituito con diluizioni seriali di ciascun composto testate in doppio. In ciascuna piastra sono sempre stati inclusi almeno 6 pozzetti di controllo cellule e 12 pozzetti di controllo virus. Le piastre sono state incubate a 37°C e

5% CO₂ e giornalmente monitorate al microscopio ottico rovesciato per controllare la crescita virale. Dopo tre giorni e comunque in presenza del 100% di CPE nel controllo virus, si è proceduti alla lettura della prova che consisteva nella assegnazione a ciascun pozzetto di un punteggio da 0 a 5 a seconda del grado di sviluppo del CPE. La scala a cui fare riferimento nel corso della lettura era la seguente:

- 0 in caso di 0% CPE
- 1 in caso di 20% CPE
- 2 in caso di 40% CPE
- 3 in caso di 60% CPE
- 4 in caso di 80 % CPE
- 5 in caso di 100% CPE

Secondo questa scala quindi i pozzetti del controllo virus avranno uno score pari a 5 in presenza di 100% CPE. Per il successivo calcolo della IC₅₀, cioè della concentrazione del composto in grado di inibire la crescita virale del 50% rispetto ad un controllo virus, si è proceduto a sommare gli score della coppia di pozzetti in cui erano state testate le stesse diluizioni in duplicato. I punteggi che ne derivavano possono essere così riepilogati:

- 0 solo quando ad entrambi i pozzetti è stato attribuito uno score 0
- 1 quando ad un pozzetto è stato attribuito 0 e all'altro 1 (0+1=1)
- 2 quando ad un pozzetto è stato attribuito 0 e all'altro 2 oppure 1 e 1 (la loro somma deve sempre essere 2 (0+2=2 oppure 1+1=2))
- 3 la somma dei due pozzetti deve essere 3 (0+3 oppure 1+2)
- 4 la somma dei due pozzetti deve essere 4 (1+3 oppure 2+2)
- 5 la somma dei due pozzetti deve essere 5 (2+3 oppure 1+4) e corrisponde al 50% CPE
- 6 la somma dei due pozzetti deve essere 6 (3+3 oppure 4+2)
- 7 la somma dei due pozzetti deve essere 7 (2+5 oppure 3+4)
- 8 la somma dei due pozzetti deve essere 8 (4+4 oppure 3+5)
- 9 la somma dei due pozzetti deve essere 9 (4+5)
- 10 la somma dei due pozzetti deve essere 10 (5+5)

Conoscendo quindi: a) la concentrazione del composto e la % di CPE osservata subito al di sotto della IC₅₀ (CPE<IC₅₀ e C<IC₅₀), b) la concentrazione del composto e la % di CPE osservata al di sopra della IC₅₀ (CPE>IC₅₀ e C>IC₅₀), mediante la formula sottostante è stata calcolata la concentrazione del composto in grado di ridurre del 50% la replicazione virale in riferimento ad un controllo virus (IC₅₀):

$$C > IC_{50} = \left[\frac{(C > IC_{50} - C < IC_{50}) * (CPE > IC_{50} - CPE IC_{50})}{(CPE > IC_{50} - CPE < IC_{50})} \right]$$

La IC₅₀ di ciascun composto è stata calcolata come la media dei risultati di almeno tre prove indipendenti eseguite con uno stesso ceppo virale. Successivamente, la IC₅₀ riferita ad ogni composto è stata confrontata tra i 5 ceppi virali al fine di ottenere un valore medio che fosse espressione della sensibilità della specie virale orf virus e non di singoli ceppi virali.

L'indice di selettività (SI) è stato calcolato per ogni composto antivirale, come il rapporto tra la citotossicità espressa come CC₅₀ e l'attività antivirale espressa come IC₅₀.

6. Prova della carica virale

Analogamente alla prova antivirale anche quella della carica virale è stata eseguita utilizzando entrambe le colture cellulari. Nel corso di questa prova sono stati testati solo i composti HPMPC, HPMPDAP e HPMPO-DAPy, e cioè i tre ANPs risultati più attivi nei confronti del virus orf ed anche i più interessanti per un successivo sviluppo di farmaci. La prova consisteva nella valutazione della carica virale in presenza di concentrazioni diverse dei tre composti e a tempi diversi post-infezione.

Sono state allestite piastre da 6 pozzetti sia con le cellule HEL che PLK; e, in presenza di un monostrato confluyente, si è proceduto all'infezione con il ceppo virale NZ2 ad una MOI approssimativamente di 0.5. Dopo due ore di incubazione a 37°C e 5% CO₂, l'inoculo virale è stato rimosso e sostituito con le seguenti diluizioni dei tre composti:

50, 20, 5, 2, 0.5 µg/ml. In ciascuna piastra è sempre stato incluso un pozzetto di controllo virus. Per ciascun composto testato sono state allestite tre piastre in modo da valutare la carica virale a distanza di 24, 72 e 96 ore post-infezione. Al termine di ciascun tempo, il surnatante e il monostrato cellulare infetto sono stati raccolti separatamente per valutare riduzione della carica virale esercitata dalle molecole antivirali sui virioni liberatisi nello spazio extracellulare e su quelli ancora associati alle cellule. Il surnatante è stato raccolto e congelato a -80°C dopo centrifugazione a 1500 rpm. Il monostrato cellulare è stato prima sottoposto a tre lavaggi con 3 ml di PBS al fine di eliminare tracce di surnatante, e quindi è stato anch'esso congelato a -80°C dopo aggiunta a ciascun pozzetto di 3 ml di PBS. In questo modo allo scongelamento delle piastre, si è avuta la rottura delle membrane cellulari e la liberazione nel PBS dei virioni associati alle cellule. Il PBS è stato quindi raccolto e centrifugato a 1500 rpm, e al termine il surnatante è stato utilizzato per le successive prove di titolazione e di PCR quantitativa..

6.1 Titolazione virale

La riduzione della crescita virale in corrispondenza delle diluizioni dei tre composti testati ed in funzione dei diversi tempi post-infezione è stata valutata tramite titolazione virale, sia per il virus extracellulare che per quello associato alle cellule. La titolazione è stata eseguita come indicato nel paragrafo 2.1 e il titolo è stato espresso in Pfu/ml.

6.2 Quantificazione DNA virale

La PCR quantitativa è stata utilizzata per quantificare la riduzione del DNA virale in corrispondenza delle diluizioni dei tre composti testati ed in funzione dei diversi tempi post- infezione, a partire dal virus libero nel surnatante e da quello associato alle cellule. Da entrambi i campioni si è quindi proceduto all'estrazione del DNA virale tramite QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), e l'estratto è stato quindi conservato a -20°C. Ai fini della quantificazione del DNA virale, si è utilizzata la metodica Real Time basata sulla tecnologia TaqMan[®] (Gallina et al., 2006). La coppia di primers e la sonda utilizzate nel corso delle reazioni sono state disegnate utilizzando Primer Express[®] Software versione 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA) nell'ambito di una regione del genoma del virus orf altamente conservata e delimitata

dalla coppia di primers PPP-1 and PPP-4 (Inoshima et al., 2000). Le sequenze nucleotidiche dei primers forward e reverse sono rispettivamente 5' CAGCAGAGCCGCGTCAA 3' e 5' CATGAA-CCGCTACAACACCTTCT 3', mentre quella della sonda 5' CACCTTCGGCTCCAC 3'. La sonda utilizzata era marcata all'estremità 5' ad un fluoroforo FAM (FAM, 6-carboxy-fluorescein) e all'estremità 3' con una molecola detta Minor Groove Binder (MGB) che ha la proprietà di legarsi specificamente al solco minore dell'elica aumentando la specificità del legame con il template.

La Real Time è stata eseguita con lo strumento ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA). La reazione di PCR è stata eseguita in un volume finale di 25 µl, utilizzando 12.5 µl di TaqMan[®] Universal PCR Master Mix no UNG 2x buffer (Applied Biosystems, Branchburg, NJ), 900 nmol di ciascun primer, 200 nmol di sonda e 5 µl di DNA.

Un plasmide, contenente la regione target compresa tra la coppia di primer PPP1 e PPP4, è stato costruito a partire da un prodotto PCR che è stato successivamente clonato nel vettore pCR[®] 4-TOPO vector (TOPO TA Cloning[®] kit, Invitrogen, Groningen, Netherlands). Il plasmide è stato quindi purificato e il corretto inserimento del frammento PCR è stato verificato in seguito a sequenziamento. In ogni reazione di Real Time, diluizioni in base dieci del plasmide sono state utilizzate per la costruzione di una curva standard. L'amplificazione è stata eseguita partendo da 50°C per 2 min., e 95°C per 10 min., seguiti da 45 cicli a 95°C per 15 sec. e 60°C per 1 min.

Ciascun campione è stato ripetuto in triplicato nell'ambito della stessa reazione e la quantità di DNA finale è stata calcolata come media delle tre misurazioni.

7. Allestimento di colture organotipiche di cute ovina

Le colture organotipiche o raft cultures sono in grado di mimare la morfologia e la fisiologia dei tessuti da cui le cellule sono state prelevate, attraverso l'elevata capacità di differenziazione di tali cellule sotto l'effetto di fattori di crescita e di proliferazione cellulare. In questo caso le colture organotipiche sono state applicate alla riproduzione *ex vivo* della cute ovina, in modo da testare l'efficacia di composti antivirali in un sistema molto simile a quello *in vivo*.

Come nella pelle, anche nei raft cutanei si distinguono uno strato epidermico superficiale ed uno dermico sottostante con fibroblasti che svolgono funzioni trofiche per le cellule epiteliali (Figura 1).

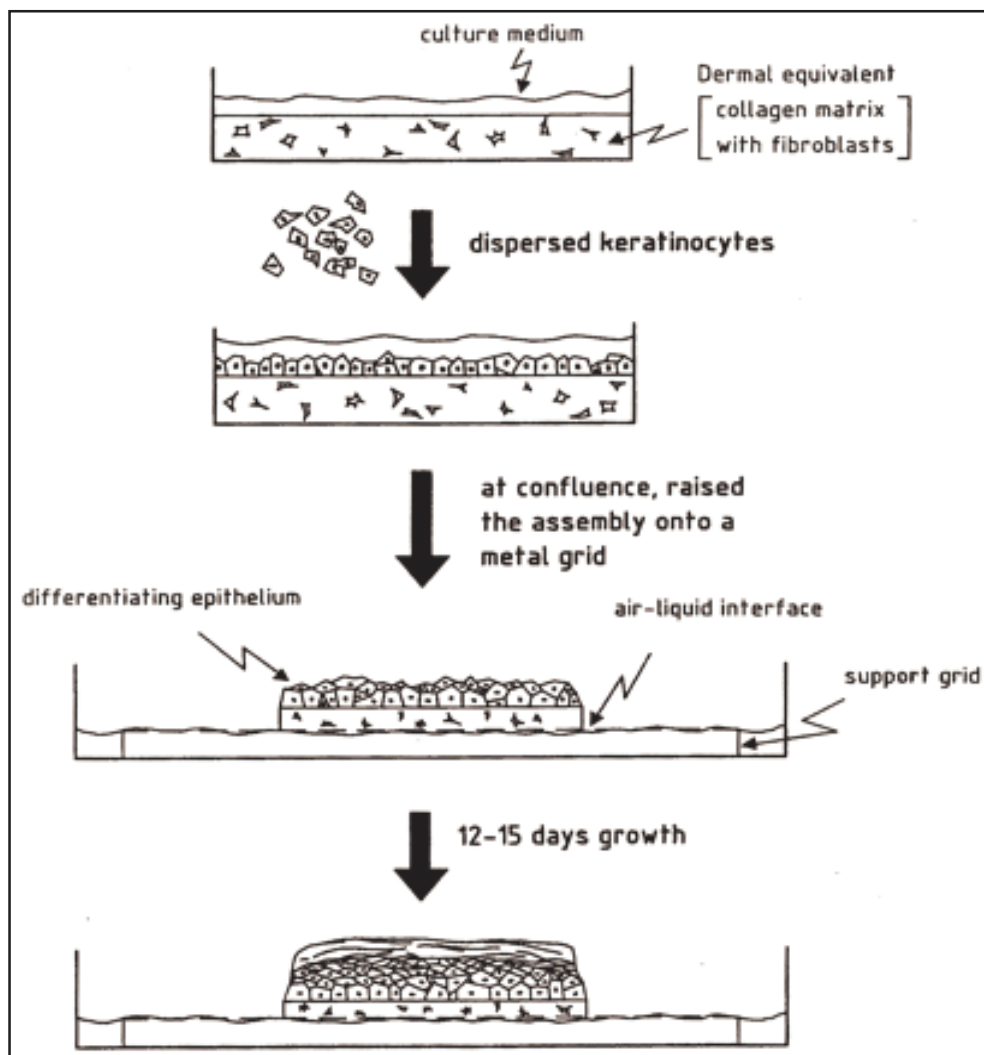


Figura 1: Illustrazione rappresentante le fasi della preparazione delle colture organotipiche cutanee.

A questo scopo una linea continua di fibroblasti di topo 3T3 J2 è stata coltivata a 37°C e 5% di CO₂, con terreno di mantenimento costituito da D-MEM al 10% SFB, supplementato con 2 mM di L-glutamina, 1 mM di sodio piruvato, 7.5% di sodio bicarbonato. Nell’allestimento dei “collagen bed” che fungono da supporto per il raft, è stata preparata una matrice di collagene costituita da reconstitution buffer 10x (soluzione di 22% di NaHCO₃, 2% di NaOH e 47.6% di HEPES), Ham’s F-12 10x (Gibco, Invitrogen Corporation, UK), collagene di tipo I (Becton Dickinson, Pharmingen,

San Diego, CA) e fibroblasti 3T3 J2. La matrice di collagene è stata distribuita in una piastra da 24 pozzetti (1 ml di volume per pozzetto) e fatta solidificare a 37°C e 5% CO₂. Sulla superficie di ciascun collagen bed, sono stati posti 1×10^5 PLK sospese in 1 ml di raft medium. La piastra è stata quindi posta nell'incubatore a 37°C e 5% CO₂ per 24-48 ore. Al raggiungimento della confluenza dei cheratinociti sul cuscino di collagene, ciascun raft è stato sollevato dal pozzetto della piastra e adagiato su una griglia metallica all'interfaccia aria e terreno di coltura (raft medium). In questo modo i fattori nutrizionali e di crescita presenti nel terreno di coltura, per diffusione attraverso la matrice di collagene sono giunti ai cheratinociti consentendone lo sviluppo e la differenziazione. Ogni 2 giorni si è proceduto alla sostituzione del raft medium. Dopo un periodo di differenziazione di 10-12 giorni i raft cultures sono stati sollevati dalle griglie e fissati in formalina 10%, inclusi in paraffina, e le sezioni istologiche sono state sottoposte a colorazione con ematossilina-eosina.

7.1 Infezione dei raft e aggiunta dei composti antivirali

L'infezione delle colture organotipiche con il virus orf, è stata eseguita al sesto giorno di differenziazione, utilizzando il ceppo di orf virus NZ2 (360 Pfu/100 µl/ raft). L'inoculo virale è stato posto sulla superficie del raft. Contemporaneamente all'infezione, si è proceduto all'aggiunta dei composti. Solo le tre molecole HPMPC, HPMPDAP e HPMPO-DAPy sono state testate con il sistema dei raft cutanei. Il terreno di coltura è stato rimosso ed è stato sostituito con raft medium contenente diverse diluizioni dei composti (50, 20, 5, 2 µg/ml). Nell'ambito della stessa prova sono stati allestiti raft per il controllo di una corretta differenziazione cellulare ed altri raft per il controllo del normale sviluppo dell'effetto citopatico. I tre composti sono stati testati due volte in esperimenti indipendenti. Inoltre per correlare l'aspetto istopatologico dei raft con la riduzione della crescita virale, ogni composto è stato testato in duplicato nello stesso esperimento. In questo modo al termine di ogni prova dopo 4-6 giorni dall'infezione, un raft è stato fissato in formalina 10% per l'esame istopatologico, e l'altro è stato immerso in PBS sterile e quindi congelato a -20°C. Allo scongelamento del raft, si è avuta la rottura delle membrane cellulari e la liberazione del virus nel PBS. Il PBS è stato successivamente centrifugato a 1500 rpm e il surnatante è stato utilizzato

per la titolazione e per la quantificazione del DNA virale. La titolazione e la Real Time PCR sono state eseguite come indicato rispettivamente nei paragrafi 2.1 e 6.2.

B. MATERIALI E METODI VIRUS DEL CIMURRO

1. Substrato cellulare

Ai fini della replicazione del virus del cimurro e delle successive prove antivirali sono state utilizzate le cellule VERO, una linea continua di cellule di tipo epiteliale di rene di scimmia. Le cellule VERO sono state propagate in D-MEM (Gibco, Invitrogen Corporation, UK), arricchito con 10% siero fetale bovino (SFB), 2 mM di L-glutamina (Gibco, Invitrogen Corporation, UK), 1 mM di sodio piruvato (Gibco, Invitrogen Corporation, UK), 7.5% di sodio bicarbonato (Gibco, Invitrogen Corporation, UK), e sono state coltivate a 37°C e 5% di CO₂.

2. Virus

Sono stati utilizzati il ceppo Bussel e Ondestepoort, entrambi ben adattati in coltura e in grado di crescere sulle cellule VERO dando un caratteristico effetto citopatico a sincizi cellulari. Per entrambi i ceppi di cimurro sono stati utilizzati metodi di crescita in fiasche da coltura cellulare e di preparazione degli stock virali analoghi a quelli descritti per il virus orf (vedi paragrafo 2, capitolo materiali e metodi del virus orf).

3. Titolazione virale

La titolazione dei ceppi Bussel e Ondestepoort è stata eseguita come già descritto per il virus orf. In questo caso però la titolazione è stata eseguita su cellule VERO e il titolo finale è stato espresso in TCID₅₀/ml, corrispondente alla dose infettante il 50% della coltura cellulare. Le formule matematiche utilizzate per il calcolo della TCID₅₀ sono le seguenti:

$$\frac{(\% \text{ pozzetti infetti oltre il } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ pozzetti infetti oltre il } 50\%) - (\% \text{ pozzetti infetti sotto il } 50\%)}$$

Il risultato ottenuto da questa formula viene definito distanza proporzionale e viene utilizzato per il calcolo della dose infettante ID₅₀:

$ID_{50} = (\log \text{ della diluizione con CPE oltre il 50\%}) + (\text{distanza proporzionale} * \log \text{ del fattore di diluizione})$

Il reciproco della ID₅₀ costituisce il valore della TCID₅₀.

4. Composti antivirali

I composti testati nei confronti dei due ceppi del virus del cimurro sono la ribavirina (RBV) (ICN Biomedicals, Inc. Ohio) e l'EICAR (gentilmente fornita dal Prof. Snoeck Robert, Rega Instituut for Medical Research, KU Leuven, Belgio).

5. Test di citotossicità

La citotossicità è stata determinata per valutare l'interferenza della RBV e dell'EICAR nei confronti delle cellule VERO. La citotossicità è stata determinata sia nei confronti delle cellule VERO in replicazione, allestendo una piastra da 96 pozzetti con 3×10^3 VERO in 100 µl per pozzetto corrispondente al 20-30% di confluenza, sia nei confronti di cellule VERO stazionarie, utilizzando una piastra da 96 pozzetti con cellule VERO a confluenza. Sono state preparate diluizioni per raddoppio dei due composti, successivamente 100 µl di ciascuna diluizione sono in seguito state aggiunte ad ogni pozzetto in doppio. In ciascuna piastra sono stati allestiti almeno 6 pozzetti di controllo cellule, nei quali sono stati aggiunti 100 µl per pozzetto di terreno di crescita. Le piastre sono state incubate per 3 giorni a 37°C e 5% di CO₂ e la citotossicità è stata valutata con un test colorimetrico che sfrutta la capacità delle cellule vitali di metabolizzare a livello mitocondriale il 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Sigma, Missouri) (Hussain et al., 1993; Denizot e Lang, 1986). Al termine dell'incubazione, il terreno di coltura della piastra è stato rimosso ed è stato eseguito un lavaggio di ciascun pozzetto con 100 µl di PBS. Rimosso il PBS, sono stati aggiunti 50 µl per pozzetto di una soluzione di MTT al 1% (in terreno di coltura senza SFB e senza rosso fenolo). La piastra è stata così incubata per 3-4 ore in termostato per permettere alle cellule di metabolizzare l'MTT. Sono stati quindi aggiunti 50 µl per pozzetto di

etanolo 75% in grado di dissolvere i cristalli di formazan. La reazione colorimetrica è stata successivamente valutata mediante lettura allo spettrofotometro con filtro da 570 nm. La citotossicità è stata definita sulla base del valore di CC_{50} che in questo caso corrisponde alla concentrazione di composto che inibisce la vitalità cellulare del 50% sulla base del test MTT. In particolare, conoscendo: a) l'assorbanza in corrispondenza ad una crescita cellulare del 50% ($A_{CC_{50}}$), b) la concentrazione del composto e l'assorbanza subito al di sotto della CC_{50} ($A < CC_{50}$ e $C < CC_{50}$), c) la concentrazione del composto e l'assorbanza subito al di sopra della CC_{50} ($A > CC_{50}$ e $C > CC_{50}$), è stata calcolata mediante la formula sottostante la concentrazione del composto in grado di ridurre del 50% la crescita cellulare (CC_{50}):

$$C > CC_{50} - \left[\frac{(C > CC_{50} - C < CC_{50}) * (A > CC_{50} - A_{CC_{50}})}{(A > CC_{50} - A < CC_{50})} \right]$$

La CC_{50} della RBV e dell'EICAR è stata calcolata come la media dei risultati di numerose prove indipendenti.

6. Prove antivirali in vitro

L'attività antivirale della RBV e dell'EICAR nei confronti dei ceppi Bussel e Ondestepoort è stata determinata allestendo piastre da 96 pozzetti con cellule VERO, che una volta a confluenza sono state infettate con il virus del cimurro. Le modalità di esecuzione della prova antivirale e del successivo calcolo della IC_{50} sono analoghe a quanto descritto per il virus orf. La IC_{50} della RBV e dell'EICAR è stata calcolata come la media dei risultati di numerose prove indipendenti sia nei confronti del ceppo Bussel che Ondestepoort.

7. Studi del meccanismo d'azione della RBV e dell'EICAR

7.1 Prova della carica virale

La prova della carica virale è stata eseguita sulle cellule VERO valutando l'effetto di diverse concentrazioni di RBV e di EICAR nei confronti del ceppo Bussel del cimurro. In particolare le concentrazioni testate sono state: 80, 40, 20 e 10 µg/ml di RBV e 20, 10, 5 e 2 µg/ml di EICAR. I tempi post-infezione ai quali si è provveduto alla raccolta del surnatante e delle cellule infette sono stati dopo 24, 48 e 72 ore. L'infezione delle piastre è stata eseguita con il ceppo Bussel ad una MOI di 0.05. Le modalità di esecuzione della prova sono state precedentemente descritte. La carica virale è stata valutata in seguito a titolazione virale e a PCR quantitativa.

7.1.1 Titolazione virale

La titolazione del virus presente nel surnatante e nelle cellule infette della prova di carica virale, è stata eseguita come indicato nel paragrafo 3 di questo capitolo. I titoli virali dei diversi campioni testati sono stati espressi in TCID₅₀/ml.

7.1.2 Quantificazione RNA virale

La quantificazione dell'RNA virale presente nei campioni della prova della carica virale è stata eseguita previa estrazione dell'RNA tramite Tri ReagentTM (Sigma, Missouri) contenente guanidina tiocianato e fenolo in grado di lisare le membrane cellulari. Partendo da 300 µl di campione è stato aggiunto 1 ml di Tri ReagentTM. Dopo centrifugazione a 12000 g per 10 minuti a 4°C, al surnatante sono stati aggiunti 200 µl di cloroformio e l'RNA è stato quindi separato in una fase acquosa soprastante dal DNA e dalle proteine. Successivamente, l'RNA è stato purificato con l'aggiunta di 500 µl di isopropanolo e, dopo centrifugazione a 12000 g per 10 minuti a 4°C, l'RNA è precipitato sotto forma di un pellet bianco. Il pellet di RNA è stato quindi ulteriormente lavato con l'aggiunta di 1 ml di etanolo 75% in seguito a centrifugazione a 7500 g per 5 minuti a 4°C, per poi essere infine risospeso in acqua Dnasi ed Rnasi-free. L'RNA virale è stato così conservato a -80°C.

Ai fini della quantificazione del RNA virale, è stata utilizzata una Real Time One-Step RT-PCR nella quale avvengono due reazioni, quella di retrotrascrizione e quella di quantificazione del cDNA, in una unica provetta. La coppia di primers e la sonda

utilizzate nella PCR quantitativa sono state disegnate nell'ambito del gene P del virus del cimurro al fine di amplificare una regione target di 119 nucleotidi. Le sequenze nucleotidiche del primer forward e reverse sono rispettivamente 5'-GTCGGTAATCGAGGATTCGAGAGAG-3' e 5'-GCCGAAAGAATATCCCCAGTT-AG-3', mentre la sequenza della sonda è 3'-AGCACTGAGGATTCTGGCGAAGAT-5'. La sonda utilizzata era marcata all'estremità 5' ad un fluoroforo FAM (FAM, 6-carboxy-fluorescein) e all'estremità 3' con una molecola detta Minor Groove Binder (MGB) che ha la proprietà di legarsi specificamente al solco minore dell'elica aumentando la specificità del legame con il template. La Real Time è stata eseguita con lo strumento RotorGene (Corbett). La reazione di PCR è stata eseguita in un volume finale di 25 µl, utilizzando 12.5 µl di 2x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix (Qiagen), 900 nmol di ciascun primer, 200 nmol di sonda, 0.5 µl di QuantiTect RT Mix (Qiagen) e 2.5 µl di RNA. Nell'ambito di ciascuna Real Time One-Step RT-PCR è stato incluso uno standard interno rappresentato da RNA virale, quantificato mediante spettrofotometro, al fine di costruire una curva standard di riferimento. Lo standard RNA, costituito da RNA del ceppo Bussel estratto da una coltura cellulare infetta, è stato diluito in base dieci e ciascuna diluizione è stata conservata a -80°C per essere scongelata una sola volta al momento della preparazione della Real Time. L'amplificazione è stata eseguita con una prima fase di retrotrascrizione a 50°C per 30 minuti e 95°C per 15 minuti, seguita da 45 cicli di amplificazione costituiti da una denaturazione a 94°C per 15 secondi e da un'unica fase di annealing and elongation a 60°C per 60 secondi.

Nell'ambito della stessa reazione sono stati amplificati in doppio sia i campioni da quantificare che le diluizioni dello standard a RNA.

7.2 Prova del time of addition

Il time of addition è una prova antivirale nella quale le diluizioni della RBV e dell'EICAR vengono a tempi diversi dopo l'infezione del monostrato cellulare con il virus del cimurro. I risultati di questa prova forniscono un'indicazione del momento in cui le due molecole agiscono durante il ciclo replicativo del virus del cimurro. Sono state allestite piastre da 96 pozzetti con cellule VERO che sono state incubate a 37°C e 5% di CO₂ fino al raggiungimento della confluenza. L'infezione è stata eseguita con il

ceppo Bussel ad una MOI di 0.1. Le piastre sono state suddivise in modo da identificare 11 parti che corrispondono ai tempi post-infezione nei quali sono stati aggiunti i composti antivirali: tempo 0 (che corrisponde all'aggiunta dei composti nello stesso momento dell'infezione), dopo 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24 e 48 ore. In ciascuna delle 11 parti, sono state incluse le diluizioni in doppio della RBV (da 100 a 3.12 µg/ml, diluizioni per raddoppio), le diluizioni in doppio dell'EICAR (da 20 a 0.62 µg/ml, diluizioni per raddoppio), e i pozzetti di controllo cellule e di controllo virus. Le piastre sono state incubate a 37°C e 5% di CO₂ fino al raggiungimento del 100% di effetto citopatico nei pozzetti di controllo virus. La lettura della prova è stata eseguita come una prova antivirale standard ed in seguito è stata calcolata la IC₅₀ in corrispondenza di ciascun tempo post-infezione in cui la RBV e l'EICAR sono stati aggiunti. Dal confronto dei valori di IC₅₀ ottenuti per uno stesso composto, al variare del tempo, vengono ottenuti i dati relativi all'efficacia del composto al progredire dell'infezione in coltura.

7.3 Prova antivirale in presenza dei nucleosidi

Uno dei meccanismi d'azione più noti della RBV e dell'EICAR è l'inibizione dell'enzima IMPDH cellulare con conseguente riduzione del pool intracellulare di GMP, GDP e GTP. E' noto che la presenza di guanosina nel terreno di coltura riduca ed in alcuni casi inibisca, l'attività antivirale della RBV e dell'EICAR (De Clercq et al., 1991, Leyssen et al., 2005). Per dimostrare questo meccanismo d'azione anche nei confronti del virus del cimurro, sono state eseguite prove antivirali in presenza di guanosina e degli altri nucleosidi, in particolare citidina, adenosina e uridina (Sigma, Missouri). Ciascun nucleoside è stato testato nei confronti dei ceppi Bussel e Ondestepoort, da solo e in presenza di RBV e EICAR,. Sono state allestite piastre da 96 pozzetti con cellule VERO che sono state incubate a 37°C e 5% di CO₂ fino al raggiungimento della confluenza. L'infezione è stata eseguita con 100 µl di virus che è stato rimosso dopo 2 ore di incubazione a contatto con le cellule. Sono state allestite diluizioni per raddoppio dei vari nucleosidi ed in seguito sono state aggiunte in doppio alla piastra, sia in presenza che in assenza della RBV e dell'EICAR. Le piastre sono state incubate a 37°C e 5% di CO₂ fino al raggiungimento del 100% di effetto citopatico nel controllo virus. La lettura della prova è stata eseguita come descritto nel caso di una

prova antivirale standard con il calcolo di valori di IC₅₀. La IC₅₀ della RBV e dell'EICAR in presenza dei vari nucleosidi è stata calcolata come la media dei risultati di numerose prove indipendenti sia nei confronti del ceppo Bussel che Ondestepoort.

8. Studio del ciclo replicativo del cimurro

Per studiare gli antivirali ed il loro meccanismo d'azione, occorre conoscere il ciclo di replicazione del virus in coltura. Sono quindi state studiate le fasi che caratterizzano la replicazione del virus del cimurro nelle cellule VERO. A questo scopo sono state allestite piastre da 6 pozzetti con cellule VERO, e una volta raggiunta la confluenza, si è proceduti all'infezione con il ceppo Bussel ad una MOI di 0.06. Dopo 2 ore d'incubazione a 37°C e 5% di CO₂, l'inoculo virale è stato rimosso e ciascun pozzetto è stato lavato con PBS al fine di rimuovere le particelle virali non ancora penetrate all'interno delle cellule. In ciascun pozzetto sono stati aggiunti 3 ml di terreno di coltura al 2% di SFB. A distanza di 8, 16, 24, 48 e 72 ore dall'infezione sono stati raccolti separatamente il surnatante ed il monostrato cellulare infetto per valutare la presenza di virus infettante ed RNA virale presente rispettivamente nello spazio extracellulare e all'interno delle cellule. Il surnatante è stato raccolto e congelato a -80°C dopo centrifugazione a 1500 rpm. Il monostrato cellulare è stato prima sottoposto a tre lavaggi con 3 ml di PBS al fine di eliminare tracce di surnatante, e quindi è stato anch'esso congelato a -80°C dopo aggiunta a ciascun pozzetto di 3 ml di PBS. In questo modo allo scongelamento delle piastre, si è avuta la rottura delle membrane cellulari e la liberazione nel PBS dei virioni associati alle cellule. Il PBS è stato quindi raccolto e centrifugato a 1500 rpm, e al termine il surnatante è stato utilizzato per le successive prove di titolazione e di PCR quantitativa.

8.1 Titolazione virale

La titolazione del virus presente nel surnatante e nelle cellule infette, è stata eseguita come indicato nel paragrafo 3 di questo capitolo. I titoli virali dei diversi campioni testati sono stati espressi in TCID₅₀/ml.

8.2 Quantificazione RNA virale

L'estrazione dell'RNA virale dei campioni della prova del ciclo replicativo è stata eseguita seguendo il protocollo indicato nel kit NucleoSpin[®] RNA II (Macherey-Nagel) partendo da 100 µl di volume di campione. L'RNA estratto è stato conservato a -80°C. Sia dal surnatante che dalle cellule infette, è stato quantificato l'RNA virale distinto in RNA genomico, antigenomico ed mRNA, in modo da comprendere l'attività funzionale dell'enzima virale RNA polimerasi-RNA dipendente. La quantificazione dell'RNA è stata eseguita utilizzando due diversi geni target, il gene N ed il gene P al fine di chiarire la cinetica di accumulo di tali geni durante la replicazione del virus del cimurro in coltura cellulare. Sono state utilizzate diverse tecniche di retrotrascrizione, distinte in base al tipo di primer utilizzato: in particolare utilizzando il primer forward del gene N o del gene P è stato amplificato il genoma virale (con polarità negativa), utilizzando il primer reverse del gene N o del gene P è stato amplificato l'antigenoma virale e l'mRNA (entrambi con polarità), mentre utilizzando gli oligo(dT) è stato amplificato solo l'mRNA virale. Le sequenze nucleotidiche del primer forward e reverse del gene N sono rispettivamente 5'-AACTATGTATCCGGCTCTTGG-3' e 5'-CAAGATAACCATGTACGGTGC-3'. Le sequenze del primer forward e reverse del gene P sono rispettivamente 5'-GTCGGTAATCGAGGATTCGAGAGAG-3' e 5'-GCCGAAAGAATATCCCCAGTTAG-3'.

La retrotrascrizione è stata effettuata con GeneAmp[®] RNA PCR (Applied Biosystems) in un volume finale di 20 µl di reazione, utilizzando 4 µl di Buffer 5x, 2 µl di soluzione MgCl₂, 2 µl di DTT, 2 µl di DNTP, 0.5 µl di primer (il primer utilizzato era diverso a seconda di ciò che si voleva amplificare: oligo (dT), primer forward del gene N o P e reverse del gene N o P), 0.5 µl di RNasi inibitore, 0.3 µl di reverse trascrittasi, 3.7 µl di acqua e 5 µl di RNA. La retrotrascrizione è stata eseguita in un solo step a 45°C per 15 minuti, utilizzando i primer forward e reverse, mentre con gli oligo (dT) è stata eseguita una preincubazione a 25 °C per 10 minuti, seguita da 15 minuti a 45°C. La quantificazione è stata eseguita utilizzando la tecnica del Syber Green ed in particolare con il Syber[®] Premix Ex Taq[™] (Takara) utilizzando lo strumento RotorGene (Corbett). La reazione è stata eseguita in un volume finale di 25 µl utilizzando 12.5 µl di Syber[®] Premix Ex Taq[™] 2x, 0.5 µl di primer forward e 0.5 µl di primer reverse (rispettivamente del gene N o del gene P), 9.5 µl di acqua e 2 µl di cDNA. La reazione è

stata eseguita con un'iniziale denaturazione a 95°C per 10 minuti, seguiti da 40 cicli a 95°C per 45 secondi, 60°C per 45 secondi e 72°C per 15 secondi. Ai fini della quantificazione dell'acido nucleico virale, sono stati utilizzati due plasmidi a DNA, uno per il gene N e uno per il gene P, al fine di costruire una curva standard nell'ambito di ciascuna Real Time Syber Green. Il plasmide per il gene N è stato realizzato con il pCR T7/CT TOPO CLONING (INVITROGEN) utilizzando come inserto il prodotto PCR ottenuto amplificando una regione del gene N compresa tra il primer START (5'-ATGGCTAGCCTTCTTAAAAGC-3' e il primer P6 descritto da Frisk et al., 1999 (5'-CTTAGTAAGCATCCTCATCTTGGC-3'). Il plasmide per il gene P è stato ottenuto utilizzando il pCR 4-TOPO TA CLONING Kit for Sequencing (INVITROGEN) utilizzando come inserto il prodotto PCR amplificato usando i primers DMV1-DMV2 descritti da Barret et al., 1993 (DMV1 5'-ATGTTTATGATCACAGCGGT-3' e DMV2 5'-ATTGGGTTGCACCACTTG).

Nell'ambito della stessa reazione sono stati amplificati in doppio sia i campioni da quantificare che le diluizioni in base dieci dello standard plasmidico.

A. RISULTATI ORF VIRUS

1. Test di citotossicità e attività antivirale con gli ANPs.

I risultati ottenuti con i gli ANPs sono presentati in Tabella 1.

Nessuna differenza nell'attività antivirale dei composti è stata rilevata nei confronti dei diversi ceppi di orf virus utilizzati, nè sulle cellule HEL nè sulle PLK. I risultati sono stati espressi come la media e la deviazione standard dei valori di IC_{50} ottenuti con i diversi ceppi.

Quando i composti sono stati testati sulle HEL, sono stati ottenuti valori di IC_{50} notevolmente inferiori a quelli calcolati sulle PLK. HPMPC (composto 1 a), HPMPA (composto 1b), 3-deaza-HPMPA (composto 1d) e HPMPDAP (composto 1c), sono risultati i più attivi nell'ambito degli ANPs testati, con indice di selettività (SI) sulle HEL compresi tra 50.5 (composto 1d) e 99.7 (composto 1 a) e sulle PLK tra 12 (composto 1b) e ≥ 19.9 (composto 1c). Confrontando i risultati ottenuti con i vari composti, è stato notato che entrambe le forme cicliche degli ANPs, cioè cHPMPC (composto 2 a) e cHPMPA (composto 2b) sono risultate più tossiche e meno attive dei loro composti di origine.

Nell'ambito della nuova sotto-famiglia degli "open-ring" ANPs (composti 16 a, 16b, 17 e 18), i composti 16 a e 16b hanno mostrato una scarsa attività antivirale verso il virus orf sulle cellule HEL mentre non sono risultati attivi sulle PLK ($IC_{50} > 50 \mu\text{g/ml}$). Al contrario, HPMPO-DAPy (composto 17) ha mostrato un'ottima efficacia antivirale sia sulle HEL ($IC_{50} 0.51 \pm 0.15 \mu\text{g/ml}$) che sulle PLK ($IC_{50} 5.45 \pm 1.85 \mu\text{g/ml}$), con alti SI su entrambe le colture cellulari (39.2 nelle HEL e 6.4 nelle PLK). La forma ciclica dell'HPMPO-DAPy (composto 18) non ha invece mostrato efficacia antivirale.

Come già osservato verso altri poxvirus, anche verso il virus orf la molecola PMEa (composto 3 a) e il PMEDAP (composto 3b), non hanno mostrato attività antivirale. Tra le molecole che derivano dal PMEDAP con residui diversi legati in posizione N6 (composto 3c, 3d, 3f, 3g, 12, 13, 14, 15), il composto 12 ha mostrato la massima tossicità tra tutti gli ANPs testati sia sulle HEL che sulle PLK. Bassi indici di selettività dovuti ad una elevata tossicità, ma anche ad una scarsa attività antivirale, sono stati rilevati anche per i composti 3c, 3d e 3e.

TABELLA 1. Attività antivirale e citotossicità degli ANPs testati nei confronti del virus orf

Composti	Attività degli ANPs sulle cellule HEL			Attività degli ANPs sulle cellule PLK		
	IC ₅₀ (µg/ml) ^a	CC ₅₀ (µg/ml) ^b	SI ^c	IC ₅₀ (µg/ml) ^a	CC ₅₀ (µg/ml) ^b	SI ^c
1a , HPMPc	0.33 ± 0.12	32.9	99.7	2.18 ± 1.82	≥ 38.6	≥ 17.7
1b , HPMPa	0.08 ± 0.03	3.6	45	0.86 ± 0.43	10.4	12
1c , HPMPDAP	0.43 ± 0.16	23.6	54.9	1.8 ± 0.85	≥ 35.9	≥ 19.9
1d , 3-deaza-HPMPa	0.22 ± 0.04	11.1	50.5	1.49 ± 0.38	≥ 22.2	≥ 14.9
2a , cHPMPc	1.04 ± 0.27	89.7	86.3	3.61 ± 1.88	> 50	> 13.8
2b , cHPMPa	0.43 ± 0.15	6.3	14.7	1.07 ± 0.3	≥ 8.6	≥ 8
3a , PMEa	> 50	41.9	< 0.8	> 50	13.05	< 0.3
3b , PMEDAP	> 50	27.1	< 0.5	> 50	6.15	< 0.12
3c	1.05 ± 0.7	1	0.9	1.72 ± 0.53	0.15	0.09
3d , PMEG	2.62 ± 0.88	7.25	2.8	5.98 ± 1.83	0.72	0.12
3e	1.82 ± 0.72	3.9	2.1	1.41 ± 0.2	0.44	0.3
3f	32	34.7	1.08	≥ 50	> 50	1
3g	0.6 ± 0.14	< 0.5	< 0.83	1.7 ± 0.8	6.3	3.7
4	> 50	> 50	1	> 50	> 50	1
5	> 50	> 50	1	> 50	> 50	1
6	> 50	> 50	1	> 50	> 50	1
7	1.5 ± 0.77	2.2	1.5	10.12 ± 6.7	0.67	0.07
8	2.04 ± 1	2.75	1.3	16.94 ± 6.63	0.95	0.06
9	8.5 ± 4.09	> 50	> 5.9	28.8 ± 10.7	23	0.79
10	2.16 ± 0.65	2.8	1.3	10.37 ± 7.11	1.19	0.11
11a	0.87 ± 0.26	1.8	2	5.71 ± 2.68	0.35	0.06
11b	0.46 ± 0.04	3.6	7.9	4.9 ± 1.2	0.2	0.04
11c	3.08 ± 0.68	9.2	2.9	15.1 ± 5.8	0.2	0.01
12	0.12 ± 0.06	0.17	1.4	0.43 ± 0.17	0.035	0.08
13	> 50	170.8	< 3.4	> 50	109.2	< 2.2
14	8.38 ± 5.77	> 50	> 5.96	21.4 ± 0.7	5	0.23
15	> 50	> 50	1	> 50	> 50	1
16a , PMEo-DAPy	25.4 ± 4.3	18.3	0.7	> 50	37.35	< 0.7
16b	14.17 ± 2.2	14	0.9	> 50	3.35	< 0.07
17 , HPMPo-DAPy	0.51 ± 0.15	20	39.2	5.41 ± 1.85	34.4	6.4
18	3.13 ± 1.41	26.1	8.3	16 ± 2.1	> 50	> 3.1
19a , (S)-PMPa	> 50	> 50	1	> 50	> 50	1
19b , (S)-FPMPa	> 50	> 50	1	> 50	> 50	1
20a , (R)-PMPa	> 50	> 50	1	> 50	> 50	1

^a I valori sono espressi come la media ± deviazione standard delle IC₅₀ calcolate nei confronti dei 5 ceppi di orf virus, ciascun ceppo è stato utilizzato per almeno due esperimenti tra di loro indipendenti.

^b I valori sono espressi come la media di due prove indipendenti di citotossicità.

^c SI = CC₅₀/IC₅₀

Tra le molecole che hanno un aminoacido legato alla posizione N6, solo i composti 4, 5 e 6, si sono mostrati inerti, senza svolgere attività antivirale verso il virus orf e nemmeno attività citotossica sulle due colture cellulari. Le altre molecole di questo gruppo (composto 7, 8, 9, 10, 11 a, 11b, 11c) hanno esibito attività antivirale con IC₅₀ sulle cellule HEL nel range tra 0.87 a 2.16 µg/ml. La maggiore efficacia nei confronti del virus orf è stata osservata con il composto 11 a che contiene come residuo in N6 una forma racemica della treonina. Testando anche l'attività antivirale dei due enantiomeri, è stata chiaramente osservata la più spiccata attività biologica dell'L-treonina (composto 11b) rispetto alla D-treonina (composto 11c): nelle HEL e nelle PLK, i valori di IC₅₀ erano 6.7 e 3.3 volte più bassi con L-treonina. Nonostante l'elevata attività antivirale, gli indici di selettività erano molto bassi (intorno a 1 nelle HEL e a 2 nelle PLK), indicando che l'inibizione esercitata da queste molecole sulla crescita del virus orf, era più legata ad un'interferenza sul metabolismo della cellula ospite più che su uno specifico meccanismo antivirale.

2. Test di citotossicità e attività antivirale con i precursori lipofili del CDV, cCDV e HPMPA

La tossicità dei composti lipofili è apparsa più bassa sulle cellule PLK che sulle HEL (vedi Tabella 2 e 3). Inoltre, confrontando i risultati di citotossicità dei composti di origine con i corrispondenti derivati lipofili, questi ultimi hanno sempre mostrato una tossicità superiore. Nelle cellule HEL in replicazione, ODE-CDV si è rivelato il derivato lipofilo dell'HPMPC con la maggiore tossicità, mentre i più citotossici in assoluto si sono dimostrati ODE-HPMPA e HDP-HPMPA. Nelle PLK invece tra i derivati dell'HPMPC è stato OLE-CDV ad esibire la massima tossicità, con i due derivati lipofili dell'HPMPA ad avere in assoluto i più bassi valori di CC₅₀.

Sia nelle HEL che nelle PLK, non è stata riscontrata nessuna variazione significativa nella sensibilità dei diversi ceppi di orf virus nei confronti dei derivati lipofili del CDV, cCDV ed HPMPA, a conferma di quanto già osservato nei confronti degli ANPs (Tabelle 1, 2 e 3).

Nelle HEL tutti i derivati lipofili hanno mostrato chiaramente una maggiore attività antivirale rispetto ai loro progenitori (Tabella 2). Tra i composti derivati dell'HPMPC, HDP-CDV si è rilevato quello con la maggiore efficacia contro il virus orf, con IC₅₀

media di 0.0009 ± 0.0006 $\mu\text{g/ml}$, rispetto a 0.31 ± 0.1 $\mu\text{g/ml}$ dell'HPMPC. La potenza di questi composti è stata calcolata intorno alle 200 (OLP-CDV) e alle 350 volte (HDP-CDV) superiore rispetto all'HPMPC. OLE-cCDV si è mostrato ben 500 volte più efficace del cHPMPC. I due derivati dell'HPMPA sono risultati i composti con la maggiore potenza antivirale tra tutti i derivati lipofili testati, con IC_{50} media 2500 volte (ODE-HPMPA) e 5000 volte (HDP-HPMPA) più bassa del loro progenitore.

Anche nelle PLK i derivati lipofili hanno evidenziato una maggiore efficacia antivirale verso il virus orf rispetto ai corrispondenti ANPs, seppure con una differenza meno pronunciata di quella osservata nelle HEL (Tabella 3). Nelle PLK, ODE-CDV ha mostrato la più spiccata attività antivirale tra i derivati lipofili del HPMPC, seguito da OLE-CDV e ODBG-CDV. ODE-HPMPA ha chiaramente mostrato la maggiore efficacia antivirale tra tutti i derivati lipofili, con una IC_{50} media 170 volte più bassa dell'HPMPA.

Nonostante la loro maggiore citotossicità, i derivati lipofili hanno mostrato una selettività maggiore rispetto ai loro progenitori, grazie ad una maggiore potenza antivirale. Comparando gli SI nelle cellule HEL, OLP-CDV si è rivelato il composto più selettivo tra i derivati lipofili dell'HPMPC, mentre in assoluto, quello con la più spiccata selettività verso il virus orf, è apparso HDP-HPMPA. Nelle PLK al contrario OLP-CDV è risultato il composto meno selettivo tra tutti i derivati lipidici, e il ODE-CDV insieme al ODE-HPMPA si sono rivelati come i più selettivi.

TABELLA 2: Citotossicità e attività antivirale dei derivati lipofili di CDV, cCDV e HPMPA nei confronti di diversi ceppi di ORFV nelle cellule HEL. I risultati sono presentati come la media di almeno due esperimenti indipendenti.

Cellule umane embrionali di polmone (HEL)														
<i>Composti</i>	<i>Attività antivirale IC₅₀ (µg/ml)^a</i>						<i>Citotossicità (µg/ml)</i>		<i>SI^d</i>					
	Ceppi di ORFV						media	fold^b	CC₅₀^c	Ceppi di ORFV				
	<i>IT-C2</i>	<i>IT-Mf-90</i>	<i>IT-To</i>	<i>NZ2</i>	<i>IT-01</i>	<i>IT-01</i>				<i>IT-C2</i>	<i>IT-Mf-90</i>	<i>IT-To</i>	<i>NZ2</i>	<i>IT-01</i>
HDP-CDV	0.0005 ± 0.0000	0.0004 ± 0.0001	0.0017 ± 0.0016	0.0015 ± 0.0007	0.0004 ± 0.0002	0.0009 ± 0.0006	344	0.37 ± 0.09	740	925	218	247	925	611 ± 354
ODE-CDV	0.0010 ± 0.0006	0.0018 ± 0.0018	0.0018 ± 0.0003	0.0012 ± 0.0002	0.0007 ± 0.0003	0.0013 ± 0.0005	238	0.16 ± 0.11	160	89	89	133	229	140 ± 58
OLP-CDV	0.0017 ± 0.0004	0.0008 ± 0.0004	0.0016 ± 0.0006	0.0029 ± 0.0020	0.0007 ± 0.0003	0.0015 ± 0.0009	207	1.04 ± 0.51	612	1300	650	359	1486	881 ± 485
ODBG-CDV	0.0006 ± 0.0002	0.0005 ± 0.0001	0.0023 ± 0.0020	0.0027 ± 0.0023	0.0009 ± 0.0005	0.0014 ± 0.0010	221	0.30 ± 0.09	500	600	130	111	333	335 ± 218
OLE-CDV	0.0007 ± 0.0002	0.0004 ± 0.0001	0.0026 ± 0.0008	0.0018 ± 0.0007	0.0009 ± 0.0002	0.0013 ± 0.0009	238	0.18 ± 0.09	257	450	69	100	200	215 ± 151
CDV	0.37 ± 0.29	0.17 ± 0.05	0.35 ± 0.13	0.41 ± 0.24	0.24 ± 0.07	0.31 ± 0.10		37.9 ± 0.7	102	223	108	92	158	137 ± 54
OLE-cCDV	0.0020 ± 0.0000	0.0012 ± 0.0011	0.0029 ± 0.0030	0.0008 ± 0.0004	0.0014 ± 0.0001	0.0017 ± 0.0008	512	0.26 ± 0.18	90	150	62	225	129	131 ± 63
cCDV	0.87 ± 0.32	1.00 ± 0.00	0.67 ± 0.29	0.83 ± 0.38	1.00 ± 0.92	0.87 ± 0.14		42.4 ± 12.2	49	42	63	51	42	50 ± 9
HDP-HPMPA	0.000014 ± 0.000011	ND	ND	0.000013 ± 0.00	ND	0.000013 ± 0.000007	5078	0.044 ± 0.003	3143	ND	ND	3438	ND	3291 ± 209
ODE-HPMPA	0.000030 ± 0.000025	ND	ND	0.000021 ± 0.000012	ND	0.000026 ± 0.000017	2538	0.01 ± 0.00	333	ND	ND	478	ND	406 ± 103
HPMPA	0.068 ± 0.030	0.050 ± 0.000	0.057 ± 0.012	0.064 ± 0.019	0.093 ± 0.040	0.066 ± 0.016		2.80 ± 0.07	41	56	49	44	30	44 ± 10

^a concentrazione necessaria ad inibire del 50% l'effetto citopatico virale.

^b decremento dei valori di IC₅₀ rispetto al composto progenitore.

^c concentrazione necessaria per ridurre del 50% la crescita cellulare rispetto ad un controllo cellule.

^d SI=indice di selettività: rapporto tra CC₅₀ e IC₅₀

ND: non determinato

TABELLA 3: Citotossicità e attività antivirale dei derivati lipofili di CDV, cCDV e HPMPA nei confronti di diversi ceppi di ORFV nelle cellule PLK. I risultati sono presentati come la media di almeno due esperimenti indipendenti.

Composti	Colture primarie di cheratinociti di agnello (PLK)													
	Attività antivirale IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) ^a						Citotossicità ($\mu\text{g/ml}$)			SI ^d				
	Ceppi di ORFV			media	fold ^b	CC_{50} ^c	Ceppi di ORFV							
	IT-C2	IT-Mf-90	IT-To	NZ2	IT-01			IT-C2	IT-Mf-90	IT-To	NZ2	IT-01	media	
HDP-CDV	0.037 ± 0.023	0.08 ± 0.085	0.018 ± 0.009	0.18 ± 0.13	0.12 ± 0.02	0.087 ± 0.065	28	> 5	> 179	> 63	> 278	> 28	> 43	118 ± 107
ODE-CDV	0.0032 ± 0	0.023 ± 0.025	0.0095 ± 0.0064	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.019 ± 0.012	127	3.21 ± 1.95	465	140	338	107	107	229 ± 159
OLP-CDV	0.067 ± 0.032	0.19 ± 0.25	0.031 ± 0.028	0.32 ± 0.14	0.4 ± 0.17	0.20 ± 0.16	12	> 5	> 76	> 26	> 161	> 16	> 13	58 ± 63
ODBG-CDV	0.017 ± 0.014	0.15 ± 0.18	0.0055 ± 0.0021	0.11 ± 0.07	0.093 ± 0.04	0.075 ± 0.061	32	3.93 ± 0.49	218	26	715	36	42	207 ± 295
OLE-CDV	0.0038 ± 0.018	0.047 ± 0.047	0.014 ± 0.009	0.03 ± 0.021	0.06 ± 0.036	0.031 ± 0.023	78	2.73 ± 1.99	144	58	195	91	46	107 ± 62
CDV	0.24 ± 0.07	2.6 ± 0.85	0.5 ± 0	1.26 ± 0.7	7.5 ± 3.54	2.42 ± 2.98		> 50	> 53	> 19	> 100	> 40	> 9	44 ± 36
OLE-cCDV	0.021 ± 0.016	0.13 ± 0.11	0.0095 ± 0.0064	0.13 ± 0.13	0.15 ± 0.05	0.088 ± 0.067	35	4.53 ± 0.81	105	35	477	35	30	136 ± 193
CCDV	0.24 ± 0	3.2 ± 2.55	1.25 ± 1.06	5.33 ± 3.51	5.63 ± 3.79	3.13 ± 2.40		> 50	> 27	> 16	> 40	> 9	> 9	20 ± 13
HDP-HPMPA	0.011 ± 0.001	ND	ND	0.036 ± 0.006	ND	0.023 ± 0.018	31	1.60 ± 0.57	145	ND	ND	44	ND	94 ± 71
ODE-HPMPA	0.0026 ± 0.0013	ND	ND	0.006 ± 0.001	ND	0.0043 ± 0.0024	169	1.15 ± 1.20	442	ND	ND	192	ND	317 ± 177
HPMPA	0.18 ± 0.09	0.83 ± 0.24	0.41 ± 0.01	0.61 ± 0.36	1.65 ± 0.92	0.74 ± 0.56		22.18 ± 14.19	72	27	54	36	13	40 ± 23

^a concentrazione necessaria ad inibire del 50% l'effetto citopatico virale.

^b decremento dei valori di IC_{50} rispetto al composto progenitore.

^c concentrazione necessaria per ridurre del 50% la crescita cellulare rispetto ad un controllo cellule.

^d SI =indice di selettività: rapporto tra CC_{50} e IC_{50}

ND: non determinato

3. Prova della carica virale

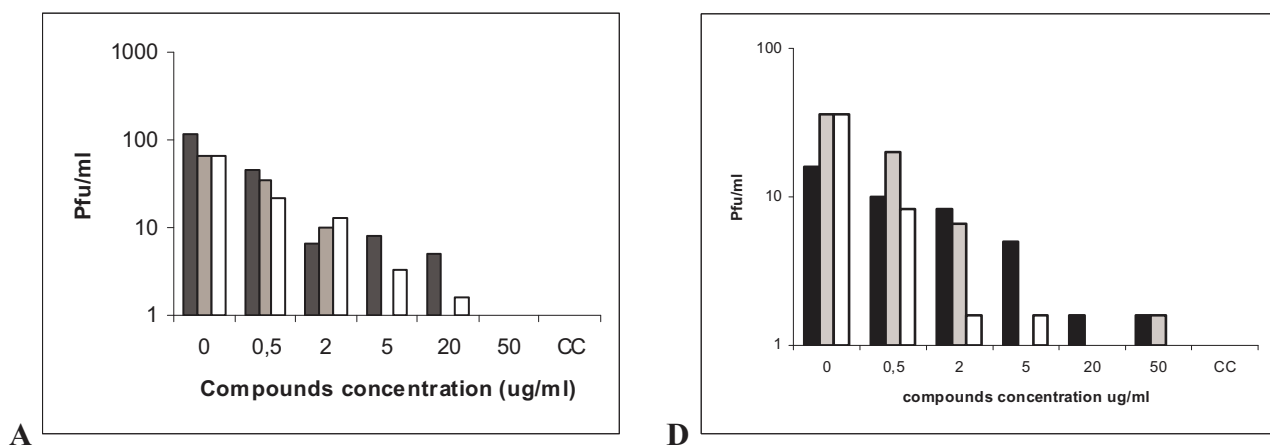
L'attività antivirale dell'HPMPC, HPMPDAP e HPMPO-DAPy è stata successivamente confermata sia sulle HEL che sulle PLK, con la prova della carica virale in presenza di diverse concentrazioni dei composti e a diversi tempi post-infezione (24, 72 e 96 ore post-infezione).

3.1. Titolazione virale

La carica virale presente sia nel surnatante che nelle cellule infette è stata inizialmente valutata in seguito a titolazione virale, ed i risultati ottenuti sono stati espressi come il \log_{10} di Pfu/ml (Figura 1).

Il titolo virale misurato ad ogni tempo post-infezione, sia nei pozzetti di controllo che in quelli trattati, è risultato costantemente più alto di 0.5-2 \log_{10} nei campioni prelevati dalle cellule infette rispetto al surnatante. Analizzando i risultati ottenuti durante la prova eseguita nelle cellule PLK, a 24 ore post-infezione non è stata riscontrata alcuna crescita virale in presenza delle concentrazioni 50, 20 e 5 $\mu\text{g/ml}$ di HPMPO-DAPy e con 50 $\mu\text{g/ml}$ di HPMPC e HPMPDAP. Dopo 72 ore dall'infezione invece i tre composti hanno esibito pressoché la stessa capacità di inibire la crescita virale, mentre a 96 ore post-infezione HPMPC e HPMPDAP hanno mostrato di avere il maggiore potere antivirale. Infatti, con queste molecole alla concentrazione di 2 $\mu\text{g/ml}$ è stata misurata una riduzione di 4-5 \log_{10} della crescita virale, e di solo 1 \log_{10} con la stessa concentrazione di HPMPO-DAPy. Simili risultati sono stati ottenuti con la prova della carica virale eseguita sulle cellule HEL.

Figura 1



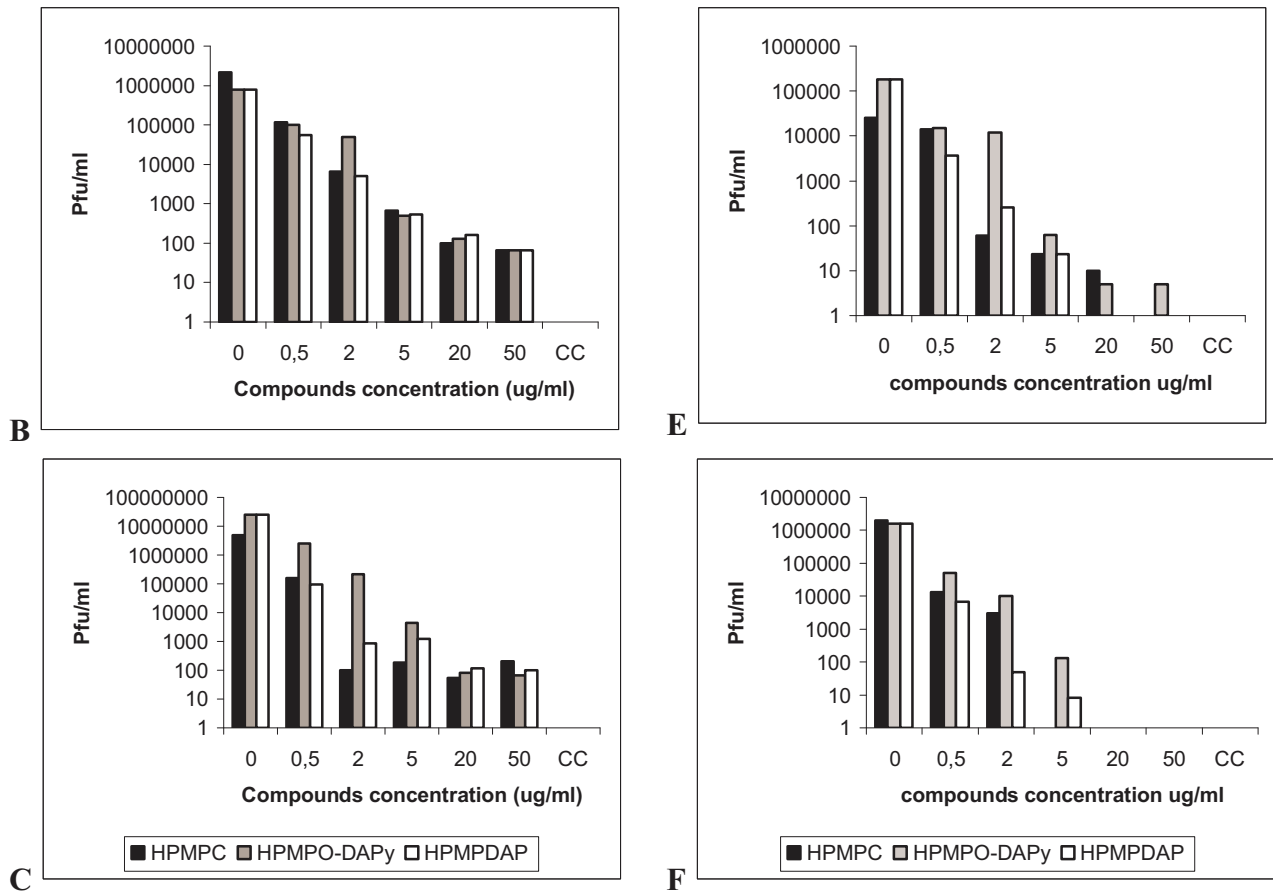


Figura.1: Prova della carica virale nelle cellule PLK. La colonna a sinistra rappresenta i risultati della titolazione del virus intracellulare, mentre la colonna a destra rappresenta quelli ottenuti dal surnatante. In particolare, i pannelli A e D, B e E, C e F esprimono i risultati rispettivamente dopo 24, 72 e 96 ore dall'infezione. I titoli virali sono stati espressi in Pfu/ml e nei grafici sono mostrati in scala logaritmica. CC è il controllo cellule, mentre alla concentrazione 0 $\mu\text{g/ml}$ corrisponde il controllo virus.

3.2. Quantificazione DNA virale

Successivamente alla titolazione, la riduzione della carica virale è stata valutata come inibizione della sintesi del DNA virale con la tecnica della Real Time PCR. Ciascun campione è stato quantificato per tre volte e il risultato è stato espresso come la media e la deviazione standard delle tre ripetizioni. Ai fini della prova, non è stato utile esprimere i dati della Real Time in termini di copie assolute di DNA virale per campione, ma piuttosto come percentuale di riduzione del DNA virale nei campioni trattati con le tre molecole, rispetto ad un controllo virus non trattato (Figura 2).

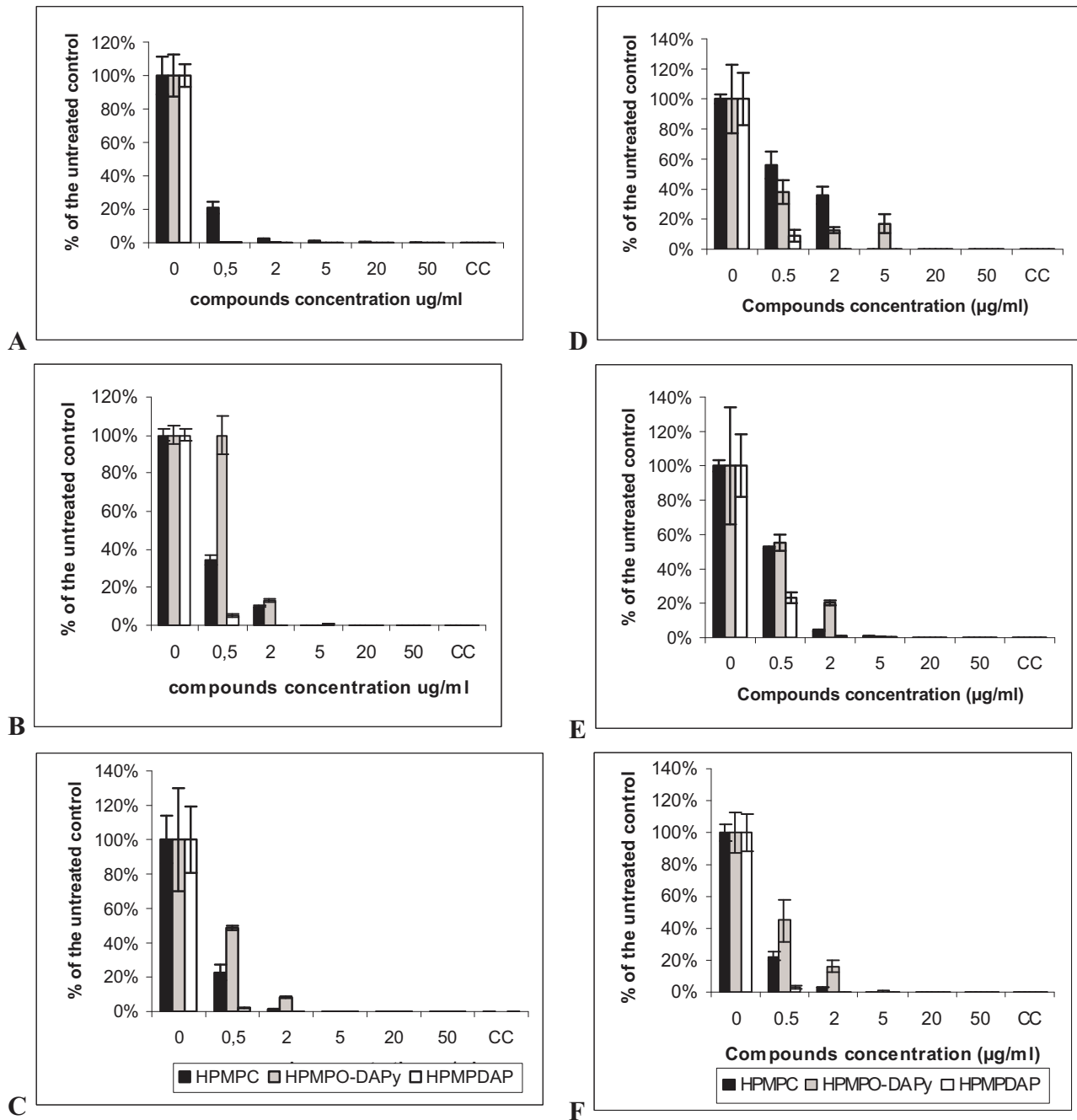


Figura 2: Effetto di diverse concentrazioni di HPMPC, HPMPO-DAPy e HPMPDAP sulla concentrazione del DNA virale misurata al termine della prova della carica virale sulle cellule PLK nel surnatante (colonna destra) e nelle cellule infette (colonna sinistra). Il DNA del virus orf è stato quantificato dopo 24 (A e D), 72 (B e E) e 96 ore (C e F) post-infezione. I risultati sono espressi come la media di tre misurazioni con la corrispondente deviazione standard. Inoltre sono espressi come percentuale in riferimento al controllo virus (0 µg/ml). CC è il controllo cellule.

A 24 ore post-infezione, i tre composti testati hanno comportato una riduzione drastica percentuale del DNA virale a tutte le concentrazioni testate, con una maggiore attività riscontrata per l'HPMPDAP e l'HPMPO-DAPy. Dopo 72 e 96 ore dall'infezione invece, l'HPMPO-DAPy ha mostrato una minore efficacia nella inibizione della sintesi del DNA virale alle più basse concentrazioni (0.5 e 2 µg/ml), mentre i tre composti hanno ugualmente ridotto del 100% la quantità di genoma virale alle più alte concentrazioni testate (50 e 20 µg/ml).

4. Colture organotipiche di cute ovina e prove antivirali ex vivo

L'allestimento delle colture organotipiche di cute ovina con la tecnica "air liquid interface", ha portato allo sviluppo di un epitelio pluristratificato cheratinizzato del tutto simile istologicamente al tessuto cutaneo ovino (Figura 3)

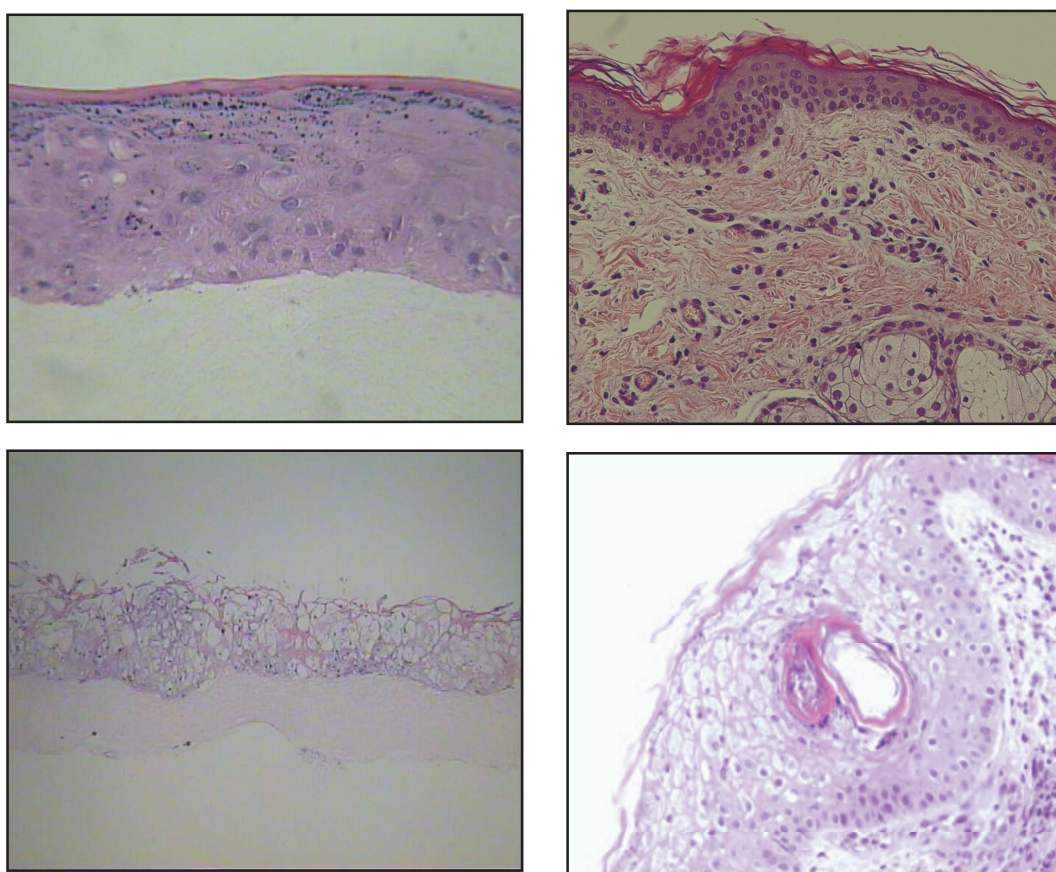


Figura 3: Confronto dell'aspetto istologico ottenuto con le tecnica dei raft cultures (colonna sinistra) con quello osservato dopo biopsia cutanea in una pecora (colonna destra). In particolare le due immagini in alto si riferiscono ad un raft o ad una cute ovina non infette, mentre le due immagini sottostanti riportano l'aspetto istopatologico dei due tessuti in seguito ad infezione con orf virus.

L'abilità del virus orf di replicare nei raft cultures è stata dimostrata dalla comparsa di un quadro istopatologico caratterizzato da degenerazione palloniforme delle cellule dello strato superficiale dell'epidermide (Figura 3).

L'inibizione della crescita del virus orf in seguito all'aggiunta di HPMPC, HPMPDAP e HPMPO-DAPy è stata valutata nelle colture organotipiche in due esperimenti indipendenti. L'aspetto istologico dei raft in presenza delle diverse concentrazioni dei tre composti è mostrato nella sezione iconografica. Il trattamento dei raft con concentrazioni di 50 e 20 $\mu\text{g/ml}$ dei tre composti ha indotto una totale protezione dell'epitelio che ha assunto uno sviluppo ed un aspetto analoghi a quello del controllo cellule. Alla concentrazione di 5 $\mu\text{g/ml}$, con HPMPC e HPMPDAP si osserva l'alternanza lungo il raft di aree di crescita virale con aree di normale sviluppo dell'epitelio, mentre alla stessa concentrazione di HPMPO-DAPy la maggior parte del raft appare compromesso dalla crescita virale. In presenza delle più basse concentrazioni testate (2 e 0.5 $\mu\text{g/ml}$) dei tre composti, l'epitelio presentava un aspetto istopatologico analogo a quello del controllo virus.

L'aspetto istopatologico delle colture organotipiche è stato in seguito confrontato e completato dai risultati ottenuti dopo titolazione virale e quantificazione del DNA virale (Figura 4). In presenza di 50 e 20 $\mu\text{g/ml}$ dei tre composti, la carica virale era di circa 4 \log_{10} inferiore rispetto al controllo virus, mentre la riduzione percentuale del DNA virale rispetto al controllo virus è stata completa. In presenza di 5 $\mu\text{g/ml}$ di HPMPO-DAPy si è osservato un incremento del titolo e del DNA virale nel raft, mentre alla stessa concentrazione di HPMPC e HPMPDAP tali parametri sono rimasti pressoché invariati rispetto alle concentrazioni precedenti. Al diminuire della concentrazione dei composti testati, si è evidenziato un incremento progressivo della carica virale e del genoma virale, con un evidente minore protezione conferita dal HPMPO-DAPy, rispetto agli altri due composti.

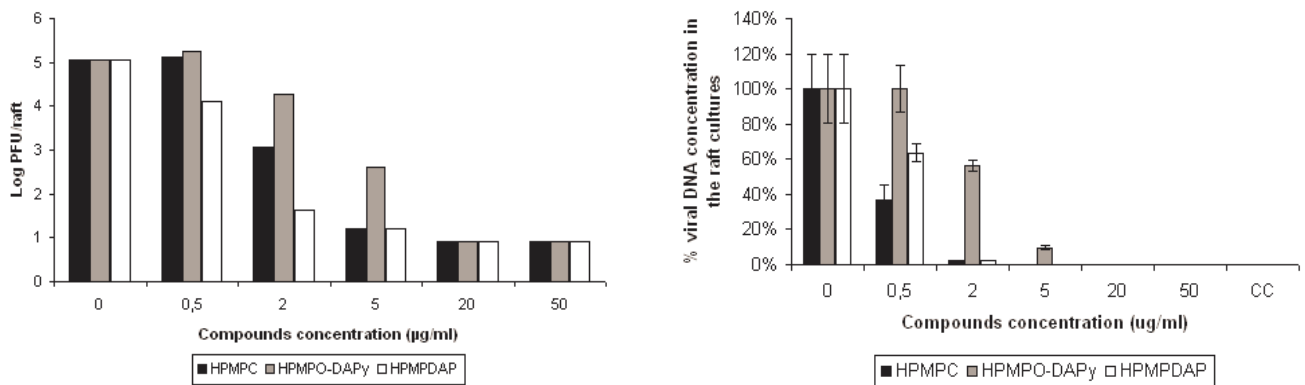


Figura 4: A sinistra è rappresentato il grafico relativo alla titolazione del virus orf a partire dai raft cultures; il titolo virale espresso in Pfu per raft è presentato in scala logaritmica. La figura a destra riporta la quantificazione del DNA virale per raft, e i risultati sono mostrati come percentuale in riferimento al raft infetto e non trattato (controllo virus). Le barre di errore indicano la deviazione standard calcolata dopo tre ripetizioni dello stesso campione.

B. RISULTATI VIRUS DEL CIMURRO

1. Citotossicità e attività antivirale della RBV e dell'EICAR

L'attività citotossica e antivirale di entrambe le molecole è mostrata nella Tabella 1. La tossicità della RBV e dell'EICAR nei confronti delle cellule VERO in replicazione è apparsa molto superiore rispetto a quella osservata verso le cellule VERO stazionarie. In particolare, la CC_{50} della RBV su cellule in replicazione è risultata di $27.2 \pm 2.4 \mu\text{g/ml}$ e $>100 \mu\text{g/ml}$ nel caso delle cellule stazionarie. Analogamente per l'EICAR la CC_{50} su cellule in replicazione è risultata pari a $3.6 \pm 1.1 \mu\text{g/ml}$ e $>50 \mu\text{g/ml}$ nelle cellule stazionarie.

L'EICAR ha mostrato una maggiore attività antivirale rispetto alla RBV con valori di IC_{50} sei volte inferiori. In particolare i valori di IC_{50} dell'EICAR nei confronti del ceppo Bussel e Ondestepoort erano rispettivamente di $4.8 \pm 1.5 \mu\text{g/ml}$ e $4.4 \pm 1.4 \mu\text{g/ml}$, mentre i valori di IC_{50} della RBV erano di $27 \pm 7.5 \mu\text{g/ml}$ e $24 \pm 7.2 \mu\text{g/ml}$.

Dal rapporto tra il valore di CC_{50} e il valore di IC_{50} si ottiene l'indice di selettività (IS). L'IS è stato calcolato sia con il valore di tossicità riferito alle cellule in replicazione che con quello ottenuto con le cellule stazionarie. Ad esempio, per la RBV nei confronti del ceppo Bussel, l'IS è risultato pari a 1 con le cellule in replicazione e >3.7 con cellule stazionarie; per l'EICAR nei confronti del ceppo Bussel, l'IS è risultato pari a 0.75 con le cellule in replicazione e >10.4 con cellule stazionarie.

TABELLA 1. Attività antivirale e citotossicità della RBV e dell'EICAR nei confronti del virus del cimurro.

Composti	Citotossicità		Bussel/CDV			Ondestepoort/CDV		
	CC_{50} cellule stazionarie ($\mu\text{g/ml}$) ^a	CC_{50} cellule in replicazione ($\mu\text{g/ml}$) ^a	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) ^b	IS cellule stazionarie ^c	IS cellule in replicazione ^c	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) ^b	IS cellule stazionarie ^c	IS cellule in replicazione ^c
EICAR	> 50	3.6 ± 1.1	4.8 ± 1.5	>10.4	0.75	4.4 ± 1.4	> 11.4	0.8
RBV	> 100	27.2 ± 2.4	27 ± 7.5	>3.7	1	24 ± 7.2	> 4.2	1.1

^a I valori sono espressi come la media \pm deviazione standard del valore di CC_{50} calcolato dopo numerose prove indipendenti di citotossicità.

^b I valori sono espressi come la media \pm deviazione standard delle IC_{50} calcolate dopo numerose prove antivirali tra di loro indipendenti.

^c $IS = CC_{50}/IC_{50}$

2. Studi del meccanismo d'azione della RBV e dell'EICAR

2.1 Prova della carica virale

L'attività antivirale della RBV e dell'EICAR è stata confermata con la determinazione della carica virale in presenza di diverse concentrazioni dei due composti e a diversi tempi post-infezione (24, 48 e 72 ore post-infezione).

2.1.1 Titolazione virale

La carica virale presente sia nel surnatante che nelle cellule infette è stata inizialmente valutata mediante titolazione virale, ed i risultati ottenuti sono stati espressi come il \log_{10} di TCID₅₀/ml (Figura 1). Il titolo virale misurato ad ogni tempo post-infezione, sia nei pozzetti di controllo che in quelli trattati, è risultato costantemente più alto di 0.5-2 \log_{10} nei campioni prelevati dalle cellule infette rispetto al surnatante. Analizzando i risultati ottenuti a 24 ore post-infezione nel surnatante non è stata riscontrata alcuna crescita virale in presenza di tutte le concentrazioni testate sia per la RBV che per l'EICAR, mentre a livello intracellulare l'assenza di virioni infettanti è stata osservata fino alla concentrazione di 40 $\mu\text{g/ml}$ di RBV e 5 $\mu\text{g/ml}$ di EICAR. Dopo 48 ore dall'infezione solo con una concentrazione di RBV di 80 $\mu\text{g/ml}$ e di 20 e 10 $\mu\text{g/ml}$ di EICAR si è ancora osservata l'inibizione totale di crescita di virus infettanti. A livello intracellulare anche a queste più alte concentrazioni dei due composti si è osservata la crescita virale, con l'EICAR che si è riconfermato attivo a più basse concentrazioni della RBV. A 72 ore post-infezione, sia nel surnatante che a livello intracellulare, è stata misurata un'inibizione della crescita virale pari a 3 \log_{10} con 80 $\mu\text{g/ml}$ di RBV, e un'inibizione pari a 2 \log_{10} con 20 $\mu\text{g/ml}$ di EICAR.

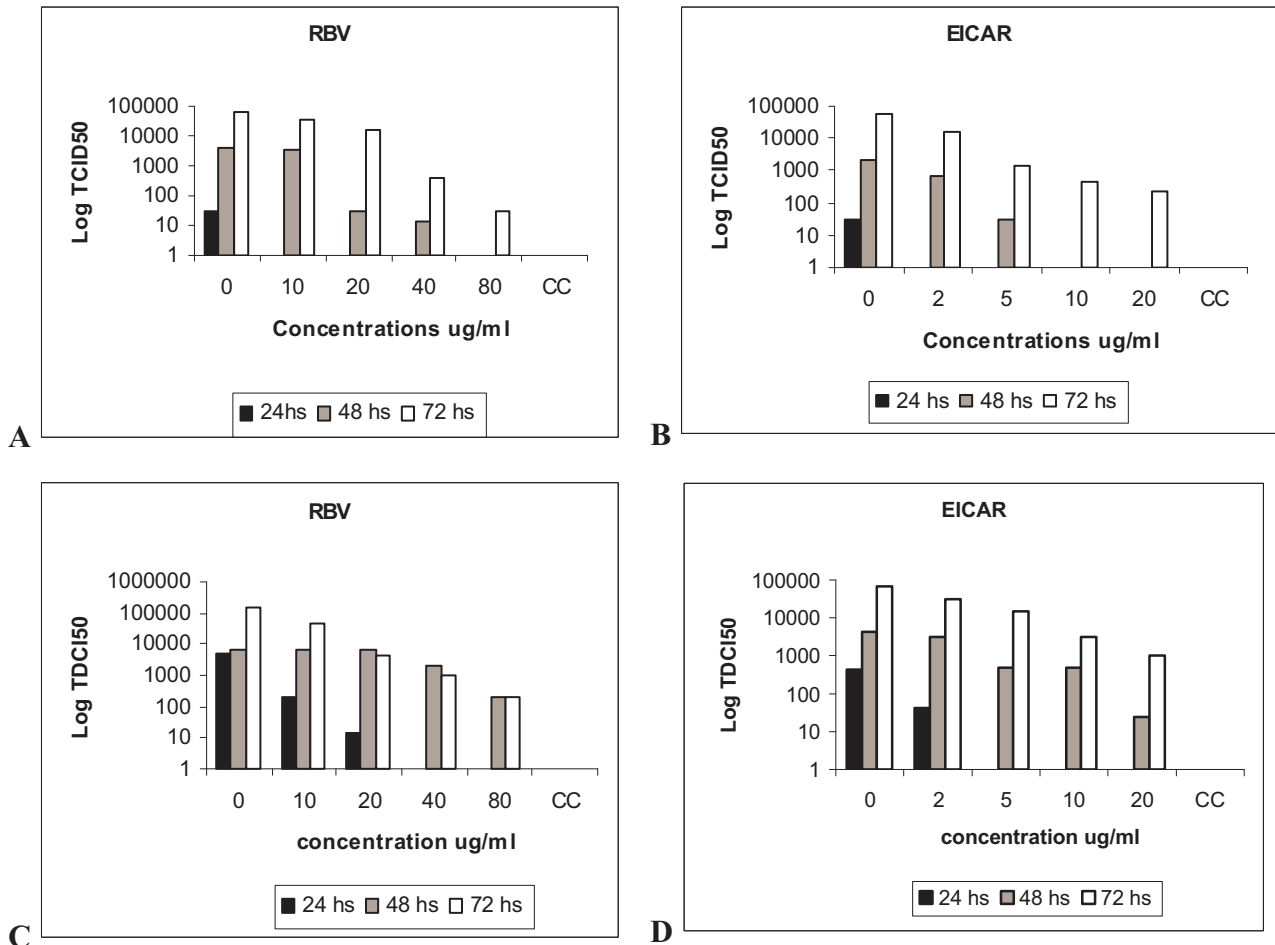


Figura 1: Rappresentazione dei risultati della titolazione virale dal surnatante (pannelli A e B) e dalle cellule infette (pannelli C e D) della prova di carica virale della RBV e dell'EICAR nei confronti del virus del cimurro.

2.1.2 Quantificazione RNA virale

La riduzione della carica virale è stata valutata anche come inibizione della sintesi del RNA virale con la tecnica della Real Time One-Step RT-PCR. Ogni reazione di quantificazione è stata ripetuta due volte e il risultato, relativo a ciascun campione è stato espresso come la media e la deviazione standard delle due ripetizioni. I risultati ottenuti sono stati espressi come numero di copie di RNA per μl e nei grafici in Figura 2, sono riportati come Log_{10} del numero di copie di RNA/ μl . Nel surnatante a 24 ore post-infezione non è stato rilevato RNA virale, nemmeno nel controllo virus, mentre a partire da 48 ore post-infezione solo nei campioni trattati con RBV 80 e 40 $\mu\text{g/ml}$ ed EICAR 20 e 10 $\mu\text{g/ml}$ è stata osservata un'inibizione assoluta della produzione di RNA virale. A 72 ore post-infezione, le concentrazioni più alte di RBV ed EICAR, e cioè

rispettivamente 80 e 20 µg/ml, hanno determinato una riduzione di 2-3 Log₁₀ del numero di copie di RNA/µl rispetto al controllo virus.

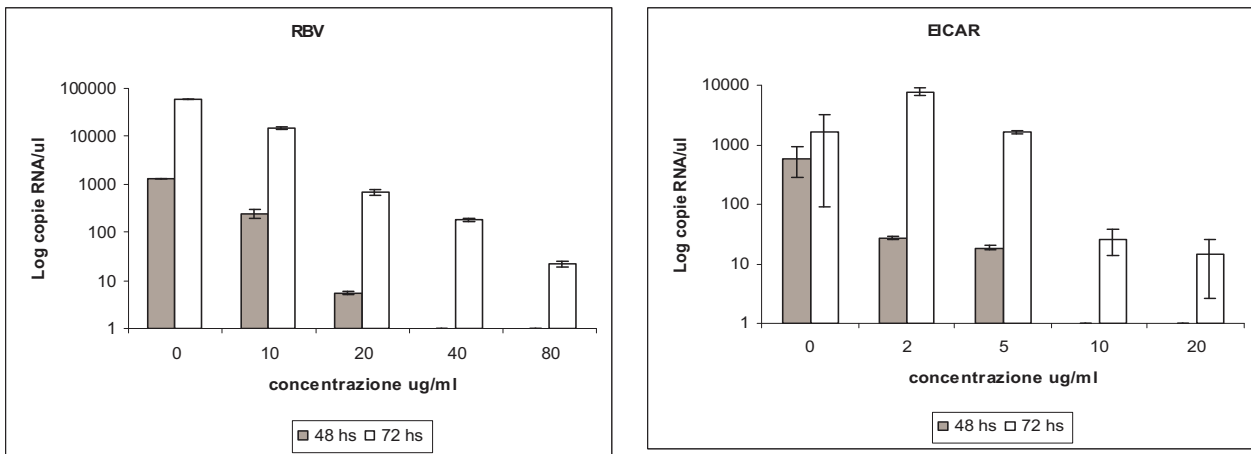
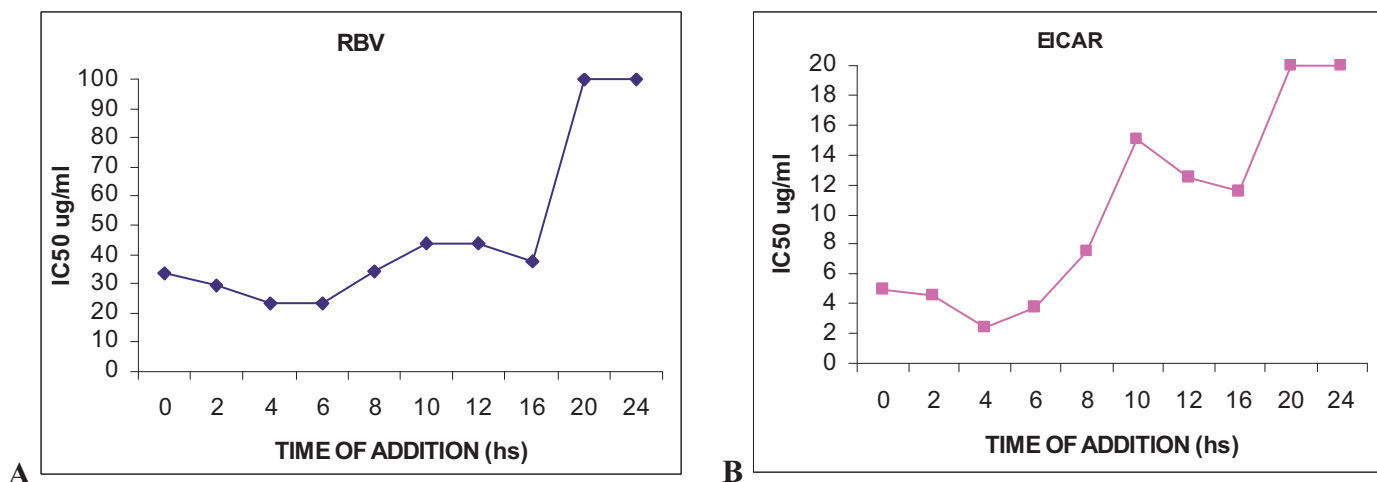


Figura 2: I grafici rappresentano la quantificazione dell'RNA virale nel surnatante prelevato dalla prova della carica virale.

2.2 Prova del time of addition

I risultati ottenuti dalla prova del time of addition sono rappresentati nella Figura 3. Nel corso della prova sia per la RBV che per l'EICAR i valori di IC₅₀ misurati tra il tempo 0 e le 8 ore post-infezione sono stati compresi all'interno del range dei valori di IC₅₀ normalmente misurati per questi due composti. A partire dalle 10 ore post-infezione invece, si è osservato un incremento del valore di IC₅₀.

Figura 3



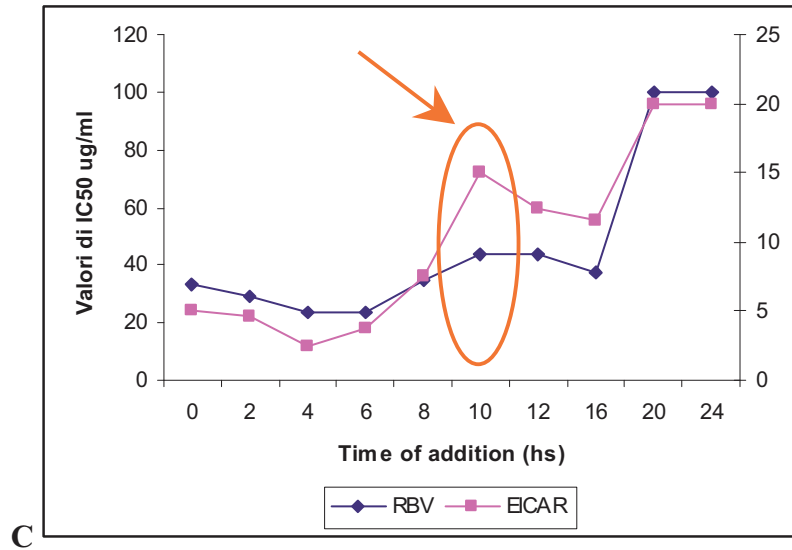


Figura 3: Rappresentazione grafica dei risultati ottenuti dalla prova di time of addition con RBV (A), EICAR (B) e dei due composti in parallelo (C). La freccia indica l'incremento dell'IC₅₀ osservato per entrambi i composti in corrispondenza delle 10 ore post-infezione.

2.3 Prova antivirale in presenza dei nucleosidi

In una prima fase sono stati testati i nucleosidi nei confronti del virus del cimurro e, come mostrato nella Tabella 2, nessuno di essi ha prodotto un effetto antivirale.

TABELLA 2. Attività antivirale dei nucleosidi nei confronti del virus del cimurro.

Composti	Attività antivirale	
	IC ₅₀ (µg/ml)	
	Bussel/CDV	Ondestepoort/CDV
Citidina	> 100	> 100
Uridina	> 100	> 100
Guanosina	> 100	> 100
Adenosina	> 100	> 100

Successivamente, ciascun nucleoside è stato testato insieme alla RBV e all'EICAR nei confronti del virus del cimurro; in questo caso, solo in presenza di guanosina è stato osservato un incremento della IC₅₀ della RBV e dell'EICAR. Al contrario, in presenza

di adenosina, citidina o uridina, non è stata osservata alcuna variazione della IC₅₀ della RBV e dell'EICAR.

TABELLA 3. Attività antivirale della RBV e dell'EICAR nei confronti del virus del cimurro in presenza dei nucleosidi

Composti	Attività antivirale RBV (µg/ml)		Attività antivirale EICAR (µg/ml)	
	Bussel/CDV	Ondestepoort/CDV	Bussel/CDV	Ondestepoort/CDV
	27±7.5	24±7.2	4.8±1.5	4.4±1.4
Adenosina 10 (µg/ml)	36.9±3.7	NT*		NT*
Adenosina 100 (µg/ml)	29.1	NT	NT	NT
Citidina 10 (µg/ml)	33.3±3	NT	NT	NT
Citidina 100 (µg/ml)	31.2±8.8	NT	NT	NT
Uridina 10 (µg/ml)	33.3±3	NT	NT	NT
Uridina 100 (µg/ml)	34.3±4.4	NT	NT	NT
Guanosina 5 (µg/ml)	> 100	> 100	> 50	> 50
Guanosina 10 (µg/ml)	> 100	> 100	> 50	> 50
Guanosina 20 (µg/ml)	> 100	> 100	> 50	> 50
Guanosina 50 (µg/ml)	86.1 ± 12.7	43.8 ± 8.8	< 1.6	< 1.6
Guanosina 100 (µg/ml)	47.2 ± 16.8	20.3 ± 6.6	< 1.6	< 1.6

* NT: non testato

3. Studio del ciclo replicativo del virus del cimurro

Il ciclo di replicazione del virus del cimurro ed in particolare del ceppo Bussel sulle cellule VERO, è stato studiato ricorrendo alla titolazione del virus e alla quantificazione dell'RNA virale presente nel surnatante e nelle cellule infette a diversi tempi post-infezione. Al termine della titolazione virale, i risultati sono stati rappresentati graficamente (Figura 4) esprimendo i titoli virali come Log₁₀ del valore di TCID₅₀/ml. Dal surnatante prelevato dopo 8 e dopo 16 ore post-infezione non è stata rilevata crescita virale, mentre a livello intracellulare già dopo 16 ore dall'infezione è stata

titolata la presenza di virioni infettanti. Soltanto a partire da 24 ore post-infezione è stata riscontrata una crescita virale nel surnatante della coltura infetta. Nel surnatante la carica virale è aumentata di 3 Log_{10} tra le 24 e le 48 ore post-infezione, per poi mantenersi costantemente elevata tra le 48 e le 72 ore. A livello intracellulare, un aumento del titolo virale di 1 Log_{10} è stato osservato tra le 16 e le 24 ore e successivamente anche tra le 24 e le 48 ore post-infezione.

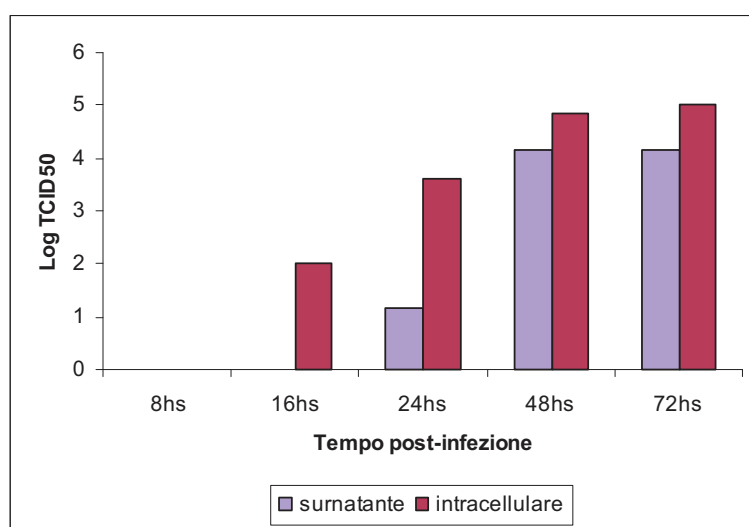


Figura 4: Rappresentazione grafica dei risultati relativi alla titolazione virale eseguita sui campioni prelevati dal surnatante e dalle cellule infette ai diversi tempi post-infezione nel corso della prova del ciclo replicativo.

Con il ricorso a tecniche di retrotrascrizione differenziate e con la successiva quantificazione dell'acido nucleico retrotrascritto, è stato possibile distinguere e monitorare l'accumulo intracellulare dell'mRNA, dell'RNA genomico ed antigenomico virale. Utilizzando gli oligo(dT) durante la retrotrascrizione, è stato osservato un aumento esponenziale dell'mRNA sia per il gene N che per il gene P a livello intracellulare tra le 8 e le 24 ore post-infezione. Dal confronto della quantità di mRNA dei due geni, si è osservata una maggiore quantità di quello trascritto a partire dal gene P (Figura 5 A).

All'interno delle cellule infette la quantità di genoma e antigenoma corrispondente ad entrambi i geni è risultata costantemente più elevata rispetto alla quantità di mRNA ad ogni tempo post-infezione (Figura 5 C e D). Tra le 8 e le 16 ore post-infezione però, l'aumento del genoma e antigenoma a livello intracellulare (meno di un Log_{10} sia per il

gene N che per il gene P) è risultato molto inferiore rispetto all'aumento esponenziale dell'mRNA (2 Log₁₀ per entrambi i geni). Invece, nelle ore successive, la cinetica di accumulo dell'mRNA e del genoma+antigenoma sono apparsi del tutto sovrapponibili. Dal confronto della quantità di genoma e antigenoma presente a livello cellulare per il gene N e per il gene P (Figura 5 B), non è stata riscontrata una differenza marcata come invece era stato osservato dal confronto della quantità di mRNA.

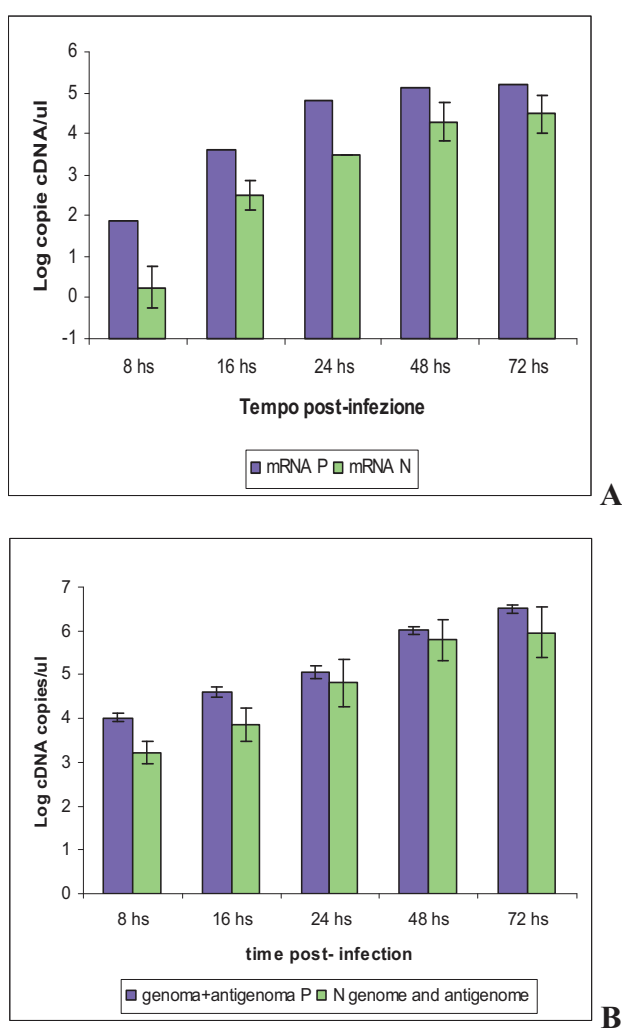
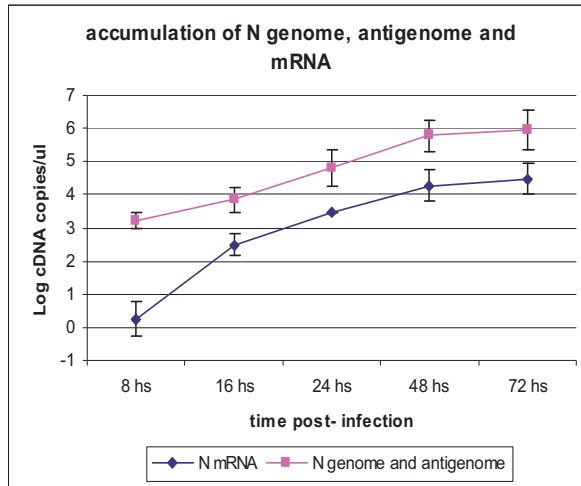
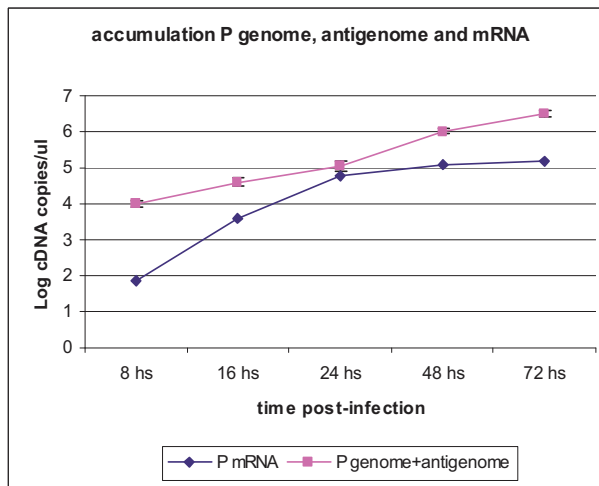


Figura 5: Il grafico A rappresenta il confronto tra la quantità di mRNA del gene N e P nei vari tempi post-infezione. Il grafico B invece rappresenta la quantità di genoma+antigenoma dei due geni nei diversi tempi post-infezione.



C



D

Figura 6: I grafici C e D mostrano la cinetica di accumulo del mRNA e del genoma+antigenoma virale riferiti al gene N (grafico C) e al gene P (grafico D).

A. DISCUSSIONE ORF VIRUS

In questo lavoro sono stati testati nei confronti del virus orf antivirali appartenenti al gruppo dei nucleosidi aciclici fosfonati (ANPs) e precursori lipofili di alcuni ANPs. Sia gli ANPs che i precursori lipofili sono stati testati *in vitro* su due diverse colture cellulari entrambe in grado di permettere la replicazione del virus orf e di visualizzare un caratteristico effetto citopatico con formazione di placche nel tappeto cellulare. L'utilizzo delle due colture cellulari ha permesso di osservare in entrambe la presenza di composti attivi e non attivi e quindi di escludere che l'attività antivirale osservata fosse dipendente dal tipo cellulare utilizzato. Sono inoltre stati utilizzati cinque diversi ceppi di orf virus, alcuni dei quali sono stati isolati da forme classiche di ectima contagioso (ceppi NZ2, IT-C2, IT-Mi90, IT-To) ed uno invece isolato da un focolaio di malattia in forma atipica o proliferativa (ceppo IT-01). Inoltre alcuni di questi ceppi sono stati isolati da pecore (ceppi NZ2, IT-C2 e IT-01) mentre altri da camoscio (IT-Mi90 e IT-To). Questi ceppi di orf virus si differenziavano inoltre anche per il grado di adattamento in coltura cellulare, con ceppi meno adattati (IT-01, IT-Mi90 e IT-C2) e ceppi invece più adattati alla crescita in coltura (NZ2 e IT-To) (Scagliarini et al., 2006). La possibilità di confrontare l'attività antivirale osservata in ceppi virali, così diversi per caratteristiche biologiche, rappresenta un vantaggio e offre la certezza che l'efficacia osservata non sia variabile in funzione del ceppo virale, ma che sia invece costante nell'ambito della stessa specie virale.

Nell'ambito del primo gruppo di molecole testate, cioè quello degli ANPs, i composti più attivi sono risultati l'HPMPA, il 3-deaza-HPMPA, l'HPMPC e l'HPMPDAP, con questi ultimi due composti aventi anche il più alto indice di selettività. L'HPMPO-DAPy, che appartiene ad un nuovo sottogruppo di ANPs e che gode di una maggiore efficacia antivirale rispetto all'HPMPC nei confronti del vaccinia virus e del cowpox virus, ha invece mostrato una minore selettività nei confronti del virus orf.

Nell'ambito del secondo gruppo di molecole, quello dei precursori lipofili, è stato osservato un incremento dell'attività antivirale e della selettività in confronto ai composti progenitori. Questa caratteristica è da imputare alla maggiore lipofilia e quindi alla riduzione marcata della concentrazione del composto necessaria per inibire la crescita virale *in vitro*. Tra tutti i precursori lipofili, quelli maggiormente attivi e

selettivi sono stati i derivati dell'HPMPA, chiamati HDP-HPMPA e ODE-HPMPA. E' interessante sottolineare che è stata osservata un'analogia proprietà antivirale di questi due composti anche nei confronti del vaccinia virus e del cowpox virus (Lebeau et al., 2006). Un'ulteriore analogia osservata tra lo studio effettuato da Lebeau et al., 2006 ed il presente lavoro sperimentale, risiede nel fatto che ODE-CDV, OLE-CDV e ODBG-CDV hanno mostrato l'attività antivirale più marcata tra i derivati dell'HPMPC sui cheratinociti umani (PHK) e su quelli di pecora (PLK).

Nei confronti di tre composti fra quelli risultati più attivi e selettivi, sono state eseguite ulteriori prove antivirali al fine di individuare il composto con le migliori caratteristiche per essere riconosciuto come candidato nella terapia dell'infezione causata dal virus orf. L'HPMPC, l'HPMPDAP e l'HPMPO-DAPy sono quindi stati utilizzati nella prova di carica virale che ha evidenziato la maggiore attività antivirale dell'HPMPDAP ai diversi tempi post-infezione, sia nel ridurre la crescita virale che nell'inibire la sintesi di acido nucleico virale.

Questi tre composti sono stati utilizzati anche in una prova antivirale *ex vivo*, realizzata cioè in colture organotipiche cutanee di pecora. Le colture organotipiche o raft cutanei sono stati realizzati a partire dalle cellule PLK che, poste su di un letto di collagene e fibroblasti all'interfaccia aria-liquido, si sono differenziate in un tessuto epiteliale pluristratificato e cheratinizzato avente caratteristiche morfologiche e fisiologiche analoghe a quelle della pelle *in vivo*. Nell'ambito dei raft cutanei il virus orf è stato in grado di replicare e di dare un effetto citopatico caratterizzato da degenerazione palloniforme dei cheratinociti dello strato profondo e superficiale dell'epitelio. La possibilità di utilizzare un sistema *ex vivo* per testare i composti antivirali, ha fornito vantaggi rispetto alle prove *in vitro*. In particolare il sistema dei raft cutanei è stato in grado di mimare una condizione d'infezione molto simile a quella che si verifica nella cute dell'animale infetto, al contrario delle prove *in vitro* che vengono realizzate su un monostrato cellulare. Il virus orf è caratterizzato da un'elevata specie-specificità e non sono noti modelli animali diversi dalla pecora o dalla capra da poter utilizzare per prove sperimentali *in vivo*. L'utilizzo di questi animali comporta costi di gestione e di mantenimento elevati, e limita notevolmente il numero di soggetti da utilizzare per ogni esperimento. Un vantaggio dei raft cutanei è quindi anche la possibilità di testare più di un composto antivirale e a concentrazioni diverse in una sperimentazione che offre

informazioni più approfondite rispetto ai test antivirali *in vitro* riproducendo condizioni simili a quelle di una sperimentazione *in vivo*.

Nelle prove eseguite sui raft cutanei, l'HPMPC e l'HPMPDAP si sono riconfermati i composti con la maggiore potenza antivirale. L'HPMPC è una molecola già presente in commercio con il nome di Vistide[®] ed il suo utilizzo è attualmente autorizzato solamente nella terapia della congiuntivite da citomegalovirus nei pazienti HIV positivi. A livello sperimentale però, l'HPMPC in crema è stato più volte utilizzato per le sue proprietà terapeutiche in caso di infezioni cutanee da virus epiteliotropi come l'herpes, il papilloma e il molluscum contagiosum (Koonsaeng et al., 2001; Pontes et al., 2006; Snoeck et al., 1994; Toro et al., 2000). L'HPMPC crema al 1% è stato anche utilizzato con successo in un caso di giant orf in una paziente affetta da immunodepressione in conseguenza di un trapianto renale (Geerinck et al., 2001). La somministrazione topica della crema ha indotto la regressione della lesione ed ha prevenuto la ricomparsa di ulteriori lesioni, come invece talvolta segnalato in pazienti immunodepressi. Inoltre, questo tipo di formulazione non ha indotto alcuna sofferenza renale, come riportato in taluni casi dopo somministrazione parenterale del cidofovir. Alla luce dei risultati ottenuti *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* nell'uomo, recentemente è stata condotta una sperimentazione in agnelli infettati sperimentalmente con il virus orf e trattati con cidofovir crema al 1% (Scagliarini et al., 2007). I risultati sono stati molto incoraggianti, in quanto dalla valutazione dell'evoluzione clinica delle lesioni, dalla vitalità del virus nelle croste prodotte al termine dell'infezione e dalla quantità di DNA virale nelle croste, è emersa una drastica riduzione della durata dell'infezione, accompagnata da una ridotta vitalità del virus stesso nelle croste degli animali trattati con cidofovir 1%. Questi risultati sottolineano la possibilità di utilizzare l'HPMPC non solo come strumento terapeutico, ma anche profilattico, per una prevenzione della contaminazione ambientale con le croste degli animali infetti e con una conseguente riduzione del rischio di reinfezioni. La formulazione di cidofovir in crema ha come fattore limitante quello di non potere essere somministrato agevolmente in condizioni di allevamento; per questo motivo sono attualmente in corso ulteriori studi per migliorare la formulazione ed il tipo di applicazione.

Questo lavoro sperimentale rappresenta un esempio dell'utilizzo del virus orf nello studio di molecole antivirali. La scelta del virus orf ha dato la possibilità di studiare

l'effetto di molecole antivirali con attività nota verso altri poxvirus. In particolare, è stato possibile comparare i risultati ottenuti nei confronti del virus orf con quelli osservati nei confronti verso il vaccinia virus, il cowpox virus e il molluscum contagiosum. In quest'ottica il virus orf ha rappresentato un modello nell'ambito della famiglia *Poxviridae*. Contemporaneamente però, sono stati ottenuti risultati utili ed incoraggianti per lo sviluppo di una terapia antivirale dell'ectima contagioso nell'uomo e negli animali. Lo sviluppo di una terapia specifica nei confronti dell'infezione da orf virus è una necessità soprattutto per il trattamento delle forme atipiche o maligne note sia negli animali che nell'uomo. In particolare negli animali queste forme cliniche sono caratterizzate da una maggiore prevalenza d'infezione tra gli adulti e dalla comparsa di lesioni altamente vascolarizzate, con aspetto proliferativo e che difficilmente vanno verso una regressione spontanea. Inoltre anche la letalità tra gli animali colpiti risulta più elevata. Nell'uomo le lesioni atipiche sono di aspetto simil-tumorale e come negli animali difficilmente vanno incontro a regressione spontanea. Queste forme maligne sono più frequenti in pazienti immunodepressi, ma sono note anche in pazienti sani ed in molti casi non possono essere risolte se non con una terapia chirurgica.

B. DISCUSSIONE VIRUS DEL CIMURRO

Nell'ambito di questo lavoro sperimentale sono stati utilizzati due diversi ceppi di cimurro, Bussel e Ondestepoort, entrambi adattati alla crescita in coltura cellulare. Entrambi i ceppi sono stati coltivati su cellule VERO e sono stati utilizzati nelle prove antivirali *in vitro* per testare l'attività antivirale della ribavirina (RBV) e dell'EICAR. Questi composti, analoghi pirimidinici, sono stati scelti per la loro già dimostrata efficacia verso altri virus della famiglia *Paramyxoviridae*, tra cui il virus della parainfluenza, il virus respiratorio sinciziale e il virus del morbillo (De Clercq et al., 1991; Shigeta et al., 1992).

Sono state inizialmente eseguite prove di citotossicità che hanno evidenziato la tossicità della RBV e dell'EICAR sulle cellule in replicazione e non sulle cellule stazionarie, un dato che era già stato osservato da altri Autori nei confronti delle cellule VERO e di altre linee continue, ma anche verso colture cellulari primarie come quelle renali di coniglio (PRK) (De Clercq et al., 1991). L'EICAR è risultato circa otto volte più tossico rispetto alla RBV, a conferma di quanto già riportato in letteratura (De Clercq et al., 1991). La tossicità cellulare è un risultato che sottolinea come entrambe le molecole esercitino un'interferenza con i meccanismi di replicazione cellulare, un fattore che ne compromette altamente la selettività. De Clercq e collaboratori hanno dimostrato che la RBV e l'EICAR riducono l'attività metabolica cellulare riducendo la sintesi di DNA e di RNA cellulare. Analogamente alla citotossicità, anche l'attività antivirale è apparsa superiore per l'EICAR rispetto alla RBV: questo risultato concorda con quelli già osservati in precedenza nei confronti di altri paramyxovirus (Shigeta et al., 1992). Poiché l'attività citostatica di entrambe le molecole è stata evidenziata in cellule in replicazione, mentre l'attività antivirale è stata valutata su cellule a confluenza, è possibile che l'attività antiproliferativa e antivirale vengano esercitate da due meccanismi indipendenti (De Clercq et al., 1991). Infatti, confrontando gli indici di selettività, è stato osservato che per entrambi i composti la selettività è superiore quando viene valutata sulle cellule stazionarie che corrispondono alla condizione nella quale è stata eseguita l'infezione nelle prove antivirali.

La RBV e l'EICAR sono molecole antivirali il cui meccanismo d'azione non è stato ancora completamente chiarito. Probabilmente entrambe agiscono grazie all'effetto sinergico di più meccanismi d'azione. Tra quelli fino ad ora noti vi è l'inibizione

dell'enzima cellulare IMPDH (Streeter et al., 1977; Leyssen et al., 2005), l'inibizione della trascrizione virale e della replicazione virale (Goswami et al., 1979; Benarroch et al., 2004; Patterson et al., 1990; Maag et al., 2001), un effetto mutageno (Crotty et al., 2001) e infine un effetto immunomodulatore (Fang et al., 2000).

Al fine di comprendere il meccanismo d'azione della RBV e dell'EICAR, sono state eseguite diverse prove antivirali ed è stato possibile mettere in evidenza che, nei confronti del virus del cimurro, entrambi i composti agiscono in parte attraverso l'inibizione dell'enzima IMPDH cellulare, riducendo il pool intracellulare di GMP, GDP e GTP necessari ai fini della replicazione virale e della sintesi degli acidi nucleici. È stato infatti dimostrato che aggiungendo al terreno di coltura la guanosina, si poteva inibire completamente l'attività antivirale sia della RBV che dell'EICAR. La guanosina monofosfato è il prodotto dell'attività dell'enzima IMPDH, quindi aggiungendo guanosina al terreno di coltura viene superato l'ostacolo indotto dalla presenza della RBV e dell'EICAR. La presenza di guanosina alle concentrazioni di 5, 10 e 20 µg/ml, è stata in grado di sovvertire completamente l'effetto antivirale della RBV e dell'EICAR, mentre a concentrazioni superiori (50 e 100 µg/ml) l'attività antivirale è stata solo parzialmente inibita. Poiché la guanosina ha proprietà citotossiche soprattutto sulle cellule in replicazione, è possibile che a concentrazioni di 50 e 100 µg/ml la guanosina modifichi le caratteristiche molecolari delle cellule, causando una ridotta capacità del virus del cimurro a replicare e a dare effetto citopatico.

La dimostrazione che sia la RBV che l'EICAR esercitano un'inibizione dell'enzima IMPDH cellulare, non esclude che possano esserci altri meccanismi d'azione alla base della loro proprietà antivirale nei confronti del cimurro.

La prova della carica virale è stata effettuata per valutare quantitativamente l'influenza di diverse concentrazioni dei due composti a tre intervalli di tempo dall'infezione nei confronti di due parametri diversi: il titolo virale e la quantità di acido nucleico virale. Il titolo virale esprime la presenza di virioni infettanti, mentre la quantità RNA virale esprime la funzionalità dei meccanismi di replicazione virale che portano alla sintesi di nuovo acido nucleico. La prova della carica virale ha confermato la maggiore attività antivirale dell'EICAR rispetto alla RBV. Inoltre, confrontando i risultati ottenuti dalla titolazione e dalla quantificazione dell'RNA virale, è stato osservato che alle diverse concentrazioni dei due composti e nei diversi intervalli di tempo, esiste uno stretto

parallelismo tra la diminuzione del titolo e la diminuzione dell'RNA virale. Questo potrebbe significare che la RBV e l'EICAR agiscono inibendo la sintesi dell'acido nucleico virale che si riflette poi in una diminuzione dei virioni infettanti.

La prova del time of addition ha evidenziato che solo in seguito all'aggiunta di RBV ed EICAR entro le 8-10 ore post-infezione si ottiene l'inibizione della crescita in coltura del virus del cimurro. Entrambi i composti hanno quindi un target virale che agisce entro le 10 ore dall'inizio dell'infezione. Per valutare l'identità di questo target virale, è stato analizzato il ciclo replicativo del virus del cimurro in coltura. Questo studio ha rivelato che a distanza di 16 ore dall'infezione si ha la comparsa di nuovi virioni completi a livello intracellulare e che soltanto 8 ore dopo si ha l'evidenza dei primi virioni infettanti anche nel surnatante della coltura cellulare. Questo risultato dimostra che la durata di un ciclo replicativo del virus del cimurro coltivato su cellule VERO sia di 24 ore, comprendendo la prima fase di adsorbimento virale fino al rilascio di una nuova progenie virale nel surnatante della coltura cellulare infetta. Nella coltura cellulare infetta è stato osservato inoltre un aumento esponenziale del titolo virale tra le 16 e le 48 ore post-infezione, mentre tra le 48 e le 72 ore post-infezione è stata riscontrata una fase di plateau che è stata probabilmente causata dalla morte cellulare virus-indotta e quindi dall'assenza di cellule vive in grado di sostenere la replicazione virale. A livello molecolare, lo studio del ciclo replicativo ha evidenziato che già dopo 8 ore dall'infezione è presente mRNA virale all'interno delle cellule infette, sottolineando come la massima attività dell'RNA polimerasi-RNA dipendente si esplicherebbe prevalentemente durante la fase di trascrizione. Questo dato è sovrapponibile a quanto già dimostrato da Plumet e collaboratori in merito alla funzionalità dell'RNA polimerasi-RNA dipendente del virus del morbillo (Plumet et al., 2005). Studiando la dinamica di questo enzima virale, essi hanno concluso che entro le prime 12 ore essa agirebbe prevalentemente come trascrittasi virale e che solo a partire dalle 16 ore post-infezione inizi a svolgere anche una funzione di replicasi (Plumet et al., 2005). Anche dai risultati dello studio condotto sul ciclo replicativo del virus del cimurro è possibile affermare che solo a partire dalle 16 ore post-infezione inizi una fase esponenziale di replicazione del genoma virale.

In base ai risultati e alle considerazioni relative al ciclo di replicazione del virus del cimurro, è possibile ipotizzare che il target virale della RBV e dell'EICAR possa essere

l'RNA polimerasi-RNA dipendente virale durante la sua funzione di trascrizione dell'mRNA. L'RNA polimerasi-RNA dipendente del cimurro è costituita da un complesso di proteine che agiscono in sinergismo garantendo diverse funzioni importanti ai fini della replicazione e della trascrizione virale.

Per il virus del morbillo è stato evidenziato che il complesso replicativo è costituito dalle proteine N, P ed L, ed è caratterizzato dalla presenza di regioni disordinate, cioè regioni che non hanno una struttura secondaria o terziaria definita. Da questo deriva l'elevato grado di flessibilità delle proteine N e P come già dimostrato per il virus del morbillo che è caratterizzato da regioni disordinate rispettivamente nella porzione N-terminale e C-terminale delle proteine N e P, mentre la proteina L ne sarebbe sprovvista. Buorhis e collaboratori propongono un modello alla base della replicazione del morbillo in funzione della presenza delle regioni disordinate della proteina N e P. In particolare, il complesso formato dalla proteina L e P interagisce con le porzioni disordinate della proteina N che sporgono dal nucleocapside virale, all'interno del quale si trova il genoma virale. All'interno del complesso L-P avviene la sintesi di un nuovo filamento di RNA che viene contemporaneamente incapsidato grazie alla presenza di un complesso proteico formato dall'interazione della porzione disordinata C-terminale della P e monomeri della proteina N (Figura 1).

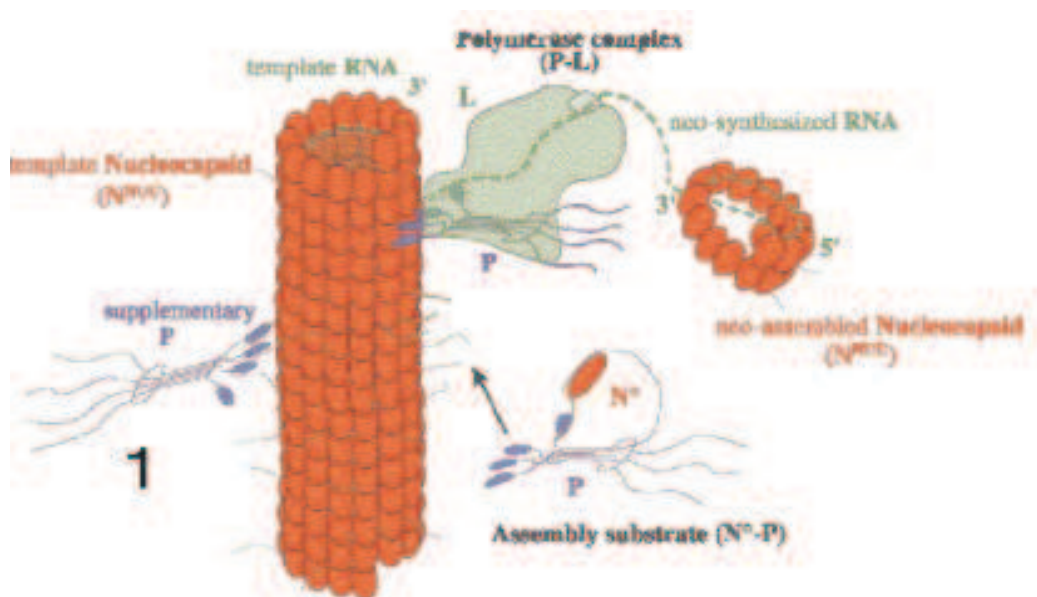


Figura 1: Rappresentazione dell'attività del complesso replicativo del virus del morbillo ([Bourhis et al., 2006](#)).

Una predizione delle regioni disordinate delle proteine del cimurro N e P ha confermato che anche per questo virus la porzione N-terminale della N e C-terminale della P sono caratterizzate da disordine strutturale (Figura 2). Il modello proposto da Bourhis e collaboratori potrebbe quindi essere valido anche per il virus del cimurro. La comprensione delle modalità con le quali il complesso replicativo del cimurro svolge le proprie molteplici funzioni, rappresenta un elemento fondamentale per lo studio della replicazione virale e del meccanismo d'azione della RBV, dell'EICAR e anche di altri antivirali.

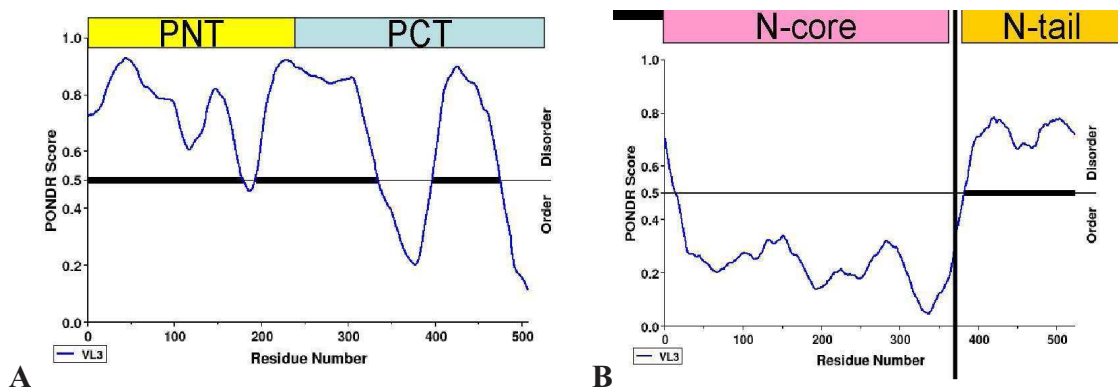


Figura 2: Nella figura A e B sono rappresentati i grafici della distribuzione delle regioni ordinate e disordinate rispettivamente della proteina N e P del virus del cimurro (PONDNR, Molecular Kinetics, Inc.).

In questo lavoro la valutazione dell'attività della RBV e dell'EICAR rappresenta un primo esempio dello studio di antivirali rivolti verso il virus del cimurro canino, una malattia che è caratterizzata da un'elevata letalità e nei confronti della quale la vaccinazione può non risultare protettiva a causa della variabilità antigenica del virus di campo rispetto al virus vaccinale. Lo sviluppo di antivirali nei confronti del virus del cimurro è auspicabile per una futura applicazione in medicina veterinaria, ma anche per un loro utilizzo nei confronti di virus filogeneticamente correlati a quello del cimurro e causa di malattia nell'uomo. Le analogie strutturali delle proteine che compongono il complesso replicativo di CDV e MV confermano che i due virus utilizzino meccanismi analoghi per la loro replicazione. Per questo motivo il CDV potrebbe rappresentare un ottimo modello per gli studi di efficacia antivirale *in vitro*, mentre il cane potrebbe

rappresentare un buon modello di patologia spontanea per gli studi *in vivo*. Il virus del cimurro è la causa nel cane di una malattia esantematica con aspetti patogenetici e clinici molto simili a quelli del morbillo nell'uomo. Inoltre entrambi i virus hanno tropismo per il SNC e possono causare sia infezioni acute che croniche. Un particolare parallelismo è noto tra la panencefalite subacuta sclerosante (SSPE) indotta dalla persistenza del virus del morbillo e l'encefalite del cane vecchio (ODE) causata dalla persistenza nel SNC del virus del cimurro. La RBV è stata utilizzata sia recentemente che in passato nella terapia sperimentale della SSPE, con risultati che sottolineano l'efficacia di questo antivirale, ma anche la necessità di approfondirne il meccanismo d'azione. In quest'ottica il virus del cimurro può essere considerato un ottimo modello nello studio della RBV e di altri antivirali candidati nella terapia della SSPE.

L'encefalomielite cronica del cane adulto causata dal cimurro possiede analogie con la sclerosi multipla dell'uomo. Sono entrambe patologie croniche caratterizzate da progressiva demielinizzazione. Inoltre poiché per la sclerosi multipla è stata proposta un'eziologia infettiva ed in particolare di origine virale, l'encefalite demielinizzante cronica causata dal cimurro potrebbe rappresentare un valido modello nello studio della patogenesi delle lesioni e di farmaci ai fini terapeutici.

In conclusione, questo lavoro presenta i risultati e le considerazioni relative ad uno studio di attività antivirale con l'utilizzo di due virus animali, il virus orf e il virus del cimurro. Per entrambi esiste un interesse particolare nello sviluppo e nella disponibilità di farmaci antivirali specifici nell'ambito della medicina veterinaria. Al tempo stesso, entrambi i virus possono essere utilizzati anche come modello nella ricerca di farmaci attivi verso virus a loro filogeneticamente correlati e responsabili di patologie umane.

Figura 1

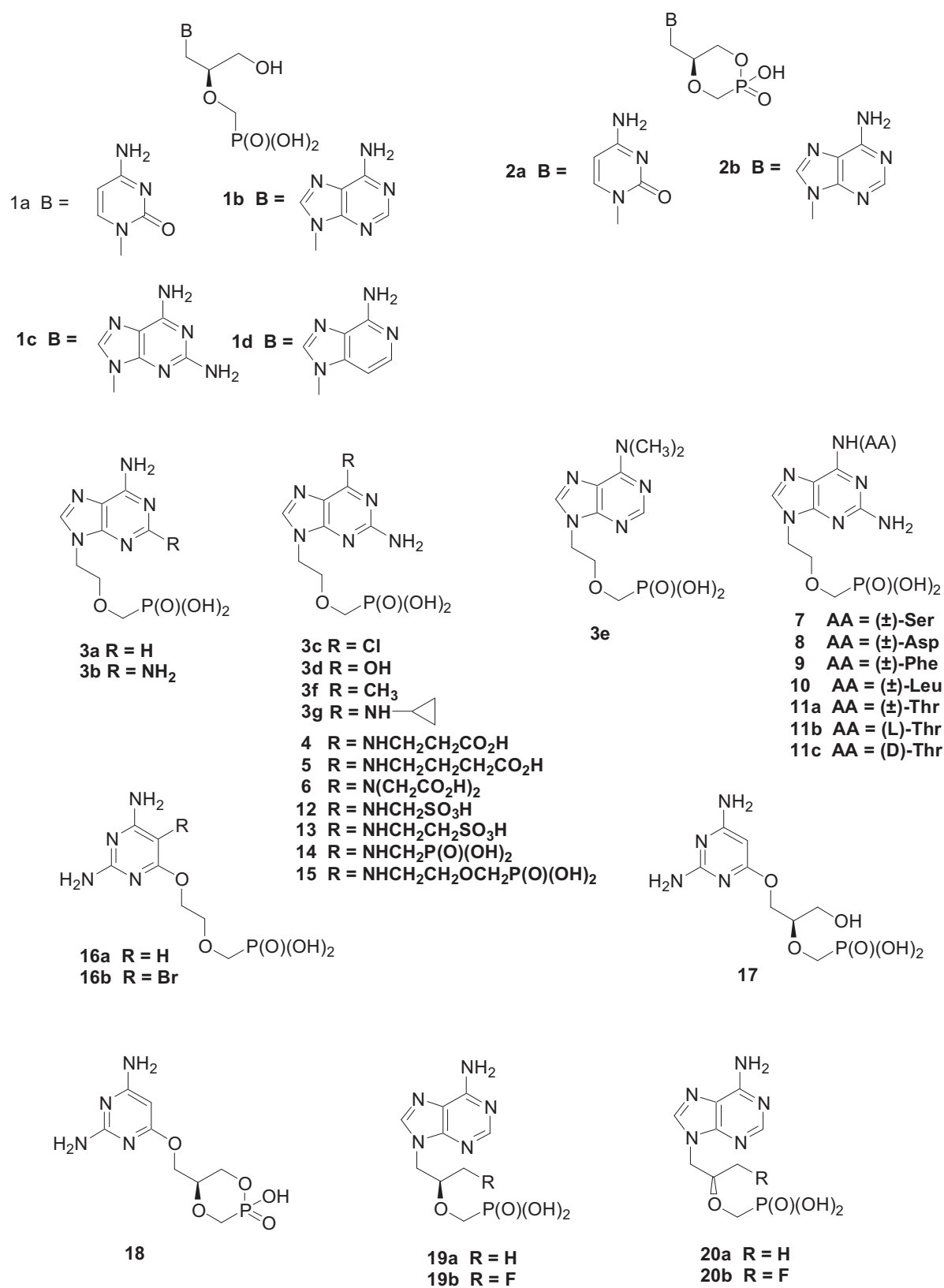


Figura 1: Struttura degli ANPs testati nei confronti del virus orf. I numeri al di sotto delle strutture fanno riferimento alla numerazione dei composti come da Tabella 1 nella parte Materiali e Metodi del virus orf.

Figura 2

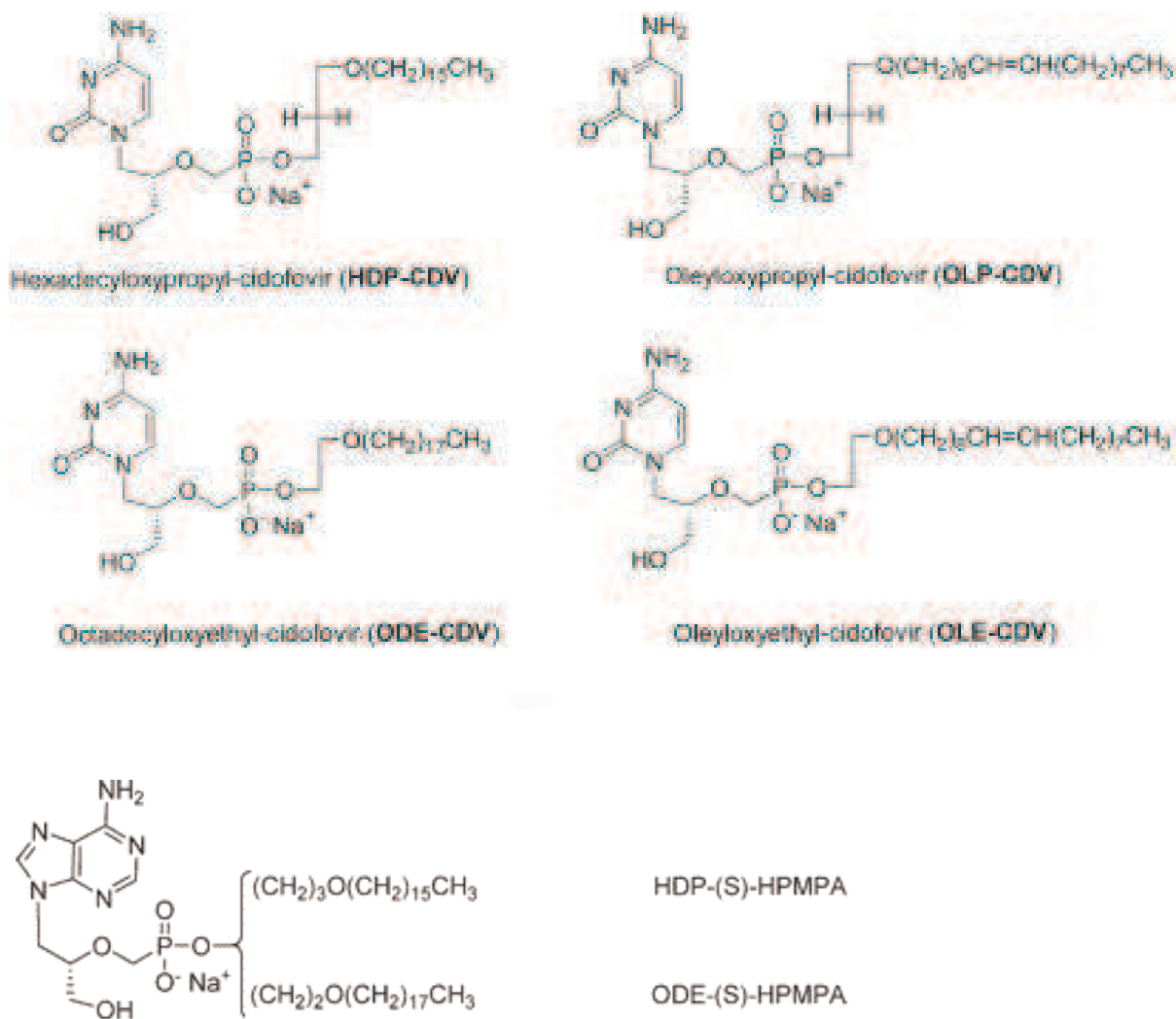


Figura 2: struttura degli analoghi alcoxialchilici del CDV e dell'HPMPA testati nei confronti del virus orf.

Figura 3

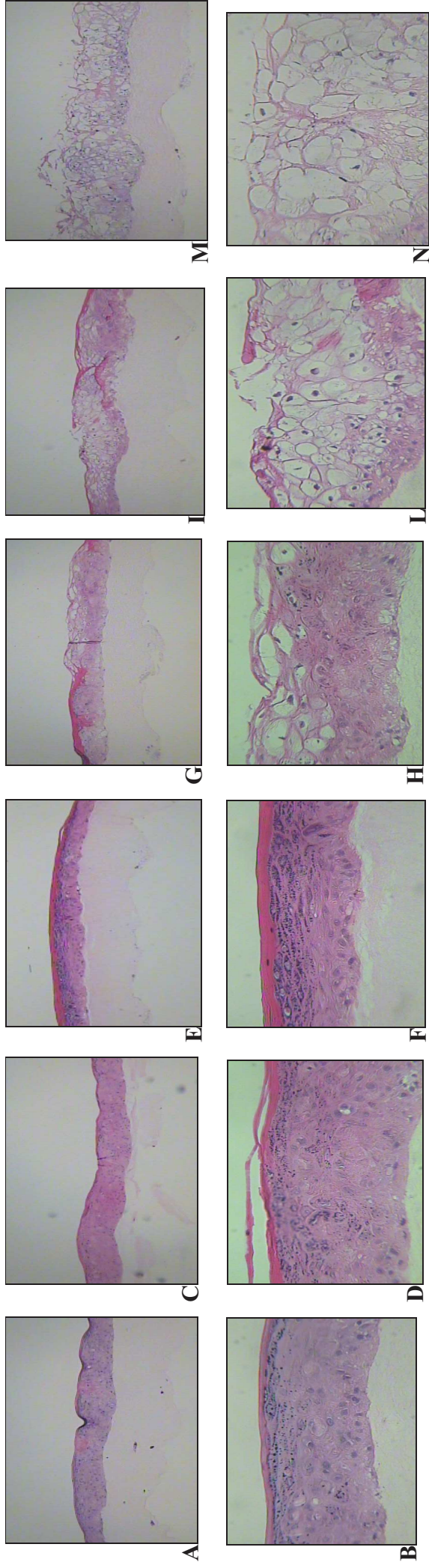


Figura 3: Aspetto istopatologico dei raft cultures osservati con due tipi di ingrandimento: 10 x nella riga superiore e 40 x in quella inferiore. Inoltre nella prima e nell'ultima colonna sono riportati rispettivamente il controllo cellule non infetto e il controllo virus non trattato. Le 4 colonne centrali invece mostrano l'aspetto delle colture organotipiche in presenza di HPMPC alle seguenti concentrazioni: 50 µg/ml (figure C e D), 20 µg/ml (figure E e F), 5 µg/ml (figure G e H) e 2 µg/ml (figure I e L).

Figura 4

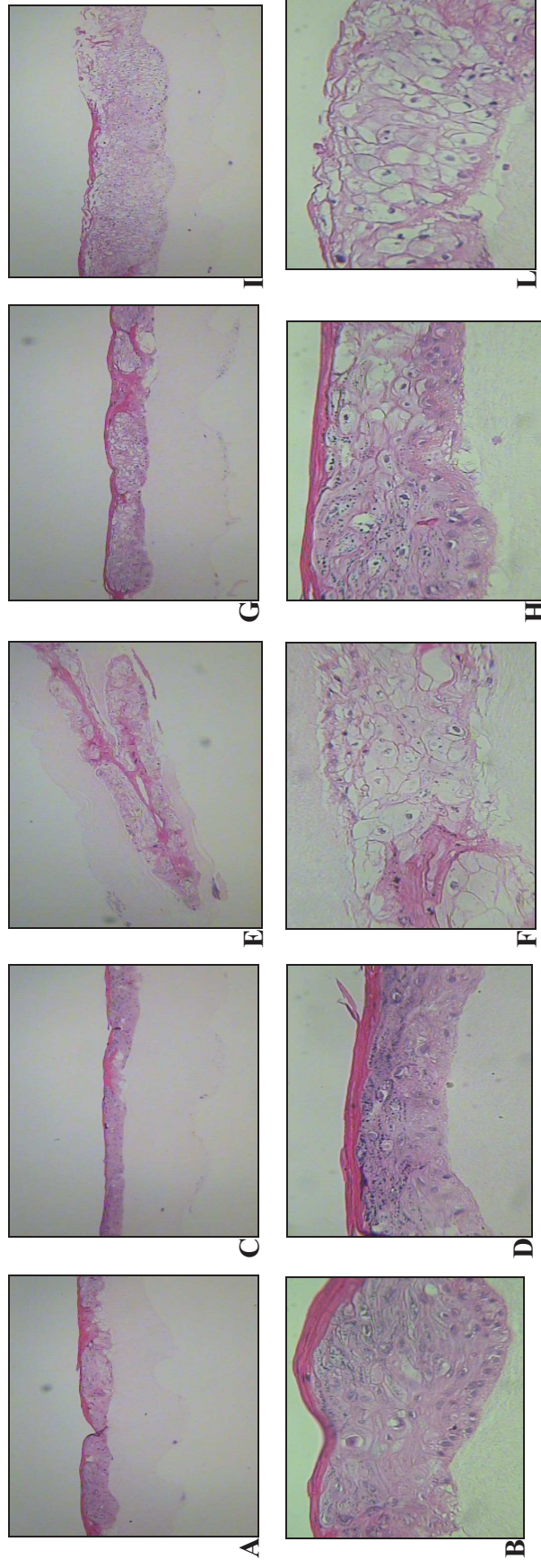


Figura 4: Aspetto istopatologico dei raft cultures in presenza di HPMPDAP alle seguenti concentrazioni: 50 µg/ml (figure A e B), 20 µg/ml (figure C e D), 5 µg/ml (figure E e F), 2 µg/ml (figure G e H) e 0.5 µg/ml (figure I e L). La riga superiore mostra il raft ad un ingrandimento di 10 x, mentre quella inferiore ad un ingrandimento di 40 x.

Figura 5

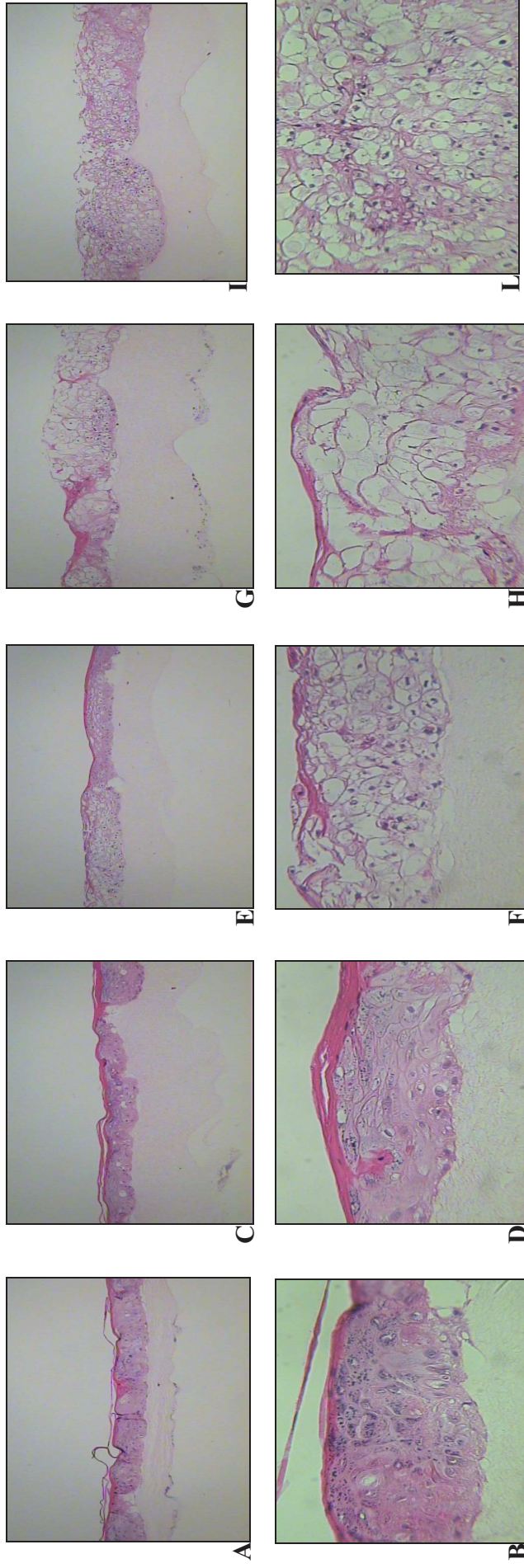


Figura 5: Aspetto istopatologico dei raft cultures in presenza di HPMPO-DAPy alle concentrazioni di 50 $\mu\text{g/ml}$ (figure A e B), 20 $\mu\text{g/ml}$ (figure C e D), 5 $\mu\text{g/ml}$ (figure E e F), 2 $\mu\text{g/ml}$ (figure G e H) e 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (figure I e L). La riga superiore mostra il raft ad un ingrandimento di 10 x, mentre quella inferiore ad un ingrandimento di 40 x.

BIBLIOGRAFIA

1. Abu Elzein E.M.E., Housawi F.M.T. (1997). Severe long lasting contagious Ectyima infection in goat's kid. *Journal of Veterinary Medicine*, 64: 61-62.
2. Acciarri A. (1968). Su di una interessante forma di ectima contagioso degli ovini. *Veterinaria Italiana, Rivista di Igiene, Profilassi e Terapia*, XIX: 567-572.
3. Adams J.M. (1975): "Old dog encephalitis and demyelinating diseases in man". *Veterinary Pathology*, 12: 220-226.
4. Agger WA, Webster SB. Human orf infection complicated by erythema multiforme. *Cutis*. 1983 Mar;31(3):334-8.
5. Alldinger S., Baumgartner W., Orvell C., Van Moll P. (1993): "In vivo and in vitro expression of canine distemper viral proteins in dogs and non-domestic carnivores". *Archives of Virology*, 132: 421-428.
6. Allen LB, Boswell KH, Khwaja TA, Meyer RB Jr, Sidwell RW, Witkowski JT, Christensen LF, Robins RK. Synthesis and antiviral activity of some phosphates of the broad-spectrum antiviral nucleoside, 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (ribavirin). *J Med Chem*. 1978 Aug;21(8):742-6.
7. Allworth M.B. et al, (1987). Contagious pustular dermatitis (orf) of sheep affecting the ear following ear tagging. *Australian Veterinary Journal*, 64 (2): 61-62..
8. Appel M.J.G. (1987) : "Canine distemper virus" in: *Virus infection of Carnivores*. Ed. Elsevier, Amsterdam, pp. 133-159.
9. Appel M.J.G. (1994): "Canine distemper epizootics in lions, tiger, and leopard in North America". *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 6: 277-288.
10. Appel M.J.G., Peare-Kelling S., Summers B.A. (1969): "Pathogenesis of Canine distemper". *American Journal of Veterinary Research*, 30: 1167-1182.
11. Appel M.J.G., Shek W.R., Summers B.A. (1982): "Lymphocyte-mediated immune cytotoxicity in dogs infected with virulent canine distemper virus". *Infection Immunology*, 37: 592-600.
12. Axthelm M.K., Krakowka S. (1987): "Canine distemper virus-induced thrombocytopenia". *American Journal of Veterinary Research*, 48: 1269-1275.
13. Axthelm M.K., Krakowka S. (1998): "Experimental old dog encephalitis (ODE) in a gnotobiotic dog". *Veterinary Pathology*, 35: 527-534.

14. Balzarini J, Keyaerts E, Vijgen L, Egberink H, De Clercq E, Van Ranst M, Printsevskaya SS, Olsufyeva EN, Solovieva SE, Preobrazhenskaya MN. Inhibition of feline (FIPV) and human (SARS) coronavirus by semisynthetic derivatives of glycopeptide antibiotics. *Antiviral Res.* 2006 Oct;72(1):20-33.
15. Balzarini J, Pannecouque C, Naesens L, Andrei G, Snoeck R, De Clercq E, Hockova D, Holy A. 6-[2-phosphonomethoxy]alkoxy]-2,4-diaminopyrimidines: a new class of acyclic pyrimidine nucleoside phosphonates with antiviral activity. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2004 Oct;23(8-9):1321-7. 6-[2-phosphonomethoxy]alkoxy]-2,4-diaminopyrimidines: a new class of acyclic pyrimidine nucleoside phosphonates with antiviral activity. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2004 Oct;23(8-9):1321-7.
16. Barnard DL. Inhibitors of measles virus. *Antivir Chem Chemother.* 2004 May;15(3):111-9.
17. Barrett T. Morbillivirus infections, with special emphasis on morbilliviruses of carnivores. *Vet Microbiol.* 1999 Sep 1;69(1-2):3-13.
18. Baumgartner W. (1993): "Virale Infektionskrankheiten bei Welpen und Junghunden unter besonderer Berücksichtigung der Staupevirusinfektion". *Der Praktische Tierarzt*, 1: 26-32.
19. Baumgartner W., Orvell C., Reinacher M. (1989): "Naturally occurring canine distemper virus encephalitis: distribution and expression of viral polypeptides in nervous system". *Acta Neuropathologica*, 78: 504-512.
20. Baxby D, Bennett M. Cowpox: a re-evaluation of the risks of human cowpox based on new epidemiological information. *Arch Virol Suppl.* 1997;13:1-12.
21. Benarroch D, Egloff MP, Mulard L, Guerreiro C, Romette JL, Canard B. A structural basis for the inhibition of the NS5 dengue virus mRNA 2'-O-methyltransferase domain by ribavirin 5'-triphosphate. *J Biol Chem.* 2004 Aug 20;279(34):35638-43.
22. Biron KK. Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases. *Antiviral Res.* 2006 Sep;71(2-3):154-63. Epub 2006 May 23.
23. Bo S., Bollo E., Garetto M., Lotti D. (1991): "Il virus del cimurro: aspetti eziopatogenetici, clinici e diagnostici". *Il nuovo progresso veterinario*, 12: 427-430.

24. Bodnar M.J., Miller F., Tyler W.B. (1999). Facial Orf. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 40: 815-817.
25. Bollo E., Zurbriggen A., Vandeveldelde M., Frankhauser R. (1986): "Canine distemper virus clearance in chronic inflammatory demyelination". *Acta Neuropathologica*, 72: 69-73.
26. Bollo E., Valenza F., Cornaglia E. (1988): "Evidenziazione delle proteine strutturali del virus del cimurro mediante anticorpi monoclonali nelle lesioni del sistema nervoso centrale del cane". *Bollettino A.I.V.P.A.*, 1: 5-9.
27. Bossart KN, Broder CC. Developments towards effective treatments for Nipah and Hendra virus infection. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2006 Feb;4(1):43-55.
28. Botteron C., Zurbriggen A., Griot C., Vandeveldelde M. (1992): "Canine distemper virus-immune complexes induce bystander degeneration of oligodendrocytes". *Acta Neuropathologica*, 83: 402-407.
29. Boughton I.B., Hardy W.T. (1935). Immunization of sheep and goats against soremouth (contagious ecthyma). *Texas agric. Exp: Stn Bull.* n° 504.
30. Bourhis JM, Canard B, Longhi S. Structural disorder within the replicative complex of measles virus: functional implications. *Virology.* 2006 Jan 5;344(1):94-110.
31. Buller RM, Owens G, Schriewer J, Melman L, Beadle JR, Hostetler KY. Efficacy of oral active ether lipid analogs of cidofovir in a lethal mousepox model. *Virology.* 2004 Jan 20;318(2):474-81.
32. Burkhard MJ, Dean GA. Transmission and immunopathogenesis of FIV in cats as a model for HIV. *Curr HIV Res.* 2003 Jan;1(1):15-29.
33. Büttner M., Rziha H.J. (2002). Parapoxviruses: From the Lesion to the Viral Genome. *Journal of Veterinary Medicine*, 49: 7-16
34. Byrd CM, Bolken TC, Mjalli AM, Arimilli MN, Andrews RC, Rothlein R, Andrea T, Rao M, Owens KL, Hruby DE. New class of orthopoxvirus antiviral drugs that block viral maturation. *J Virol.* 2004 Nov;78(22):12147-56.
35. Campo MS. Animal models of papillomavirus pathogenesis. *Virus Res.* 2002 Nov;89(2):249-61.
36. Carmichael L.E. (1999): "Canine viral vaccines at a turning point: a personal prospective". *Advances in Veterinary Medicine*, 41: 289-307.

37. Castrucci G. (1980): "Infezioni da virus degli animali domestici, Orthomyxoviridae-Paramyxoviridae". Ed. Esculapio, Bologna, pp. 147-170.
38. Cattaneo R, Kaelin K, Baczko K, Billeter MA. Measles virus editing provides an additional cysteine-rich protein. *Cell*. 1989 Mar 10;56(5):759-64.
39. Chan WW. Multiple sclerosis and dogs. *Lancet*. 1977 Feb 26;1(8009):487-8.
40. Chappuis G. (1994): "La maladie de Carré". *Recueil de Médecine Veterinaire*, 170: 645-652.
41. Chappuis G. Control of canine distemper. *Vet Microbiol*. 1995 May;44(2-4):351-8.
42. Christensen ND, Pickel MD, Budgeon LR, Kreider JW. In vivo anti-papillomavirus activity of nucleoside analogues including cidofovir on CRPV-induced rabbit papillomas. *Antiviral Res*. 2000 Nov;48(2):131-42.
43. Christensen ND. Cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) model system to test antiviral and immunotherapeutic strategies. *Antivir Chem Chemother*. 2005;16(6):355-62.
44. Ciesla SL, Trahan J, Wan WB, Beadle JR, Aldern KA, Painter GR, Hostetler KY. Esterification of cidofovir with alkoxyalkanols increases oral bioavailability and diminishes drug accumulation in kidney. *Antiviral Res*. 2003 Aug;59(3):163-71.
45. Clark C, McIntyre PG, Evans A, McInnes CJ, Lewis-Jones S. Human sealpox resulting from a seal bite: confirmation that sealpox virus is zoonotic. *Br J Dermatol*. 2005 Apr;152(4):791-3.
46. Collins P. The spectrum of antiviral activities of acyclovir in vitro and in vivo. *J Antimicrob Chemother*. 1983 Sep;12 Suppl B:19-27.
47. Cottone R., Buttner M., McInnes C.J., Wood A.R., Rziha H.J. (2002). Orf virus encodes a functional dUTPase gene. *Journal of General Virology*, 83: 1043-1048.
48. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*. 1999 Oct;12(4):564-82.
49. Crotty S, Cameron CE, Andino R. RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jun 5;98(12):6895-900.
50. Crumbie A. (1998). The Orf virus: a disease of the farming community. *Community nurse*, 6: 44-45.

51. Cummings BJ, Head E, Ruehl W, Milgram NW, Cotman CW. The canine as an animal model of human aging and dementia. *Neurobiol Aging*. 1996 Mar-Apr;17(2):259-68.
52. De Clercq E, Andrei G, Balzarini J, Leyssen P, Naesens L, Neyts J, Pannecouque C, Snoeck R, Ying C, Hockova D, Holy A. Antiviral potential of a new generation of acyclic nucleoside phosphonates, the 6-[2-(phosphonomethoxy)alkoxy]-2,4-diaminopyrimidines. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2005;24(5-7):331-41.
53. De Clercq E, Cools M, Balzarini J, Snoeck R, Andrei G, Hosoya M, Shigeta S, Ueda T, Minakawa N, Matsuda A. Antiviral activities of 5-ethynyl-1-beta-D-ribofuranosylimidazole-4- carboxamide and related compounds. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991 Apr;35(4):679-84.
54. De Clercq E, Field HJ. Antiviral prodrugs - the development of successful prodrug strategies for antiviral chemotherapy. *Br J Pharmacol*. 2006 Jan;147(1):1-11.
55. De Clercq E, Holy A, Rosenberg I, Sakuma T, Balzarini J, Maudgal PC. A novel selective broad-spectrum anti-DNA virus agent. *Nature*. 1986 Oct 2-8;323(6087):464-7.
56. De Clercq E. Antivirals and antiviral strategies. *Nat Rev Microbiol*. 2004 Sep;2(9):704-20.
57. De Clercq E. Highlights in the development of new antiviral agents. *Mini Rev Med Chem*. 2002 Apr;2(2):163-75.
58. De Clercq E. Interferon and its inducers--a never-ending story: "old" and "new" data in a new perspective. *J Infect Dis*. 2006 Sep 15;194 Suppl 1:S19-26.
59. De Clercq E. Potential of acyclic nucleoside phosphonates in the treatment of DNA virus and retrovirus infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2003 Jun;1(1):21-43.
60. De Clercq E. Vaccinia virus inhibitors as a paradigm for the chemotherapy of poxvirus infections. *Clin Microbiol Rev*. 2001 Apr;14(2):382-97.
61. de la Fuente R, Awan AR, Field HJ. The acyclic nucleoside analogue penciclovir is a potent inhibitor of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) in tissue culture and in a murine model. *Antiviral Res*. 1992 May;18(1):77-89.

62. de Mari K, Maynard L, Sanquer A, Lebreux B, Eun HM. Therapeutic effects of recombinant feline interferon-omega on feline leukemia virus (FeLV)-infected and FeLV/feline immunodeficiency virus (FIV)-coinfected symptomatic cats. *J Vet Intern Med.* 2004 Jul-Aug;18(4):477-82.
63. de Souza Trindade G, da Fonseca FG, Marques JT, Nogueira ML, Mendes LC, Borges AS, Peiro JR, Pituco EM, Bonjardim CA, Ferreira PC, Kroon EG. Aracatuba virus: a vaccinia-like virus associated with infection in humans and cattle. *Emerg Infect Dis.* 2003 Feb;9(2):155-60.
64. Degraeve C., De Coninck A., Senneseael J., Roseeuw D. (1999). Recurrent contagious ecthyma (orf) in an immunocompromised host successfully treated with cryotherapy. *Dermatology*, 198: 162-163.
65. Denizot F, Lang R (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modification to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability.
66. Di Giulio DB, Eckburg PB. Human monkeypox: an emerging zoonosis. *Lancet Infect Dis.* 2004 Jan;4(1):15-25.
67. Di Guardo G, Marruchella G, Agrimi U, Kennedy S. Morbillivirus infections in aquatic mammals: a brief overview. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 2005 Mar;52(2):88-93.
68. Di Marco V., Guercio A., Caracappa S. (2000). Un caso atipico di ectima contagioso "maligno". *Obiettivi & documenti veterinari*, 12: 29-35.
69. Downie AW, Taylor-Robinson CH, Caunt AE, Nelson GS, Manson-Bahr PE, Matthews TC. Tanapox: a new disease caused by a pox virus. *Br Med J.* 1971 Feb 13;1(5745):363-8.
70. Dumbell K, Richardson M. Virological investigations of specimens from buffaloes affected by buffalopox in Maharashtra State, India between 1985 and 1987. *Arch Virol.* 1993;128(3-4):257-67.
71. Dupre A, Christol B, Lassere J. Atopic dermatitis and pox-virus superinfections. *Ann Dermatol Venereol.* 1981;108(11):829-34.
72. D'Urso AM, Giannechini S, Esposito C, Alcaro MC, Sichi O, Armenante MR, Carotenuto A, Papini AM, Bendinelli M, Rovero P. Development of antiviral fusion

- inhibitors: short modified peptides derived from the transmembrane glycoprotein of feline immunodeficiency virus. *Chembiochem*. 2006 May;7(5):774-9.
73. Eaton BT, Broder CC, Wang LF. Hendra and Nipah viruses: pathogenesis and therapeutics. *Curr Mol Med*. 2005 Dec;5(8):805-16.
 74. Eriksson B, Helgstrand E, Johansson NG, Larsson A, Misiorny A, Noren JO, Philipson L, Stenberg K, Stening G, Stridh S, Oberg B. Inhibition of influenza virus ribonucleic acid polymerase by ribavirin triphosphate. *Antimicrob Agents Chemother*. 1977 Jun;11(6):946-51.
 75. Fang SH, Hwang LH, Chen DS, Chiang BL. Ribavirin enhancement of hepatitis C virus core antigen-specific type 1 T helper cell response correlates with the increased IL-12 level. *J Hepatol*. 2000 Nov;33(5):791-8.
 76. Fernandez-Larsson R, Patterson JL. Ribavirin is an inhibitor of human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Mol Pharmacol*. 1990 Dec;38(6):766-70.
 77. Ferrando MF, Leaute-Labreze C, Fleury H, Taieb A. Orf and erythema multiforme in a child. *Pediatr Dermatol*. 1997 Mar-Apr;14(2):154-5.
 78. Forni AL, Schluger NW, Roberts RB. Severe measles pneumonitis in adults: evaluation of clinical characteristics and therapy with intravenous ribavirin. *Clin Infect Dis*. 1994 Sep;19(3):454-62
 79. Frey SE, Belshe RB. Poxvirus zoonoses--putting pocks into context. *N Engl J Med*. 2004 Jan 22;350(4):324-7.
 80. Frisk A.L., Koning M., Moritz A., Baumgartner W. (1999): "Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood and cerebrospinal fluid from dogs with distemper". *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 3634-3643.
 81. Frolich K., Czupalla O., Haas L., Hentschke J., Dedek J., Fickel J. (2000): "Epizootological investigation of CDV in free rancing carnivores from Germany". *Veterinary Microbiology*, 74: 283-292.
 82. Fulton RW, Burge LJ. Susceptibility of feline herpesvirus 1 and a feline calicivirus to feline interferon and recombinant human leukocyte interferons. *Antimicrob Agents Chemother*. 1985 Nov;28(5):698-9.

83. Gallina L, Dal Pozzo F, Mc Innes CJ, Cardeti G, Guercio A, Battilani M, Ciulli S, Scagliarini A. A real time PCR assay for the detection and quantification of orf virus. *J Virol Methods*. 2006 Jun;134(1-2):140-5.
84. Gallina L, Scagliarini A, Ciulli S, Prosperi S. Cloning and expression of the Orf virus F1L gene: possible use as a subunit vaccine. *Vet Res Commun*. 2004 Aug;28 Suppl 1:291-3.
85. Gardiner M.R., Craig J., Nairn M.F. (1967). An unusual outbreak of contagious ecthyma (scabby mouth) in sheep. *Australian Veterinary Journal*, 43, 163.
86. Gassmann U., Wyler R., Wittek R. (1985). Analysis of Parapoxvirus genomes. *Archives of Virology*, 83: 17-31.
87. Geerinck K., Lukito G., Snoeck R., De Vos R., De Clercq E., Vanrenterghem Y., Degreef H., Maes B. (2001). A case of human orf in an immunocompromised patient, successfully treated with cidofovir cream. *J. Med. Virol.*, 64: 543-549.
88. Georges-Courbot MC, Contamin H, Faure C, Loth P, Baize S, Leyssen P, Neyts J, Deubel V. Poly(I)-poly(C12U) but not ribavirin prevents death in a hamster model of Nipah virus infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 May;50(5):1768-72.
89. Gibson J.P., Griesemer R.A., Koestner A. (1965): "Experimental distemper in the gnotobiotic dog". *Pathology Veterinary*, 2: 1-19.
90. Gibson JS, O'Neill T, Thackray A, Hannant D, Field HJ. Serological responses of specific pathogen-free foals to equine herpesvirus-1: primary and secondary infection, and reactivation. *Vet Microbiol*. 1992 Oct;32(3-4):199-214.
91. Gilden DH. Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2005 Mar;4(3):195-202.
92. Gill M.J. (1990). Human Orf. A diagnostic consideration. *Archives of dermatology*, 126(3): 356-358.
93. Gilray J.A., Nettleton P.F., Oow I., Lewis C.J., Stephens S.A., Madeley J.D., Reid H.V. (1998). Restriction endonuclease profiles of Orf virus isolates from British Isles. *Veterinary Record*, 143: 237-240.
94. Giulia D, Francesca V, Sandra S, Alessandra S, Gualtierio G, Luciana G, Laura C. A molecular study of hippocampus in dogs with convulsion during canine distemper virus encephalitis. *Brain Res*. 2006 Jul 7;1098(1):186-95.

95. Glaus T., Griot C., Richard A. (1990): "Ultrastructural and biochemical findings in brain cell culture infected with canine distemper virus". *Acta Neuropathologica*, 80: 59-67.
96. Goswami BB, Borek E, Sharma OK, Fujitaki J, Smith RA. The broad spectrum antiviral agent ribavirin inhibits capping of mRNA. *Biochem Biophys Res Commun*. 1979 Aug 13;89(3):830-6.
97. Graber H.U., Muller C.F., Vandeveld M., Zurbriggen A. (1993): "Restricted infection with canine distemper virus leads to down-regulation of myelin gene transcription in culture oligodendrocytes". *Acta Neuropathologica*, 90: 312-318.
98. Graci JD, Cameron CE. Mechanisms of action of ribavirin against distinct viruses. *Rev Med Virol*. 2006 Jan-Feb;16(1):37-48.
99. Grancher N, Venard V, Kedzierewicz F, Ammerlaan W, Finance C, Muller CP, Le Faou A. Improved antiviral activity in vitro of ribavirin against measles virus after complexation with cyclodextrins. *Antiviral Res*. 2004 Jun;62(3):135-7.
100. Greene C., Appel M.J.G. (1991): "Canine distemper". In: Greene C., Appel M.J.G. (Ed) *Infectious disease of the dog and cat*. Ed.W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 226-241.
101. Greig A., Linklater K.A., Clark W.A. (1984). Persistent orf in a ram. *Veterinary Record*, 115: 149.
102. Greig A.S. (1957). Contagious Ectyma of sheep. In vitro cultivation of the virus. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 21: 304-308.
103. Guarda F. (1959). Contributo allo studio anatomo-isto-patologico dell'Ectima Contagioso di camosci e stambecchi. *Annali Facoltà di Medicina Veterinaria di Torino*, 9: 37-52.
104. Guibal F., Cosnes A., Wechsler J., Miseri E., Revuz J., Chosidow O. (1996). Religious ritual practices as a contamination mode for human Orf. *European Dermatology*, 6: 41-42.
105. Gumbrell R.C., McGregor D.A. (1997). Outbreak of severe fatal Orf in lambs. *Veterinary Record*, 141: 150-151
106. Gunduz K, Inanir I, Sacar T. Orf and religious practices. *J Dermatol*. 2005 Apr;32(4):306-8.

107. Guo J, Zhang Z, Edwards JF, Ermel RW, Taylor C Jr, de la Concha-Bermejillo A. Characterization of a North American orf virus isolated from a goat with persistent, proliferative dermatitis. *Virus Res.* 2003 Jun;93(2):169-79.
108. Gururangan S, Stevens RF, Morris DJ. Ribavirin response in measles pneumonia. *J Infect.* 1990 May;20(3):219-21
109. Haas L, Baron MD, Liess B, Barrett T. Editing of morbillivirus P gene transcripts in infected animals. *Vet Microbiol.* 1995 May;44(2-4):299-306.
110. Haig D.M., Mercer A.A. (1998). Orf. *Veterinary Research*, 29 :311-326.
111. Hall W.W., Imagawa D.T., Choppin P.W. (1979): "Immunological evidence for the synthesis of all canine distemper virus polypeptides in chronic neurological diseases in dogs. Chronic distemper and old dog encephalitis differ from SSPE in man". *Virology*, 98: 283- 287.
112. Hansen E., Nyfors A., Naess A., Sjursen H. (1984). Erythema multiforme major (Stevens-Johnson syndrome) caused by orf virus infection. *Tidsskr Nor Laegeforen*, 104 (14): 978-979.
113. Hara S, Kimura H, Hoshino Y, Hayashi N, Negoro T, Okumura A, Kajita Y, Sakuma T, Nakayama T, Hosoya M, Tomoda A, Morisima T. Combination therapy with intraventricular interferon-alpha and ribavirin for subacute sclerosing panencephalitis and monitoring measles virus RNA by quantitative PCR assay. *Brain Dev.* 2003 Aug;25(5):367-9.
114. Harder T.C., Osterhaus A.D. (1997): "Canine distemper virus, a Morbillivirus in search of new hosts?". *Trends Microbiology*, 5: 120-124.
115. Hayden FG. Antivirals for influenza: historical perspectives and lessons learned. *Antiviral Res.* 2006 Sep;71(2-3):372-8.
116. Hinman A. Eradication of vaccine-preventable diseases. *Annu Rev Public Health.* 1999;20:211-29.
117. Hodge MJ, Wolfson C. Canine distemper virus and multiple sclerosis. *Neurology.* 1997 Aug;49(2 Suppl 2):S62-9.
118. Honda Y, Hosoya M, Ishii T, Shigeta S, Suzuki H. Effect of ribavirin on subacute sclerosing panencephalitis virus infections in hamsters. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994 Apr;38(4):653-5.

119. Hooser S.B., Scherba G., Morin D.E., Whiteley H.E. (1989). Atypical contagious ecthyma in a sheep after extensive cutaneous thermal injury. *JAUMA*, 195 (9): 1255-1256.
120. Hosoya M, Mori S, Tomoda A, Mori K, Sawaishi Y, Kimura H, Shigeta S, Suzuki H. Pharmacokinetics and effects of ribavirin following intraventricular administration for treatment of subacute sclerosing panencephalitis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Dec;48(12):4631-5.
121. Hosoya M, Shigeta S, Mori S, Tomoda A, Shiraishi S, Miike T, Suzuki H. High-dose intravenous ribavirin therapy for subacute sclerosing panencephalitis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Mar;45(3):943-5.
122. Housawi F.M.T. e Abu Elzein E.M.E. (1991b). Orf infection following ear tagging in goats. *Revue d'Elevage et de Medecine Veterinaire des Pays Tropicaux*, 44 (3) : 277-278.
123. Housawi F.M.T. et al., (1992). Sero-surveillance for Orf antibodies in sheep and goats in Saudi Arabia employing the ELISA technique. *Journal of Comparative Pathology*, 106 (2): 153-158.
124. Housawi F.M.T. et al., (1993). A close comparative study on the response of sheep and goats to experimental orf infection. *Journal of Veterinary Medicine*, 40: 272-282.
125. Housawi F.M.T., Abu Elzein E.M.E., Amin M.M., Al Afaleq A. I. (1991a). Contagious pustular dermatitis (orf) infection in sheep and goats in Saudi Arabia. *Veterinary Record*, 128 (23): 550-551.
126. Housawi F.M.T., Roberts G.M., Gilray J.A., Pow I., Reid H.W., Nettleton P.F., Sumption K.J., Hibma M.H., Mercer A.A. (1998). The reactivity of monoclonal antibodies against orf virus with other parapoxviruses and the identification of a 39 kDa immunodominant protein. *Archives of Virology*, 143: 2289-2303.
127. Hunskaar, S., 1984. A case of ecthyma contagiosum (human orf) treated with idoxuridine. *Dermatologica*. 168 (4), 207.
128. Hunskaar S. (1986). Giant orf in a patient with chronic lymphatic leukaemia. *British Journal of Dermatology*, 114: 631-634.

129. Hussain K.A. e Burger D. (1989). In vivo and in vitro characteristics of contagious ecthyma virus isolates: host response mechanism. *Veterinary Microbiology*, 19 (1): 23-36.
130. Hussain RF, Nouri AM, Oliver RT (1993). A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. *J. Immunol. Methods*. 160(1), 89-96.
131. Iaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1957 Sep 12;147(927):258-67.
132. Inoshima Y., Morooka A., Sentsui H. (2000). Detection and diagnosis of parapoxvirus by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods.*, 84 (2): 201-8.
133. Ishii T, Hosoya M, Mori S, Shigeta S, Suzuki H. Effective ribavirin concentration in hamster brains for antiviral chemotherapy for subacute sclerosing panencephalitis. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996 Jan;40(1):241-3.
134. Jassim SA, Naji MA. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *J Appl Microbiol*. 2003;95(3):412-27.
135. Jones-Engel L, Engel GA, Schillaci MA, Lee B, Heidrich J, Chalise M, Kyes RC. Considering human-primate transmission of measles virus through the prism of risk analysis. *Am J Primatol*. 2006 Sep;68(9):868-79.
136. Jongh O., Cadore J.L. (1994): "La maladie de Carré dans l'espèce canine". *Le point vétérinaire*, 25 : 919-926.
137. Katz M., Koprowski H. (1973): "The significance of failure to isolate infectious viruses of subacute sclerosing panencephalitis". *Archiv fur die gesamte Virusforschung*, 41: 390-393.
138. Kaufman HE. THERAPEUTIC ANTIVIRAL ACTION OF 5-TRIFLUOROMETHYL-2'-DEOXYURIDINE IN HERPES SIMPLEX KERATITIS. *Science*. 1964 Aug 7;145:585-6.
139. Kende M, Alving CR, Rill WL, Swartz GM Jr, Canonico PG. Enhanced efficacy of liposome-encapsulated ribavirin against Rift Valley fever virus infection in mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 1985 Jun;27(6):903-7.
140. Kerdiles YM, Cherif B, Marie JC, Tremillon N, Blanquier B, Libeau G, Diallo A, Wild TF, Villiers MB, Horvat B. Immunomodulatory properties of morbillivirus nucleoproteins. *Viral Immunol*. 2006 Summer;19(2):324-34.

141. Kern ER, Hartline C, Harden E, Keith K, Rodriguez N, Beadle JR, Hostetler KY. Enhanced inhibition of orthopoxvirus replication in vitro by alkoxyalkyl esters of cidofovir and cyclic cidofovir. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 Apr;46(4):991-5.
142. Kimoto T. (1986): "In vitro and in vivo properties of the virus causing natural canine distemper encephalitis". *Journal of General Virology*, 67: 487-503.
143. Kolhapure RM, Deolankar RP, Tupe CD, Raut CG, Basu A, Dama BM, Pawar SD, Joshi MV, Padbidri VS, Goverdhan MK, Banerjee K. Investigation of buffalopox outbreaks in Maharashtra State during 1992-1996. *Indian J Med Res.* 1997 Nov;106:441-6.
144. Kummeneje K., Kosgrud J. (1979). Contagious Ectyema (Orf) in reinder (Rangifer tarandus). *Veterinary Record*, 105: 60-61.
145. Lalezari JP, Stagg RJ, Kuppermann BD, Holland GN, Kramer F, Ives DV, Youle M, Robinson MR, Drew WL, Jaffe HS. Intravenous cidofovir for peripheral cytomegalovirus retinitis in patients with AIDS. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med.* 1997 Feb 15;126(4):257-63.
146. Lambert DM, Barney S, Lambert AL, Guthrie K, Medinas R, Davis DE, Bucy T, Erickson J, Merutka G, Petteway SR Jr. Peptides from conserved regions of paramyxovirus fusion (F) proteins are potent inhibitors of viral fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Mar 5;93(5):2186-91
147. Leavel U.W., McNamara M.J., Muelling R., Talbert W.M., Rucker R.C., Dalton A.J. (1968). Orf: report of 19 human cases with clinical and pathological observations. *Journal of American Medical Association*, 204(8).
148. Lewis C. (1996). Update on Orf. *In Practice*, 9: 376-381.
149. Lewis-Jones S. Zoonotic poxvirus infections in humans. *Curr Opin Infect Dis.* 2004 Apr;17(2):81-9.
150. Leyssen P, Balzarini J, De Clercq E, Neyts J. The predominant mechanism by which ribavirin exerts its antiviral activity in vitro against flaviviruses and paramyxoviruses is mediated by inhibition of IMP dehydrogenase. *J Virol.* 2005 Feb;79(3):1943-7.
151. Lisiak J.A., Vandeveld M. (1979): "Poliencephalomalacia associated with canine distemper virus infection". *Veterinary Pathology*, 16: 650-660.

152. Maag D, Castro C, Hong Z, Cameron CE. Hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) as a mediator of the antiviral activity of ribavirin. *J Biol Chem.* 2001 Dec 7;276(49):46094-8.
153. Magee WC, Hostetler KY, Evans DH. Mechanism of inhibition of vaccinia virus DNA polymerase by cidofovir diphosphate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Aug;49(8):3153-62.
154. Maggs DJ, Clarke HE. In vitro efficacy of ganciclovir, cidofovir, penciclovir, foscarnet, idoxuridine, and acyclovir against feline herpesvirus type-1. *Am J Vet Res.* 2004 Apr;65(4):399-403.
155. Mazur C., Machado R.D. (1989). Detection of contagious pustular dermatitis of goats in a severe outbreak. *Veterinary Record*, 125: 419-420.
156. Mckeever D.J., Reid H.W. (1986). Survival of orf virus under British winter conditions. *Veterinary Record*, 118: 613-614.
157. Mckeever D.J., Reid H.W., McEwan Jenkinson D., Hutchinson G. (1988). Studies of pathogenesis of Orf virus infection in sheep. *Journal of Comparative Pathology*, 99: 317-328.
158. Meadows DC, Gervay-Hague J. Current developments in HIV chemotherapy. *ChemMedChem.* 2006 Jan;1(1):16-29.
159. Mercer A.A., Fleming S.B., Robinson A.J., Nettleton P.F., Reid H.W. (1997b). Molecular genetic analysis of parapoxviruses pathogenics for humans. *Archives of Virology*, 13: 25-34.
160. Mercer A.A., Lyttle D.J., Whelan E.M., Fleming S.B., Sullivan T.J. (1995). The establishment of a genetic map of orf virus reveals a pattern of genomic organization that is highly conserved among divergent poxviruses. *Virology*, 212: 698-704.
161. Mercer A.A., Yirrel D.L., Reid H.W., Robinson A.J. (1994). Lack of cross-protection between vaccinia virus and orf virus in hysterectomy-procured, barrier-maintained lambs. *Veterinary Microbiology*, 41: 373-382.
162. Mercer A.A., Yirrel D.L., Whelan E.M., Nettleton P.F., Gilray J.A., Nettleton P.F., Robinson A.J. (1997a). A novel strategy for determining protective antigens of the parapoxvirus, orf virus. *Virology*, 229(1): 193-200.

163. Mochizuki H., Mirchiuru H., Yoshio Y. (1999): "Genotypes of canine distemper virus determined by analysis of the H genes of recent isolates from dogs in Japan". *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 2936-2942.
164. Moritz A., Frisk A.L., Baumgartner W. (2000): "The evaluation of diagnostic procedures from the detection of canine distemper virus infection". *European Journal of Companion Animal Practice*, 10: 37-47.
165. Moss B. (1996). Poxviridae: The viruses and their replication. In: Field B.N., Knipe P.M., et al. (Eds.) *Fundamental Virology*, Lippercott-Raven Publishers, Philadelphia, 1163-1197.
166. Mourtada J., Le Journeur M., Chevrant-Breton J., Le Gall F. (2000). Orf et érythème polymorphe. *Ann. Dermatol. Venereol.*, 127: 397-399.
167. Muller C.F., Fatzer R.S., Beck K., Vandevelde M., Zurbriggen A. (1995): "Studies on canine distemper virus persistence in the central nervous system". *Acta Neuropathologica*, 89: 435-438.
168. Murphy F.A., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Ghabrial S.A., Jarvis A.W., Martelli G.P., Mayo M.A., Summers M.D. (1995): "Virus Taxonomy. Classification and nomenclature of viruses". Ed. Springer-Verlag, Wien New York.
169. Murphy J.K., Ralfs I.G. (1996). Bullous pemphigoid complicating human orf. *British Journal of Dermatology*, 134: 929-930.
170. Mutinelli F., Vandevelde M., Griot C., Richard A. (1988): "Astrocytosis infection in canine distemper virus induced demyelination". *Acta Neuropathologica*, 77: 333-335.
171. Nagasse-Sugahara TK, Kisielius JJ, Ueda-Ito M, Curti SP, Figueiredo CA, Cruz AS, Silva MM, Ramos CH, Silva MC, Sakurai T, Salles-Gomes LF. Human vaccinia-like virus outbreaks in Sao Paulo and Goias States, Brazil: virus detection, isolation and identification. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2004 Nov-Dec;46(6):315-22.
172. Nasisse MP, Dorman DC, Jamison KC, Weigler BJ, Hawkins EC, Stevens JB. Effects of valacyclovir in cats infected with feline herpesvirus 1. *Am J Vet Res*. 1997 Oct;58(10):1141-4.
173. Nasisse MP, Guy JS, Davidson MG, Sussman WA, Fairley NM. Experimental ocular herpesvirus infection in the cat. Sites of virus replication, clinical features and

- effects of corticosteroid administration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1989 Aug;30(8):1758-68.
174. Nesseler A., Baumgartner W., Gaedke K. (1997): "Abundant expression of viral nucleoprotein mRNA and restricted translation of the corresponding viral protein in inclusion body poliomyelitis of canine distemper". *Journal of Comparative Pathology*, 116: 291-301.
 175. Nettleton P.F., Brabner J., Pow I., Gilray J.A., Bell G.D., Reid H.W. (1996). Tissue culture-propagated orf virus vaccine protects lambs from orf virus challenge. *Veterinary Records*, 138: 184-185.
 176. Nettleton P.F., Gilray J.A., Reid H.W., Mercer A.A. (2000). Parapoxvirus are strongly inhibited in vitro by cidofovir. *Antiviral Research*, 48 : 205-208.
 177. Neyts J, De Clercq E. Efficacy of (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine for the treatment of lethal vaccinia virus infections in severe combined immune deficiency (SCID) mice. *J Med Virol.* 1993 Nov;41(3):242-6.
 178. Neyts J, Leyssen P, Verbeken E, De Clercq E. Efficacy of cidofovir in a murine model of disseminated progressive vaccinia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Jun;48(6):2267-73.
 179. Nikkels AF, Pierard GE. Oral antivirals revisited in the treatment of herpes zoster: what do they accomplish? *Am J Clin Dermatol.* 2002;3(9):591-8.
 180. Nitsche A, Buttner M, Wilhelm S, Pauli G, Meyer H. Real-time PCR detection of parapoxvirus DNA. *Clin Chem.* 2006 Feb;52(2):316-9.
 181. Otaki M, Sada K, Kadoya H, Nagano-Fujii M, Hotta H. Inhibition of measles virus and subacute sclerosing panencephalitis virus by RNA interference. *Antiviral Res.* 2006 Jul;70(3):105-11. Epub 2006 Feb 13.
 182. Patterson JL, Fernandez-Larsson R. Molecular mechanisms of action of ribavirin. *Rev Infect Dis.* 1990 Nov-Dec;12(6):1139-46.
 183. Pether J.V.S., Guerrier C.J.W., Jones S. M., Adam A.E., Kingsbury W.N. (1986). *British Journal of Dermatology*, 115: 497-499.
 184. Plattet P, Rivals JP, Zuber B, Brunner JM, Zurbriggen A, Wittek R. The fusion protein of wild-type canine distemper virus is a major determinant of persistent infection. *Virology.* 2005 Jul 5;337(2):312-26.

185. Plemper RK, Doyle J, Sun A, Prussia A, Cheng LT, Rota PA, Liotta DC, Snyder JP, Compans RW. Design of a small-molecule entry inhibitor with activity against primary measles virus strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Sep;49(9):3755-61.
186. Plowright W., Whitcomb M.A., Ferris R.D. (1959). Studies with a strain of contagious pustular dermatitis virus in tissue culture. *Archiv. Fuer. Die Gesamte Virusforsch*, 9: 214-231.
187. Plumet S, Duprex WP, Gerlier D. Dynamics of viral RNA synthesis during measles virus infection. *J Virol.* 2005 Jun;79(11):6900-8.
188. Prokai L, Prokai-Tatrai K, Bodor N. Targeting drugs to the brain by redox chemical delivery systems. *Med Res Rev.* 2000 Sep;20(5):367-416.
189. Prusoff WH. Synthesis and biological activities of iododeoxyuridine, an analog of thymidine. *Biochim Biophys Acta.* 1959 Mar;32(1):295-6.
190. Quenelle DC, Collins DJ, Wan WB, Beadle JR, Hostetler KY, Kern ER. Oral treatment of cowpox and vaccinia virus infections in mice with ether lipid esters of cidofovir. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Feb;48(2):404-12. Erratum in: *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 May;48(5):1919.
191. Raw B.K., Pearson G.R., Brown P.J., Baumgartner W. (1992): "Canine distemper infection associated with acute nervous signs in dogs". *The Veterinary Record*, 130: 291-293.
192. Rees J, Marks JM. Two unusual cases of orf following trauma to the scalp. *Br J Dermatol.* 1988 Mar;118(3):445-7.
193. Reeves PM, Bommarius B, Lebeis S, McNulty S, Christensen J, Swimm A, Chahroudi A, Chavan R, Feinberg MB, Veach D, Bornmann W, Sherman M, Kalman D. Disabling poxvirus pathogenesis by inhibition of Abl-family tyrosine kinases. *Nat Med.* 2005 Jul;11(7):731-9.
194. Reid H.W. (1994). The changing face of Orf. *Proceedings of the sheep veterinary society*, 18: 173-174.
195. Reuter T, Weissbrich B, Schneider-Schaulies S, Schneider-Schaulies J. RNA interference with measles virus N, P, and L mRNAs efficiently prevents and with matrix protein mRNA enhances viral transcription. *J Virol.* 2006 Jun;80(12):5951-7

196. Rima BK, Duprex WP. Morbilliviruses and human disease. *J Pathol.* 2006 Jan;208(2):199-214.
197. Robinson A.J., Balassau T.T. (1981). Contagious pustular dermatitis (Orf). *Veterinary Bulletin*, 51: 771-781.
198. Roy CJ, Baker R, Washburn K, Bray M. Aerosolized cidofovir is retained in the respiratory tract and protects mice against intranasal cowpox virus challenge. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Sep;47(9):2933-7.
199. Sandmeyer LS, Keller CB, Bienzle D. Effects of cidofovir on cell death and replication of feline herpesvirus-1 in cultured feline corneal epithelial cells. *Am J Vet Res.* 2005 Feb;66(2):217-22.
200. Savage J., Black M.M. (1972). "Giant" Orf of finger in a patient with a lymphoma. *Proc. roy. soc. Med.*,65: 28-30.
201. Savory L.J., Stacker S.A., Fleming S.B., Niven B.E., Mercer A.A. (2000). Viral vascular endothelial growth factor plays a critical role in Orf virus infection. *Journal of virology*, 74 (22): 10699-10706.
202. Scagliarini A, Dal Pozzo F, Gallina L, Guercio A, De Clercq E, Snoeck R, Andrei G. Ovine skin organotypic cultures applied to the ex vivo study of orf virus infection. *Vet Res Commun.* 2005 Aug;29 Suppl 2:245-7.
203. Scagliarini A, Dal Pozzo F, Gallina L, Guercio A, Vaccari F, Battilani M, Ciulli S, Prospero S. In vitro activity of VEGF-E produced by orf virus strains isolated from classical and severe persistent contagious ecthyma. *Vet Microbiol.* 2006 Apr 16;114(1-2):142-7.
204. Scagliarini A. (2002). Ectima contagioso. Studio del genoma e nuove strategie di prevenzione. *SUMMA*, 6: 5-7.
205. Scagliarini A., Peli A., Franchi A. (2001). Infezione da Orf virus nell'uomo: revisione della letteratura. *Esperienze dermatologiche*, 3: 431-436.
206. Shell L.G. (1990): "Canine Distemper". *Compendium of Small Animal*, 12: 173-179.
207. Shidu M.S., Husar W., Cook S.D., Dowling P.C., Qdem S.A. (1993): "Canine distemper terminal and intergenic non protein coding nucleotide sequences: completion of the entire CDV gene sequence". *Virology*, 193: 66-72.

208. Shigeta S, Mori S, Baba M, Ito M, Honzumi K, Nakamura K, Oshitani H, Numazaki Y, Matsuda A, Obara T, et al. Antiviral activities of ribavirin, 5-ethynyl-1-beta-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide, and 6'-(R)-6'-C-methylneplanocin A against several ortho- and paramyxoviruses. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992 Feb;36(2):435-9.
209. Siebeck N, Hurley DJ, Garcia M, Greene CE, Kostlin RG, Moore PA, Dietrich UM. Effects of human recombinant alpha-2b interferon and feline recombinant omega interferon on in vitro replication of feline herpesvirus-1. *Am J Vet Res.* 2006 Aug;67(8):1406-11.
210. Smee DF, Bailey KW, Sidwell RW. Treatment of lethal vaccinia virus respiratory infections in mice with cidofovir. *Antivir Chem Chemother.* 2001 Jan;12(1):71-6.
211. Smee DF, Bray M, Huggins JW. Antiviral activity and mode of action studies of ribavirin and mycophenolic acid against orthopoxviruses in vitro. *Antivir Chem Chemother.* 2001 Nov;12(6):327-35.
212. Smee DF, Sidwell RW. A review of compounds exhibiting anti-orthopoxvirus activity in animal models. *Antiviral Res.* 2003 Jan;57(1-2):41-52.
213. Smith G.W., Scherba G., Constable P.D., Hsiao V., Behr M.J., Morin D.E. (2002). Atypical Parapoxvirus infection in sheep. *Journal of Vet. Internal Medicine*, 16: 287-292.
214. Snoeck R, Andrei G, De Clercq E. Cidofovir in the treatment of HPV-associated lesions. *Verh K Acad Geneesk Belg.* 2001;63(2):93-120, discussion 120-2.
215. Snoeck R, Andrei G, Gerard M, Silverman A, Hedderman A, Balzarini J, Sadzot-Delvaux C, Tricot G, Clumeck N, De Clercq E. Successful treatment of progressive mucocutaneous infection due to acyclovir- and foscarnet-resistant herpes simplex virus with (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine (HPMPC). *Clin Infect Dis.* 1994 Apr;18(4):570-8.
216. Spitzenberger TJ, Heilman D, Diekmann C, Batrakova EV, Kabanov AV, Gendelman HE, Elmquist WF, Persidsky Y. Novel delivery system enhances efficacy of antiretroviral therapy in animal model for HIV-1 encephalitis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006 Oct 25

217. Stettler M., Zurbriggen A. (1995): "Nucleotide and deduced amino acid sequences of the nucleocapsid protein of the virulent A75/17-CDV strain of canine distemper virus". *Veterinary Microbiology*, 44: 211-217.
218. Stich A, Meyer H, Kohler B, Fleischer K. Tanapox: first report in a European traveller and identification by PCR. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002 Mar-Apr;96(2):178-9.
219. Streeter DG, Miller JP, Robins RK, Simon LN. The enzymic conversion of 1,2,4-triazole-3-carboxamide to ribavirin-5'-phosphate and its relationship to the proposed mechanism of action. *Ann N Y Acad Sci.* 1977 Mar 4;284:201-10.
220. Summers B.A., Appel M.J.G. (1985): "Syncytia formation: an aid in the diagnosis of canine distemper encephalomyelitis". *Journal of Comparative Pathology*, 95: 425-435.
221. Summers B.A., Cummings J.S., de Lahunta A. (1995): *Veterinary Neuropathology*. Ed Mosby, St Louis, USA, pp. 54-85.
222. Summers B.A., Greisen H.A., Appel M.J.G. (1979): "Early events in canine distemper demyelinating encephalomyelitis". *Acta neuropathologica*, 46: 1-10.
223. Tabarrini O, Manfroni G, Fravolini A, Cecchetti V, Sabatini S, De Clercq E, Rozenski J, Canard B, Dutartre H, Paeshuyse J, Neyts J. Synthesis and anti-BVDV activity of acridones as new potential antiviral agents. *J Med Chem.* 2006 Apr 20;49(8):2621-7.
224. Tan S.T., Black G.B., Chambers S. (1991). Recurrent orf in an immunocompromised host. *British Journal of plastic surgery*, 44: 465-467.
225. Ter Meulen V., Martin S.J. (1976): "Genesis and maintenance of a persistent infection by canine distemper virus". *Journal of General Virology*, 32: 431-440.
226. Tipold A., Vandeveld M., Jaggy A. (1992): "Neurological manifestation of canine distemper virus infection". *Journal of Small Animal Practice*, 33: 466-470.
227. Tobler L.H., Imagawa D.T. (1984): "Mechanism of persistence with canine distemper: differences between a laboratory strain and an isolate from a dog with chronic neurologic disease". *Intervirology*, 21: 77-86.
228. Tomoda A, Nomura K, Shiraishi S, Hamada A, Ohmura T, Hosoya M, Miike T, Sawaishi Y, Kimura H, Takashima H, Tohda Y, Mori K, Kato Z, Fukushima A,

- Nishio H, Nezu A, Nihei K. Trial of intraventricular ribavirin therapy for subacute sclerosing panencephalitis in Japan. *Brain Dev.* 2003 Oct;25(7):514-7.
229. Tomoda A, Shiraishi S, Hosoya M, Hamada A, Miike T. Combined treatment with interferon-alpha and ribavirin for subacute sclerosing panencephalitis. *Pediatr Neurol.* 2001 Jan;24(1):54-9.
230. Tsai S.C., Summers B.A., Appel M.G.C. (1982): "Interferon in cerebrospinal fluid, a marker for viral persistence in CDV encephalomyelitis". *Archives of virology*, 72: 257-265.
231. Uckun FM, Chen CL, Samuel P, Pendergrass S, Venkatachalam TK, Waurzyniak B, Qazi S. In vivo antiretroviral activity of stampidine in chronically feline immunodeficiency virus-infected cats. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Apr;47(4):1233-40.
232. Uzel M, Sasmaz S, Bakaris S, Cetinus E, Bilgic E, Karaoguz A, Ozkul A, Arican O. A viral infection of the hand commonly seen after the feast of sacrifice: human orf (orf of the hand). *Epidemiol Infect.* 2005 Aug;133(4):653-7.
233. Uzel M, Sasmaz S, Ozkul A, Cetinus E, Bilgic E, Karaoguz A. Swan-neck deformity and paresthesia following giant orf. *J Dermatol.* 2004 Feb;31(2):116-8.
234. van der Meulen K, Garre B, Croubels S, Nauwynck H. In vitro comparison of antiviral drugs against feline herpesvirus 1. *BMC Vet Res.* 2006 Apr 26;2:13.
235. van Rij RP, Andino R. The silent treatment: RNAi as a defense against virus infection in mammals. *Trends Biotechnol.* 2006 Apr;24(4):186-93.
236. Vandeveld M, Zurbriggen A. Demyelination in canine distemper virus infection: a review. *Acta Neuropathol (Berl).* 2005 Jan;109(1):56-68.
237. Vandeveld M., Kristensen F., Kristensen B., Steck A.J., Kihim U. (1982): "Immunological and pathological findings in demyelinating encephalitis associated with canine distemper virus infection". *Acta Neuropathologica*, 56: 1-8.
238. Vandeveld M., Zurbriggen A. (1995): "The neurobiology of canine distemper virus infection". *Veterinary Microbiology*, 44: 271-280.
239. Vandeveld M., Zurbriggen A., Higgins R.J., Palmer D. (1985): "Spread and distribution of viral antigen in nervous canine distemper". *Acta Neuropathologica*, 67: 211-218.

240. Vandeveld M., Zurbriggen A., Steck A. (1986): "Studies on the intrathecal humoral immune response in canine distemper encephalitis". *Journal of Neuroimmunology*, 11: 41-51.
241. Vogel JU, Scholz M, Cinatl J Jr. Treatment of cytomegalovirus diseases. *Intervirology*. 1997;40(5-6):357-67.
242. von Messling V, Svitek N, Cattaneo R. Receptor (SLAM [CD150]) recognition and the V protein sustain swift lymphocyte-based invasion of mucosal tissue and lymphatic organs by a morbillivirus. *J Virol*. 2006 Jun;80(12):6084-92.
243. Weiss RC. Synergistic antiviral activities of acyclovir and recombinant human leukocyte (alpha) interferon on feline herpesvirus replication. *Am J Vet Res*. 1989 Oct;50(10):1672-7.
244. Wilkinson J.D. (1977). Orf: a family with unusual complications. *British Journal of Dermatology*, 97: 447.
245. Williams DL, Robinson JC, Lay E, Field H. Efficacy of topical aciclovir for the treatment of feline herpetic keratitis: results of a prospective clinical trial and data from in vitro investigations. *Vet Rec*. 2005 Aug 27;157(9):254-7.
246. Wittek R., Kuenzle C.C., Wyler R. (1979). High G+C content in parapoxvirus DNA. *Journal of General Virology*, 43: 231-234.
247. Wright PJ, Crameri G, Eaton BT. RNA synthesis during infection by Hendra virus: an examination by quantitative real-time PCR of RNA accumulation, the effect of ribavirin and the attenuation of transcription. *Arch Virol*. 2005 Mar;150(3):521-32. Epub 2004 Oct 29.
248. Wutzler P. Antiviral therapy of herpes simplex and varicella-zoster virus infections. *Intervirology*. 1997;40(5-6):343-56.
249. Wyde PR, Moore-Poveda DK, De Clercq E, Neyts J, Matsuda A, Minakawa N, Guzman E, Gilbert BE. Use of cotton rats to evaluate the efficacy of antivirals in treatment of measles virus infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 May;44(5):1146-52.
250. Yang H, Kim SK, Kim M, Reche PA, Morehead TJ, Damon IK, Welsh RM, Reinherz EL. Antiviral chemotherapy facilitates control of poxvirus infections through inhibition of cellular signal transduction. *J Clin Invest*. 2005 Feb;115(2):379-87.

251. Yeruham I., Nyska A., Abraham A. (1994). Parapox infection in a gazelle kid. (*Gazella gazella*). *Journal of wildlife disease*, 30: 260-262.
252. Zamri-Saad M., Karim S.A., Al-Ajeeli., Ibrahim A.L. (1992). A severe outbreak of orf involving the buccal cavity of goats. *Tropical Animal Health Production*, 24: 177-178.
253. Zanin E., Bolognani G., Farina G., Fraquelli G., Moresco A. (1997). Segnalazione di un caso di Ectima contagioso nel muflone (*ovis musimon*, Pallas, 1811) in provincia di Trento. *Atti V Congresso Fe.Me.S.P.Rum. Ozzano Emilia (Bo)5-6 settembre 1997*, 455-459.
254. Zhang Y, Jamaluddin M, Wang S, Tian B, Garofalo RP, Casola A, Brasier AR. Ribavirin treatment up-regulates antiviral gene expression via the interferon-stimulated response element in respiratory syncytial virus-infected epithelial cells. *J Virol*. 2003 May;77(10):5933-47.
255. Zurbriggen A., Graber H.U., Vandeveld M: (1995): "Selective spread and reduced virus release leads to canine distemper virus persistence in the nervous system". *Veterinary Microbiology*, 44: 281-288.
256. Zurbriggen A., Muller C., Vandeveld M. (1993): "In situ hybridisation of virulent canine distemper virus in brain tissue, using digoxigenin-labelled probes". *American Journal of Veterinary Research*, 54: 1457- 1461.
257. Zurbriggen A., Schmid I., Graber H.U., Vandeveld M. (1998): "Oligodendroglial pathology in canine distemper". *Acta Neuropathologica*, 95: 71-77.
258. Zurbriggen A., Vandeveld M. (1994): "The pathogenesis of nervous distemper". *Progress in Veterinary Neurology*, 5: 109-116.
259. Zurbriggen A., Vandeveld M., Dumas M. (1986): "Secondary degeneration of oligodendrocytes in canine distemper virus infection in vitro". *Laboratory Investigation*, 54: 424-431.
260. Zurbriggen A., Yamawaki M., Vandeveld M. (1993): "Restricted canine distemper virus infection of oligodendrocytes". *Laboratory Investigation*, 68: 277-284.