

Valutazione *in vitro* dell'efficacia di alcuni disinfettanti nei confronti del calicivirus felino

RIASSUNTO

Introduzione e scopo del lavoro - Nonostante il controllo dell'infezione sostenuta da FCV venga largamente demandato alle vaccinazioni, non sempre quest'ultime risultano efficaci nei confronti dei ceppi a maggiore virulenza. Ne consegue quindi la necessità di affiancare agli interventi di profilassi immunizzante adeguate misure di profilassi diretta basate soprattutto sulla corretta detersione e disinfezione degli ambienti con elevata densità di animali. Obiettivo del presente lavoro è stato quello di valutare l'azione *in vitro* di alcuni disinfettanti nei confronti di otto ceppi FCV.

Materiali e metodi - Le indagini sono state eseguite su due ceppi vaccinali e su sei isolati di FCV associati a diversi quadri clinici. Per gli esperimenti di inattivazione sono stati utilizzati etanolo 70%, isopropanolo 70%, la miscela etanolo 70% + isopropanolo 30% ed infine la cloramina alla concentrazione di 250 µg/ml.

Risultati - I risultati ottenuti hanno dimostrato che tutti i disinfettanti sono stati in grado di determinare una generale diminuzione del titolo virale dei ceppi oggetto dello studio. Tuttavia, la cloramina ha mostrato una maggiore efficacia rispetto agli altri disinfettanti già dopo 3 minuti di esposizione.

Discussione - In conclusione, sulla base dei nostri risultati, la cloramina potrebbe rappresentare il disinfettante ideale per limitare la trasmissione di FCV poiché si è dimostrata efficace non solo nei confronti dei ceppi FCV vaccinali, ma anche nei confronti dei ceppi di campo associati a quadri clinici eterogenei.

INTRODUZIONE

Il calicivirus felino (FCV), appartenente alla famiglia *Caliciviridae* genere *Vesivirus*, è un piccolo virus sprovvisto di *envelope* del diametro approssimativo di 35-38 nm. Il genoma costituito da una singola molecola di RNA monocatenario a polarità positiva e di lunghezza approssimativa di 7,7 kb, è organizzato in tre *open reading frames* (ORFs): ORF1 che codifica per le proteine non strutturali del virione¹; il gene ORF2 che codifica per la principale proteina capsidica VP1 del peso molecolare di 60 kDa^{2,3} ed infine ORF3 localizzato all'estremità 3' dell'RNA genomico che codifica per una piccola proteina strutturale (12,2 kDa), denominata VP2, probabilmente coinvolta nei processi di replicazione del virus e nell'assemblaggio delle particelle infettanti⁴. FCV rappresenta uno dei patogeni più comunemente associati al complesso delle infezioni delle prime vie respiratorie (U.R.T.D.: Upper Respiratory Tract Disease) del gatto⁵; tuttavia, nel corso degli ultimi anni, ceppi altamente virulenti sono stati associati anche a sindromi sistemiche (VSD-FCV: Virulent Systemic Disease-FCV)⁶ caratterizzate da infiammazione diffusa, coagulazione intravasale disseminata, necrosi pancreatica e splenica, spesso ad esito fatale (la letalità può raggiungere percentuali del 67%)⁷, nonché a forme articolari (*limping syndrome*)^{8,9}, dermatiti ed aborto¹⁰.

Nonostante il controllo dell'infezione sostenuta da FCV venga largamente demandato alle vaccinazioni, non sempre quest'ultime risultano efficaci nei confronti dei ceppi a maggiore virulenza⁶. Ne consegue quindi la necessità di affiancare agli interventi di profilassi immunizzante adeguate misure di profilassi diretta basate soprattutto sulla corretta detersione e disinfezione degli ambienti con elevata densità di animali.

L'efficacia della disinfezione dipende da numerosi fattori e tra questi non vanno sottovalutati il tipo di microrganismo e il tempo di azione del disinfettante. Nel caso di FCV la corretta scelta di un disinfettante diventa ancora più complessa a causa dell'elevata variabilità genotipica e fenotipica che lo caratterizza. In proposito, studi recenti^{11, 12} hanno dimostrato che la maggior parte dei ceppi associati a quadri clinici "atipici", presentano caratteristiche di crescita, resistenza e stabilità termiche diverse dai ceppi responsabili della più comune sintomatologia respiratoria.

La diversa resistenza di FCV dovrebbe essere presa in considerazione per la scelta delle appropriate misure di disinfezione finalizzate a limitare la trasmissione del virus.

Quindi, obiettivo del presente lavoro è stato quello di valutare *in vitro* l'azione di alcuni disinfettanti di comune impiego, a base di alcool e di cloro, nei confronti di due ceppi vaccinali di FCV e di sei ceppi di campo associati a quadri clinici eterogenei, isolati rispettivamente da cinque gatti e da un cucciolo di cane.

Barbara Di Martino, Chiara Ceci,
Federica Di Profio, Roberto Varano,
Fulvio Marsilio

Dipartimento di Scienze Biomediche Comparete,
Università degli Studi di Teramo

"Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 04/09/2009 ed accettato per la pubblicazione dopo revisione il 26/02/2010".

MATERIALI E METODI

a) Cellule e ceppi virali

Per la coltivazione di FCV sono stati utilizzati monostrati di cellule in linea continua di rene di gatto Crandell Feline Kidney (CrFK), sviluppate in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM) addizionato di L-glutamina, 1% di antibiotico e arricchito con il 10% di siero fetale bovino. Sono stati analizzati un totale di otto ceppi FCV di cui n° 2 ceppi vaccinali rappresentati da FCV-F9 e FCV-2280 e n° 6 ceppi di campo (Tab. 1): in particolare, gli isolati FCV-10/Te/07 e FCV-306 associati ad enterite rispettivamente nel cane¹³ e nel gatto; il ceppo FCV-F6/08 isolato da un gatto con sintomatologia riferibile a sindrome emorragica sistemica, FCV G/2000 isolato da adenoma labiale in un gatto adulto; ed infine n° 2 ceppi (FCV-F24, FCV-F31)⁵ isolati da gattini che presentavano la tipica sintomatologia respiratoria e stomatite ulcerativa. Al fine di ottenere virus parzialmente purificati, tutti i ceppi FCV in esame sono stati amplificati su monostrati di cellule CrFK di 24 h in flask da 75 cm² impiegando un indice di molteplicità di 0,1 unità formanti placche/cell. A 24-36 h post-infezione, il surnatante infetto è stato raccolto e centrifugato a 8000 rpm per 15' al fine di allontanare i detriti cellulari. Il surnatante è stato quindi stratificato su cuscino di saccarosio al 17% e centrifugato a 24000 rpm per 2 h nel rotore Bekman SW28. Il pellet ottenuto è stato parzialmente purificato su gradiente discontinuo di saccarosio (60-40-30-20%) e centrifugato nuovamente a 24000 rpm per 2 h nel rotore Bekman SW28¹⁴. Le prime frazioni contenenti il virus sono state sottoposte a nuova centrifugazione a 27000 rpm per 3 h nel rotore SW41Ti ed il pellet ottenuto è stato diluito in 5 ml di D-MEM, aliquotato (0,5 ml) e quindi stoccato a - 80°C.

b) Prove di disinfezione e titolazione virale

Gli esperimenti di disinfezione sono stati eseguiti impiegando etanolo 70%, isopropanolo 70%, una miscela costituita da etanolo 70% + isopropanolo 30% ed

infine cloramina (Euclorina, 2,5 g polvere solubile, Bracco) ad una concentrazione finale di 250 µg/ml. A tale scopo, quantità note di sospensioni virali (30 µl) sono state diluite in etanolo 99% o isopropanolo 99% (Sigma-Aldrich, Italy) (vol/vol) al fine di ottenere una miscela di 100 µl ad una concentrazione finale del 70% (vol/vol). Per gli esperimenti con etanolo + isopropanolo, 30 µl di sospensione virale sono stati messi a contatto con 100 µl di miscela etanolo 70% + isopropanolo 30% (vol/vol). Infine, relativamente alle prove con la cloramina, 30 µl di sospensione virale sono state messe a contatto con 100 µl di cloramina precedentemente diluita in acqua distillata ad una concentrazione di 250 µg/ml (Euclorina, 2,5 g polvere solubile, Bracco). Per ogni esperimento è stato inserito un controllo negativo rappresentato da una miscela costituita da sospensioni virali messe a contatto con PBS, in volumi identici a quelli usati per ciascun disinfettante. Le miscele virus-disinfettante o virus-PBS sono state quindi lasciate a temperatura ambiente per 1, 3 e 10 min. All'immediata scadenza dei tempi di esposizione, ogni ceppo FCV è stato titolato mediante il metodo della diluizione limite utilizzando piastre a 96 pozzetti: a diluzioni seriali in base 10 costituite dalla miscela virus-disinfettante e D-MEM è seguita l'aggiunta di 20000 cellule CrFK. Le piastre sono state quindi poste in incubatore a 37°C e al 5% di CO₂ per 48 ore e quindi sottoposte a lettura. Il calcolo della Dose Infettante 50 (DI50) è stato eseguito impiegando la metodica di Karber.

Gli esperimenti di disinfezione sono stati preceduti da prove di tossicità cellulare. A tal fine, per ogni disinfettante sono state eseguite in D-MEM diluzioni seriali in base 10 in piastre a 96 pozzetti e messe a contatto con 20000 cellule CrFK. Le piastre sono state quindi poste in incubatore a 37°C e al 5% di CO₂ per 48 ore. Al termine dei due giorni le piastre sono state sottoposte a lettura per valutare se i monostrati cellulari avessero subito alterazioni conseguenti a sofferenza cellulare o lisi tossica.

c) Retrotrascrizione (RT)-PCR e Real-time - PCR

Per ciascun ceppo FCV esposto all'azione della cloramina è stata valutata la variazione del numero delle copie di c-DNA virale mediante Real-time PCR. A tal fine, dopo esposizione al disinfettante per 1, 3 e 10 min (come descritto nel paragrafo b), ogni ceppo virale è stato dapprima sottoposto ad estrazione dell'RNA impiegando il kit Rnasy mini (Qiagen, GmbH, Germania) e quindi ad amplificazione mediante una procedura standard di one-step RT-PCR (SuperScript One-Step, Invitrogen, Ltd, Paisley, UK) di un frammento di 924 bp del gene ORF2 ottenuto con la coppia di primer esterni Cali1/Cali2¹⁵.

L'analisi in Real-time PCR è stata condotta mediante ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) e tutte le reazioni sono sta-

TABELLA 1
Ceppi FCV impiegati negli esperimenti di disinfezione

Ceppo FCV	Descrizione
FCV-F9	Ceppo vaccinale: impiegato nell'allestimento del vaccino attenuato
FCV-2280	Ceppo vaccinale: impiegato nell'allestimento del vaccino spento
FCV-10/Te/07	Isolato da un cucciolo di cane con enterite ¹³
FCV-306	Isolato da un gatto con enterite
FCV-F6/08	Isolato da un gatto con sindrome emorragica sistemica
FCV-G/2000	Isolato da un gatto con adenoma labiale
FCV-F31	Associato a U.R.T.D. ¹⁵
FCV-F24	Associato a U.R.T.D. ¹⁵

te allestite in un volume totale di 25 µl contenente 5 µl del primo prodotto di PCR (diluito 1:100 e 1:1000), la coppia di primer interni Cali int1/Cali int 2¹⁵ e la Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Ltd, Paisley, UK). Il numero di copie di c-DNA virale contenuto in ciascun campione in esame è stato quantificato mediante una curva di calibrazione esterna allestita utilizzando diluizioni logaritmiche (a partire da 10⁵ fino a 10⁰ copie di DNA/5 µl di templat) di un DNA plasmidico rappresentato dal vettore pCR2.1 (Invitrogen, Ltd, Paisley, UK) contenente il gene bersaglio.

RISULTATI

Nelle Tabelle 2 e 3, sono riportati i risultati ottenuti mediante titolazione virale, relativi alla valutazione dell'efficacia dei diversi disinfettanti nei confronti di FCV.

In particolare, per quanto riguarda le prove di disinfezione con etanolo 70%, n° 4 ceppi (FCV-F24; FCV-

G/2000; FCV-F6/08; FCV-F31) è stata evidenziata la completa inattivazione (100%) già dopo 1 min di esposizione; mentre i ceppi FCV-10/Te/07 e FCV-F9 sono stati inattivati al 100% dopo 3 e 10 min di esposizione. L'etanolo 70% anche dopo 10 min è risultato parzialmente inefficace nei confronti dei ceppi FCV-306 e FCV-2280 i quali hanno mostrato una percentuale di inattivazione rispettivamente del 63,0% (3 log₁₀) e del 50,0% (3,25 log₁₀) (Tab. 2).

Relativamente alle prove di disinfezione con isopropanolo 70%, solo 2 ceppi (FCV-F6/08, FCV-G/2000) sono stati inattivati al 100% rispettivamente dopo 1 e 3 min di contatto con il disinfettante. Per gli altri ceppi in esame la percentuale di inattivazione dopo 10 min è risultata compresa tra il 28,0% e il 72,0%. Fa eccezione il ceppo FCV-306, nei confronti del quale l'isopropanolo 70% è risultato completamente inefficace (Tab. 2).

Per quanto riguarda i risultati relativi all'impiego della miscela costituita da etanolo 70% + isopropanolo 30%, n° 2 ceppi (FCV-G/2000, FCV-F6/08) sono stati inattivati al 100% già dopo 1 min di esposi-

TABELLA 2
Risultati delle prove di titolazione virale dopo esposizione (1, 3, 10 min) ai disinfettanti a base di alcool

		Non esposto log ₁₀	1 min log ₁₀	1 min % inat.	3 min log ₁₀	3 min % inat.	10 min log ₁₀	10 min % inat.
Etanolo 70%	FCV-F31	2,5	0	100*	0	100	0	100
	FCV-306	4,75	3,25	32	3,25	32	1,75	63
	FCV-F9	4,5	1,5	67	1	78	0	100
	FCV-G/2000	4,5	0	100	0	100	0	100
	FCV-10/Te/07	4,5	2,75	39	0	100	0	100
	FCV-2280	6,5	3,25	50	3,25	50	3,25	50
	FCV-F24	4,25	0	100	0	100	0	100
	FCV-F6/08	6,5	0	100	0	100	0	100
Isopropanolo 70%	FCV-F31	2,5	2,5	0	2,25	10	1,5	40
	FCV-306	4,75	4,75	0	4,75	0	4,75	0
	FCV-F9	4,5	4,5	0	3,5	17	1,25	72
	FCV-G/2000	4,5	1,5	67	0	100	0	100
	FCV-10/Te/07	4,5	3,75	17	3,5	22	3	67
	FCV-2280	4,5	4,5	0	3,5	22	3,25	28
	FCV-F24	5,25	4,5	14	4,5	14	3,75	29
	FCV-F6/08	7	0	100	0	100	0	100
Etanolo 70% + isopropanolo 30%	FCV-F31	3,25	2,5	23	2,5	23	2,5	23
	FCV-306	4,75	4,5	5	4,5	5	3	37
	FCV-F9	4,5	2,5	44	2	56	1,5	67
	FCV-G/2000	4	0	100	0	100	0	100
	FCV-10/Te/07	4,5	2,25	50	1	78	1	78
	FCV-2280	4,5	4	11	3	33	3	33
	FCV-F24	4,75	4	16	3,25	32	3,25	32
	FCV-F6/08	6	0	100	0	100	0	100

* Percentuale di inattivazione rispetto al titolo iniziale.

TABELLA 3

Risultati delle prove di titolazione virale dopo esposizione (1, 3, 10 min) all'azione della cloramina (250 µg/ml)

Ceppo FCV	Non esposto log ₁₀	1 min log ₁₀	1 min % inat.	3 min log ₁₀	3 min % inat.	10 min log ₁₀	10 min % inat.
FCV-F31	4,25	2,75	35*	0	100	0	100
FCV-306	6,75	6,25	7	3,75	46	0	100
FCV-F9	4,75	4	16	2	58	0	100
FCV-G/2000	5,75	2	65	0	100	0	100
FCV-10/Te/07	7	3,75	46	3,75	46	0	100
FCV-2280	4	2,25	44	2	50	0	100
FCV-F24	6	5	17	1,25	79	0	100
FCV-F6/08	7,25	0	100	0	100	0	100

* Percentuale di inattivazione rispetto al titolo iniziale.

TABELLA 4

Risultati delle prove di Real-time PCR eseguite sui ceppi FCV esposti all'azione della cloramina (n° copie/5 µl)

Ceppi FCV	Non esposto	1 min	3 min	10 min
FCV-F31	8 log ₁₀	10 log ₁₀	10 log ₁₀	10 log ₁₀
FCV-306	9 log ₁₀	10 log ₁₀	10 log ₁₀	10 log ₁₀
FCV-F9	11 log ₁₀	11 log ₁₀	11 log ₁₀	12 log ₁₀
FCV-G/2000	4 log ₁₀	4 log ₁₀	5 log ₁₀	5 log ₁₀
FCV-10/Te/07	3 log ₁₀	4 log ₁₀	4 log ₁₀	4 log ₁₀
FCV-2280	5 log ₁₀	5 log ₁₀	4 log ₁₀	4 log ₁₀
FCV-F24	6 log ₁₀	8 log ₁₀	7 log ₁₀	4 log ₁₀
FCV-F6/08	9 log ₁₀	9 log ₁₀	9 log ₁₀	9 log ₁₀

zione al disinfettante, mentre dopo 10 min di esposizione tutti gli altri ceppi FCV sono stati inattivati in percentuali comprese tra 23,0% e 78,0% (Tab. 2). Infine, la cloramina (Tab. 3) è risultata in grado di inattivare al 100% n° 3 ceppi (FCV-F31, FCV-G/2000 e FCV-F6/08) già a 3 min di esposizione e tutti i ceppi FCV analizzati dopo 10 min determinando una riduzione del titolo virale compresa tra 4 e 7,25 log₁₀.

Al fine di valutare gli effetti della cloramina sul genoma virale, tutti i ceppi FCV oggetto di studio sono stati analizzati mediante Real-time PCR (Tab. 4). Confrontando il numero di copie di c-DNA del virus non esposto alla cloramina, con il numero di copie dello stesso ceppo esposto all'azione del disinfettante, è stato evidenziato per quattro ceppi (FCV G/2000, FCV-306, FCV-10/Te/07, FCV-F31) un aumento del numero delle copie di c-DNA virale con valori compresi tra 1 e 2 log₁₀ a partire già da 1 min e 3 min di esposizione; per n° 2 ceppi (FCV-F6/08, FCV-F9) il numero di copie è rimasto invariato. Tuttavia, il ceppo vaccinale FCV-F9 ha mostrato l'aumento di 1 log₁₀ dopo esposizione per 10 min. Il ceppo FCV-F24 dopo un'iniziale aumento delle copie di c-DNA virale (2 log₁₀ dopo 1 min di contat-

to), ha mostrato una riduzione di uno e tre log₁₀, rispettivamente dopo 3 e 10 min di esposizione. Solo un ceppo (FCV-2280) ha mostrato una riduzione di 1 log₁₀ a partire da 1 min di esposizione.

DISCUSSIONE

Nonostante FCV appartenga ad un unico sierotipo, l'elevata variabilità genetica che caratterizza questo virus ha determinato l'esistenza in natura di numerosi ceppi in grado di adattarsi alle condizioni più eterogenee^{16,11}. L'infezione sostenuta da FCV viene trasmessa soprattutto per contatto diretto con gatti in fase acuta di malattia o con animali portatori persistentemente infetti; inoltre a fronte della sua elevata resistenza nell'ambiente, la trasmissione è possibile anche attraverso fomite, come gabbie, ciotole, attrezzi per la pulizia e persone addette alla cura dei gatti. Ne consegue quindi che l'applicazione di adeguate misure di detersione e disinfezione potrebbe dimostrarsi fondamentale per limitare la trasmissione del virus.

A tal fine, sono stati condotti presso il nostro laboratorio degli esperimenti di disinfezione *in vitro* impiegando diversi isolati di FCV associati a quadri clinici eterogenei e alcuni disinfettanti di comune impiego, quali composti a base di alcool e cloro.

I risultati ottenuti, hanno dimostrato che tutti i composti sono stati in grado di determinare una generale diminuzione del titolo virale di FCV. Tuttavia, sono state osservate differenze relativamente al disinfettante impiegato, al tempo di contatto e soprattutto al ceppo in esame.

In particolare, per quanto riguarda l'attività virulicida degli alcoli, l'etanolo 70% è risultato il disinfettante maggiormente efficace, determinando dopo 10 min di esposizione la completa inattivazione di sei ceppi FCV. Comparando l'azione dell'etanolo 70% e dell'isopropanolo 70%, è stata rilevata una ridotta capacità virulicida di quest'ultimo, il quale è risultato completamente inefficace anche

dopo 10 min di esposizione nei confronti del ceppo FCV-306. Tale dato è in accordo con quanto precedentemente dimostrato da Kampf *et al.*¹⁷, i quali hanno evidenziato una differenza significativa di efficacia da parte dei due disinfettanti sia in presenza di materiale organico, sia quando la disinfezione viene preceduta da un'adeguata deterzione. Analogamente, la miscela etanolo 70% + isopropanolo 30% pur risultando più efficace rispetto all'isopropanolo 70% non ha mostrato le stessa capacità disinfettante dell'etanolo 70%.

La cloramina impiegata alla concentrazione di 250 µg/ml è risultata l'unico disinfettante in grado di inattivare completamente tutti i ceppi FCV analizzati dopo 10 min di esposizione. Tale dato conferma l'efficacia dei composti a base di cloro alle concentrazioni (da 200 a 1000 µg/ml) raccomandate dal CDC (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA)¹⁸. Tuttavia, i nostri risultati sono in contrasto con quanto precedentemente osservato da Duizer *et al.*¹⁹, i quali hanno evidenziato una ridotta capacità virulicida dei composti a base di cloro nei confronti di FCV a concentrazioni inferiori a 3000 µg/ml. Tale discordanza potrebbe essere tuttavia conseguente ad un diverso protocollo di esecuzione dell'esperimento, che nel nostro caso è stato preceduto dalla purificazione di ciascun ceppo FCV al fine di rimuovere eventuali detriti cellulari che, come è noto^{20,21}, avrebbero potuto contrastare il meccanismo d'azione della cloramina.

L'azione virulicida della cloramina nei confronti di FCV e quindi presumibilmente nei confronti della maggior parte dei virus sprovvisti di *envelope*, potrebbe rappresentare un risultato incoraggiante per l'impiego di quest'ultima nella disinfezione secondaria dell'acqua potabile come alternativa al cloro, in analogia a quanto sta avvenendo da qualche anno negli Stati Uniti.

L'indagine molecolare, basata sulla quantificazione del genoma virale, ha evidenziato che la cloramina non è risultata in grado di determinare una riduzione del numero delle copie di c-DNA virale correlabile alla progressiva riduzione del numero di particelle virali infettanti. Al contrario, per la maggior parte dei ceppi analizzati è stato rilevato un aumento del numero delle copie di c-DNA virale tra 1 e 3 min di esposizione. Soltanto un ceppo ha mostrato una riduzione di 1 log₁₀ a partire da 1 min di esposizione. Tale dato conferma che la valutazione di efficacia di un disinfettante nei confronti di un agente patogeno non può basarsi soltanto su un approccio di tipo molecolare²².

Un aspetto particolarmente interessante emerso dal presente studio riguarda l'importanza dei tempi di contatto con il disinfettante e la diversa resistenza dei vari ceppi FCV analizzati. Tutti i composti impiegati hanno dimostrato un progressivo aumento dell'attività virulicida direttamente correlato all'aumento dei tempi di esposizione. Questo aspetto è risultato evidente, come già riportato,

soprattutto negli esperimenti con la cloramina in cui la completa inattivazione di tutti i ceppi esaminati è stata raggiunta dopo i 10 min di contatto.

Valutando la cinetica di inattivazione da parte dei diversi disinfettanti abbiamo rilevato una differenza di resistenza quasi individuale per ciascun ceppo FCV analizzato. La variabilità genetica che caratterizza FCV, e che probabilmente si è resa responsabile dell'emergenza in natura di numerosi ceppi diversi tra loro per virulenza e caratteristiche di resistenza¹¹ è comune anche ad altri membri della famiglia *Caliciviridae*. Per tale ragione, FCV viene spesso impiegato come modello sperimentale per lo studio dei norovirus (NoVs) umani attualmente considerati tra le cause più comuni di gastroenterite epidemica di origine non batterica nell'uomo^{23,24}. Nonostante le recenti acquisizioni sulle caratteristiche morfologiche di questi virus, le indagini finalizzate ad individuare un corretto metodo di inattivazione mediante disinfezione, risultano limitate a causa della mancanza di un substrato cellulare che permetta la replicazione virale. Per ovviare a tale limitazione, la maggior parte delle sperimentazioni condotte in proposito ha sfruttato come prototipo il ceppo vaccinale FCV-F9^{25,19,26,22}. Tuttavia, vi sono opinioni discordanti relativamente all'impiego di quest'ultimo come modello di studio dei NoVs, poiché non sempre è stata evidenziata una corrispondenza dei risultati di efficacia tra le due specie virali, da parte dei vari disinfettanti testati. Tale incongruenza potrebbe essere conseguente sia all'impiego di un ceppo FCV adattato a crescere in laboratorio e sia alla variabilità genetica che accomuna FCV e NoVs. È quindi ipotizzabile che la scelta di un corretto protocollo di disinfezione finalizzato al controllo e alla decontaminazione dell'ambiente dai NoVs, non possa essere definitivamente stabilito fino a quando non verrà allestito un sistema cellulare che permetta la replicazione *in vitro* di questi patogeni.

In conclusione, sulla base dei risultati da noi ottenuti, i composti a base di cloro rappresentano i disinfettanti con il più ampio spettro d'azione dimostrandosi efficaci non solo nei confronti dei ceppi FCV vaccinali, ma anche nei confronti dei ceppi di campo associati a quadri clinici eterogenei. Tuttavia, nell'impiego di tali disinfettanti, non deve essere trascurata l'adeguata deterzione degli ambienti e dei materiali destinati alla disinfezione stessa, così come devono essere rispettati i tempi di esposizione che come rilevato nel presente studio, si sono dimostrati determinanti per la completa inattivazione del virus.

Parole chiave

FCV, resistenza, disinfezione.

■ *In vitro* evaluation of some chemical disinfectants against feline calicivirus

Summary

Introduction and aim of the study - Although the control of FCV infection is largely delegated to vaccinations, there are several evidences that the vaccine is not always protective especially against higher virulent FCV strains. Therefore, the implementation of control measures including the application of a correct disinfection schedule, may be useful to minimize FCV transmission, especially in situations in which cats are housed in groups together. The aim of the present study was to analyse the *in vitro* inactivation properties of some chemical compounds against eight strains of FCV.

Material and methods - The investigation was performed against two vaccine and six field strains of FCV. Inactivation experiments were carried out

by using 70% ethanol, 70% isopropanol, a mixture of 70% ethanol + 30% isopropanol and chloramine at concentration of 250.

Results - Our results showed that all the disinfectants used, were able to determine an overall reduction in viral titre for all the strains analysed. However, the chloramine was found to be more effective against FCV than other compounds to start from 3 min of exposure time.

Discussion - Based on these results, we conclude that chloramine is a promising option for reducing FCV transmission, since it showed effective against several FCV strains associated with different clinical signs.

Key words

FCV, resistance, disinfection.

BIBLIOGRAFIA

- Sosnovtsev SV, Garfield M, Green KY: Processing map and essential cleavage sites of the non-structural polyprotein encoded by ORF1 of the feline calicivirus genome. *J. Virol.*, 76: 7060-7072, 2002.
- Carter MJ, Milton ID, Turner PC, et al: Identification and sequence determination of the capsid protein gene of feline calicivirus. *Arch. Virol.* 122: 223-235, 1992.
- Sosnovtsev SV, Sosnovtsev SA, Green KY: Cleavage of the feline calicivirus capsid precursor is mediated by a virus-encoded proteinase. *J. Virol.*, 72: 3051-3059, 1998.
- Sosnovtsev SV, Belliot G, Chang KO, et al: Feline calicivirus VP2 is essential for the production of infectious virions. *J. Virol.*, 32: 4012-4024, 2005.
- Di Martino B, Di Francesco C.E., Meridiani I, et al: Etiological investigation of multiple respiratory infections in cats. *New microbiol.* 30, 455-461, 2007.
- Pedersen NC, Elliott JB, Glasgow A, et al: An isolated epizootic of hemorrhagic-like fever in cats caused by a novel and highly virulent strain of feline calicivirus. *Vet. Microbiol.*, 73: 281-300, 2000.
- Pesavento PA, MacLachlan NJ, Dillard-Telm L, et al: Pathologic, immunohistochemical, and electron microscopic findings in naturally occurring virulent systemic feline calicivirus infection in cats. *Vet. Pathol.*, 41: 257-263, 2004.
- Dawson S, Bennett D, Carter SD, et al: Acute arthritis of cats associated with feline calicivirus infection. *Res. Vet. Sci.*, 56: 133-143, 1994.
- Geissler K, Schneider K, Platzer G, et al: Genetic and antigenic heterogeneity among feline calicivirus isolates from distinct disease manifestation. *Virus Res.*, 48: 193-206, 1997.
- Van Vuuren M, Geissler K, Gerber D, et al: Characterisation of a potentially abortigenic strain of feline calicivirus isolated from a domestic cat. *Vet. Rec.*, 144: 636-638, 1999.
- Ossiboff RJ, Sheh A, Shotton J, et al: Feline calicivirus (FCVs) isolated from cats with virulent systemic disease possess *in vitro* phenotypes distinct from those of other FCV isolates. *J. Gen. Virol.*, 88: 506-517, 2007.
- Di Martino B, Di Francesco CE, Di Profio F, et al.: Caratterizzazione fenotipica di diversi isolati di FCV. III Workshop Nazionale di Virologia, 46, Bari 11-12 Giugno 2009.
- Di Martino B, Di Rocco C, Ceci C, Marsilio F: Characterization of a strain of feline calicivirus isolated from a dog faecal sample. *Vet. Microbiol.* In corso di stampa, Maggio 2009.
- Oehmig A, Buttner M, Weiland F, et al.: Identification of a calicivirus isolate of unknown origin. *J. Gen. Virol.*, 84: 2837-2845, 2003.
- Marsilio F, Di Martino B, Decaro N, et al: A novel nested PCR for the diagnosis of calicivirus infections in the cat. *Vet. Microbiol.*, 105: 1-7, 2005.
- Radford AD, Coyne KP, Dawson S, et al.: Feline Calicivirus. *Vet. Res.*, 38: 319-335, 2007.
- Kampf G, Grotheer D, Steinmann J: Efficacy of three ethanol-based hand rubs against feline calicivirus, a surrogate for norovirus. *J. Hosp. Infect.* 60: 144-149, 2005.
- Centers for Disease Control and Prevention: Norovirus in health-care facilities fact sheet. Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA. http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/id_norovirusFS.html. 21 December 2006.
- Duizer EP, Bijkerk B, Rockx A, et al.: Inactivation of caliciviruses. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 4538-4543, 2004.
- Harp DL: Current technology of chlorine analysis for water and wastewater. <http://www.hach.com/fmmimghach?/CODE: L70191473%7C1//true>, 2002.
- Urakami H, Ikarashi K, Okamoto K, Abe Y, Ikarashi T, Kono T, Kogaya Y, Tanaka N: Chlorine sensitivity of feline calicivirus, a norovirus surrogate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73: 5679-5682, 2007.
- Poschetto LF, Ike A, Papp T, et al.: Comparison of the sensitivities of noroviruses and feline calicivirus to chemical disinfection under field-like conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73: 5494-500, 2007.
- Koopmans M, Vinje J, de Wit M, et al.: Molecular epidemiology of human enteric calicivirus in The Netherlands. *J. Inf. Dis.*, 181: S262-S269, 2000.
- Fankhauser RL, Monroe SS, Noel JS, et al.: Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J. Inf. Dis.*, 186: 1-7, 2002.
- Doultree JC, Druce JD, Birch CJ, et al.: Inactivation of feline calicivirus, a Norwalk virus surrogate. *J. Hosp. Infect.*, 41: 51-57, 1999.
- Malik YS, Maherchandani S, Goyal SM: Comparative efficacy of ethanol and isopropanol against feline calicivirus, a norovirus surrogate. *Am. J. Infect. Control.*, 34: 31-35, 2006.