

Giovanni Gabutti

Herpes zoster e nevralgia post-erpetica



EDIZIONI MINERVA MEDICA

ISBN: 978-88-7711-878-3

© 2016 – EDIZIONI MINERVA MEDICA S.p.A. – Corso Bramante 83/85 – 10126 Torino
www.minervamedica.it / e-mail: minervamedica@minervamedica.it

I diritti di traduzione, memorizzazione elettronica, riproduzione e adattamento totale o parziale, con qualsiasi mezzo (compresi microfilm e copie fotostatiche), sono riservati per tutti i Paesi.

Indice

Prefazione	VII
<i>G. Gabutti</i>	
1. Il virus VZV: aspetti microbiologici	1
<i>D. Bortolotti, D. Di Luca</i>	
2. Storia naturale e risposta immunitaria nell'infezione da <i>Varicella-zoster virus</i>: varicella ed <i>Herpes zoster</i>	9
<i>A. Stefanati, P. Kuhdari, L. Bertoni, G. Gabutti</i>	
3. Aspetti epidemiologici dell'<i>Herpes zoster</i> e della nevralgia post-erpetica	17
<i>E. Franco, E. Zorzoli, N. Valente, C. Carlino, G. Gabutti</i>	
4. <i>Herpes zoster</i>: aspetti clinici	27
<i>A. Volpi, S. Bondanini</i>	
5. Il dolore neuropatico cronico associato a <i>Herpes zoster</i>: la nevralgia post-erpetica	36
<i>M. Lazzari, S. Montella, M. Divizia, G. Fanelli</i>	
6. Aspetti diagnostici e opzioni terapeutiche dell'<i>Herpes zoster</i>	47
<i>T. Maio, A. Rossi, S. Scotti</i>	
7. Il vaccino: sviluppo, efficacia, <i>effectiveness</i> e sicurezza	57
<i>G. Gabutti, V. Baccello, F. Brosio, A. Stefanati</i>	
8. Aspetti farmacoeconomici	64
<i>S. Boccalini, A. Bechini, P. Bonanni</i>	
9. La vaccinazione per <i>Herpes zoster</i> nel mondo e in Italia	74
<i>G. Icardi, F. Grammatico, I. Barberis</i>	
Conclusioni	85
<i>Il Gruppo degli Esperti</i>	



Elenco autori

VALERIA BACCELLO

Scuola di Specializzazione in Igiene e Medicina Preventiva, Università degli Studi di Ferrara

ILARIA BARBERIS

Dipartimento di Scienze della Salute, Università degli Studi di Genova

ANGELA BECHINI

Dipartimento di Scienze della Salute, Università degli Studi di Firenze

LUCIA BERTONI

Scuola di Specializzazione in Igiene e Medicina Preventiva, Università degli Studi di Ferrara

SARA BOCCALINI

Dipartimento di Scienze della Salute, Università degli Studi di Firenze

PAOLO BONANNI

Dipartimento di Scienze della Salute, Università degli Studi di Firenze

SILVIA BONDANINI

Dipartimento di Scienze Cliniche e Medicina Traslazionale, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"

DARIA BORTOLOTTI

Sezione di Microbiologia e Genetica Medica, Dipartimento di Scienze Mediche, Università degli Studi di Ferrara

FEDERICA BROSIO

Scuola di Specializzazione in Igiene e Medicina Preventiva, Università degli Studi di Ferrara

CRISTIANA CARLINO

Scuola di Specializzazione in Igiene e Medicina Preventiva, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"

DARIO DI LUCA

Sezione di Microbiologia e Genetica Medica, Dipartimento di Scienze Mediche, Università degli Studi di Ferrara

MARCO DIVIZIA

Dipartimento di Emergenza, Accettazione e dell'Area Critica, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata", Fondazione PTV Policlinico "Tor Vergata", UOSD di Terapia Antalgica, Roma

GUIDO FANELLI

Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Università di Parma - 2° Anestesia, Rianimazione e Terapia Antalgica, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma

ELISABETTA FRANCO

Dipartimento di Biomedicina e Prevenzione, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"

GIOVANNI GABUTTI

Dipartimento di Scienze Mediche, Università degli Studi di Ferrara

FEDERICO GRAMMATICO

Dipartimento di Scienze della Salute, Università degli Studi di Genova

GIANCARLO ICARDI

Dipartimento di Scienze della Salute, Università degli Studi di Genova - IRCCS AOU San Martino-IST, Genova



PARVANÈ KUHDARI

Scuola di Specializzazione in Igiene e Medicina Preventiva, Università degli Studi di Ferrara

MARZIA LAZZARI

Dipartimento di Scienze Cliniche e Medicina Traslazionale, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata" - Dipartimento di Emergenza, Accettazione e dell'Area Critica, Fondazione PTV Policlinico "Tor Vergata", UOSD di Terapia Antalgica, Roma

TOMMASA MAIO

Federazione Italiana Medici di Medicina Generale

SILVANA MONTELLA

Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Università degli Studi di Parma

ALESSANDRO ROSSI

Società Italiana di Medicina Generale e delle Cure Primarie

SILVESTRO SCOTTI

Federazione Italiana Medici di Medicina Generale

ARMANDO STEFANATI

Dipartimento di Scienze Mediche, Università degli Studi di Ferrara

NICOLETTA VALENTE

Scuola di Specializzazione in Igiene e Medicina Preventiva, Università degli Studi di Ferrara

ANTONIO VOLPI

Dipartimento di Scienze Cliniche e Medicina Traslazionale, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"

ERMANNÒ ZORZOLI

Scuola di Specializzazione in Igiene e Medicina Preventiva, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"

Prefazione

G. GABUTTI

La consapevolezza sia dell'impatto epidemiologico di molte patologie infettive prevenibili mediante vaccinazione negli adulti e negli anziani, sia dell'esistenza di possibili ampie applicazioni della pratica vaccinale negli stessi, ha determinato una crescente attenzione del mondo scientifico nei confronti delle immunizzazioni in tutte le fasce di età. In questo contesto si inserisce la vaccinazione per *Herpes zoster* (HZ).

Il peso complessivo dell'HZ sia in termini di morbosità che di complicanze e sequele a breve e lungo termine, il livello subottimale delle terapie disponibili e gli alti costi correlati con la patologia, hanno indotto i ricercatori già molti anni fa a sviluppare un nuovo approccio preventivo mediante vaccinazione.

Nel corso degli anni si è dimostrato che i vaccini varicella, in particolare quelli a elevato titolo antigenico, elicitano un incremento

significativo dell'immunità cellula-mediata in anziani immunocompetenti. Il vaccino *zoster* oggi commercialmente disponibile ha un elevato contenuto antigenico e nel corso degli anni sono stati pubblicati numerosi studi che ne hanno valutato efficacia, *effectiveness* e sicurezza.

Sulla base delle evidenze scientifiche acquisite e delle valutazioni di *health technology assessment* (HTA) disponibili che confermano la valenza della vaccinazione *zoster* e ne supportano l'uso, diverse nazioni nel mondo e alcune regioni italiane hanno introdotto la vaccinazione, seppure con diverse raccomandazioni e modalità di finanziamento dell'intervento di immunizzazione.

Con il presente volume si è voluto fare il punto sulle più aggiornate conoscenze scientifiche tenendo conto della multidisciplinarietà che contraddistingue questa importante malattia infettiva.

Il virus VZV: aspetti microbiologici

D. BORTOLOTTI, D. DI LUCA

Il virus *Varicella-zoster* (VZV) è un *herpesvirus* appartenente alla sottofamiglia degli *alphaherpesvirus* e mostra tropismo per cellule epiteliali, linfociti T e neuroni gangliari. Questa peculiarità permette al virus di diffondere dalle mucose alla pelle durante l'infezione primaria, che di norma si manifesta nella prima infanzia sotto forma di varicella, caratterizzata da rash, febbre e prurito.

A seguito dell'infezione primaria, VZV entra in latenza a livello dei neuroni gangliari, da cui può riattivarsi ad esempio in caso di età avanzata o immunosoppressione, provocando l'insorgenza di *Herpes zoster* (HZ), condizione caratterizzata da dolore e rash cutaneo. Come conseguenza dell'*Herpes zoster* possono scaturire diverse complicazioni, quali disordini oculari e neurologici, tra cui nevralgia post-erpetica.

STORIA

Inizialmente, varicella e vaiolo erano considerati un'unica patologia, fino a quando nel 1768 William Herberden li descrisse come entità distinte. Successivamente, nel 1863, Friedrich Von Barenprung descrisse i meccanismi infiammatori dei gangli che sottendevano il rash cutaneo da HZ, identificati poi più dettagliatamente nel 1900 da Head e Campbell tramite mappatura dei dermatomeri interessati dalle lesioni gangliari da HZ¹. È interessante notare come anche al giorno d'oggi, dopo aver ottenuto da decenni la completa eradicazione

del vaiolo, nelle aree endemiche per *monkeypox* (una zoonosi causata da *poxvirus* dei roditori che causa una patologia simile al vaiolo, anche se più lieve) casi di varicella possono essere scambiati per episodi di *monkeypox*². Fu solo nel 1892 che Von Bokay ipotizzò una causa infettiva comune per varicella ed *Herpes zoster*, supportato dalle affermazioni di Garland³ che suggeriva che l'HZ fosse il risultato della riattivazione del virus latente acquisito in precedenza durante la varicella.

I primi esperimenti *in vitro* per la propagazione del VZV in una coltura tissutale furono eseguiti nel 1953 da Weller, che inoculò cellule con fluidi ottenuti da lesioni di pazienti con varicella e HZ. Weller, grazie a questi esperimenti, osservò che utilizzando entrambi i tipi di inoculi si osservava lo stesso effetto citopatico e la presenza di virioni morfologicamente indistinguibili⁴. Trent'anni dopo, nel 1983, Gilden dimostrò la latenza di VZV nei gangli nervosi⁶, utilizzando sonde radio-marcate dirette contro il genoma di VZV. La conferma che l'HZ fosse conseguenza della riattivazione dello stesso virus causa di varicella arrivò nel 1984 da Straus⁶, mentre il genoma virale venne completamente sequenziato dal ceppo Dumas due anni dopo da Davison e Scott⁷.

Il genoma di VZV risulta essere piuttosto stabile e per questo motivo tecniche di mutagenesi sono state utilizzate per generare VZV ricombinanti allo scopo di identificare quali elementi virali, come proteine e promotori, fossero implicati nella patogenesi dell'infezione virale.



Per quanto concerne lo sviluppo di approcci preventivi, l'unico vaccino disponibile per prevenire l'infezione da VZV nell'uomo è rappresentato dal vaccino attenuato ottenuto dal ceppo Oka da Takahashi negli anni '70⁸. Esistono inoltre terapie antivirali attive contro VZV identificate già negli anni '80⁹.

HERPESVIRUS

Gli *herpesvirus* umani sono virus a DNA a doppia elica provvisti di *envelope*. Fanno parte della famiglia *Herpesviridae* e si distinguono in 9 specie che hanno per ospite l'uomo: *Herpes simplex virus* 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2), il virus della *Varicella-zoster* (VZV), il virus di *Epstein-Barr* (EBV), il *Citomegalovirus* (CMV), gli *herpesvirus* umani 6A, 6B, 7 e 8 (HHV-6A, HHV-6B, HHV-7 e HHV-8).

Morfologicamente, tutti gli *herpesvirus* condividono caratteristiche simili: sono provvisti di *envelope*, contenente almeno 12 gli-

coproteine virali, che circonda il capsido icosaedrico. Il genoma virale ha dimensioni che variano da 125 kbp a 240 kbp e codifica per circa 75-100 proteine virali.

Nonostante queste similitudini strutturali che accomunano gli *herpesvirus*, esistono importanti differenze a livello genomico che determinano varianti antigeniche che permettono di distinguerne le varie tipologie.

È possibile suddividere gli *herpesvirus* in tre sottofamiglie in base a parametri biologici quali sede di latenza e tropismo cellulare: α (a cui appartengono HSV-1, HSV-2 e VZV), β (in cui rientrano CMV, HHV-6A e HHV-6B e HHV-7) e γ (EBV e HHV-8) (Fig. 1.1).

ALPHAHERPESVIRINAE

Rispetto alle altre due sottofamiglie, gli *alphaherpesvirinae* sono caratterizzati da una replicazione relativamente veloce, rapida diffusione in coltura e capacità di instaurare latenza nelle cellule infettate, in particolare, ma

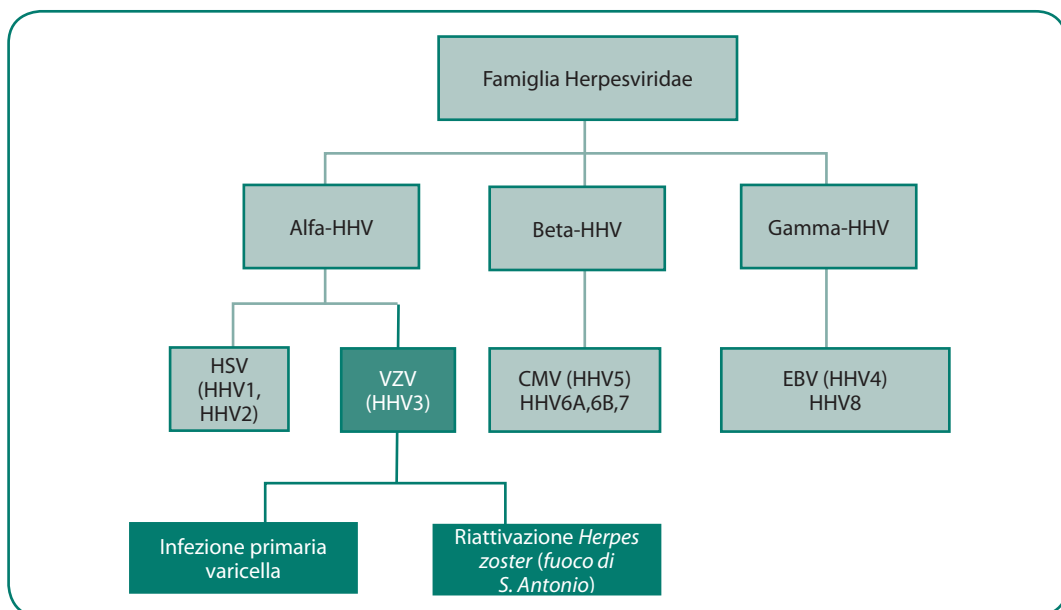


FIGURA 1.1. Schema delle sottofamiglie degli *herpesvirus* umani. HHV: Human Herpes virus; HSV, *Herpes simplex virus*; VZV: *Varicella zoster virus*; CMV: *Citomegalovirus*; EBV: *Epstein Barr virus*.

non solo, quelle nervose. I tre *alphaherpesvirus* (HSV-1, HSV-2 e VZV) sono in grado di replicare in diversi tessuti di mammifero ed entrare successivamente in latenza nei gangli neuronali a livello dell'assone, sede da cui possono riattivarsi e causare malattia. La capacità di entrare in una fase di latenza rappresenta un meccanismo di evasione immunitaria che permette al virus di perdurare nell'organismo per l'intera durata della vita dell'ospite. L'ingresso nella cellula ospite avviene per endocitosi mediata dalle glicoproteine virali gB, gC, gD e gH e la replicazione è lisogenica. VZV è l'unico *varicellovirus* conosciuto che infetta l'uomo.

STRUTTURA

Il virione di VZV è composto principalmente da quattro componenti: genoma, capside, tegumento ed envelope. Il genoma di VZV è costituito da una singola molecola di DNA a doppio filamento avvolto all'interno del capside virale. Quest'ultimo è costituito da 162 capsomeri, ha struttura icosaedrica ed è totalmente indistinguibile da quello degli altri *herpesvirus*. I capsomeri di VZV non sono stati tutti identificati, ma per l'analogia con gli altri *herpesvirus*, si sono identificate sequenze codificanti (ORFs) analoghe a quelle degli altri herpesvirus (tra cui ORF 20, 21, 23, 33, 40 e 41).

Tra capside ed *envelope* è situato il tegumento che include diverse proteine tra cui tre proteine precocissime (*immediate early*, IE) e chinasi virali, codificate da ORF47 e ORF66.

Le proteine del tegumento si associano al capside che viene poi ricoperto con frammenti membranosi della cellula ospite che costituiranno l'*envelope*. L'*envelope* di VZV è costituito da glicoproteine virali e porzioni di membrana provenienti da diverse strutture cellulari, come reticolo endoplasmatico (ER), vescicole citoplasmatiche e membrana citoplasmatica che il virione acquisisce durante il passaggio all'interno della cellula dal nucleo verso l'esterno.

A causa della natura lipidica dell'*envelope* che lo riveste, VZV è sensibile a degradazione in presenza di solventi organici, calore a 60 °C, pH estremamente acidi o basici e ultrasuoni.

La densità di flottazione in CsCl è di 1,705 g/cm⁻³, mentre quella dell'Herpes simplex è di 1,72 g/cm⁻³.

GENOMA

Tra tutti gli *alphaherpesvirus*, VZV è quello con il genoma di più piccole dimensioni (circa 125 kbp). Il genoma consiste di una regione UL (*unique long region*) di circa 105 kbp fiancheggiata da zone ripetute e invertite dette TRL (*terminal repeat long region*) e IRL (*internal repeat long region*). Sono inoltre presenti regioni US (*unique short region*) di circa 5 kbp fiancheggiate da TRS (*terminal repeat short region*) e IRS (*inverted repeat short region*) (Fig. 1.2).

Le regioni US possono essere orientate in entrambi i sensi, mentre le regioni UL raramente cambiano il loro orientamento. In questo modo, nelle cellule infettate è possibile reperire due isomeri del genoma. L'origine di replicazione (ori) è localizzata nella regione ripetuta. Il genoma all'interno dei virioni è lineare, con un nucleotide spaio ad ogni estremità (una C all'estremità sinistra e una G a quella destra) che permettono la circolarizzazione dello stesso mediante appaiamento all'interno delle cellule infettate latentemente da VZV. Il genoma di VZV codifica per circa 70 geni (ORFs), di cui

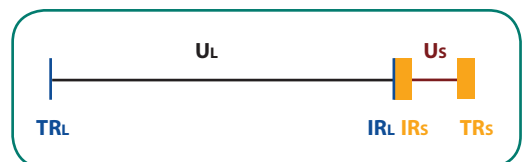


FIGURA 1.2. Diagramma della struttura del genoma di VZV. UL: *unique long region*; US: *unique short region*; TRL: *terminal repeat long*; TRS: *terminal repeat short*; IRL: *inverted repeat long*; IRS: *inverted repeat short*.

tutti tranne sei trovano omologhi negli altri herpesvirus¹⁰. Una significativa porzione del genoma di VZV risulta sovrapponibile con quello di HSV-1 e pertanto molte proteine prodotte da VZV hanno regioni simili o addirittura identiche. Solo sei ORF di VZV (ORF1, 2, 13, 32, 57 e S/L) non trovano omologia in HSV-1 e risultano non essere necessarie per la replicazione *in vitro*. In particolare, 44 ORFs sono essenziali per la replicazione *in vitro* e altamente conservate in tutti gli *herpesvirus*. Tra questi geni conservati, troviamo ORF4, che codifica per una proteina precocissima (*immediate early*, IE), quelli codificanti per le glicoproteine gB, gC, gE, gH, gI, gK, gL, gN, il gene codificante la DNA polimerasi e altri enzimi virali.

Mediante il fenomeno della duplicazione genica, sono presenti in due copie all'interno delle regioni IRS e TRS dei geni che codificano ORF62/71, ORF63/70 e ORF64/69. Undici ORFs presentano "overlapping", mentre altri producono proteine diverse mediante *splicing* alternativo, come ad esempio nel caso di ORF42 e ORF45⁷.

All'interno del genoma di VZV troviamo cinque piccole regioni, R1-R5: la regione R1 è situata all'interno della ORF11, R2 nella ORF14 (codificante per la glicoproteina C), R3 in ORF22, R4 tra ORF62 e ori e R5 tra ORF60 e 61. Queste regioni comprendono sequenze ripetute che possono variare, permettendo la distinzione dei vari ceppi virali tramite digestione enzimatica e corsa elettroforetica su gel.

Studi di sequenziamento hanno dimostrato che il genoma di VZV è piuttosto stabile e geograficamente uniforme. In base alle maggiori differenze riscontrate a livello genomico, è possibile identificare 5 cladi¹¹ (Tab. 1.I), in cui le cladi 1 e 2, pur essendo le più divergenti, sono identiche per il 99,83%. *Oka virus*, utilizzato per la produzione del vaccino per VZV, rientra nella clade 2.

I geni di VZV rientrano in tre tipologie a seconda del momento in cui sono espressi

TABELLA 1.I. Cladi di VZV.

Clade	Origine ceppi	Genotipi
1	Europa\Nord America	C\E1\A
2	Asia (Giappone)	J\C
3	Europa\Nord America	B\E2\D
4	Africa	J2\M2\B
5	Europa\India	A\M1

durante il ciclo replicativo del virus: immediatamente precoci (*immediate-early*, IE) codificanti per proteine regolatorie, precoci (*early*, E) codificanti fattori necessari per la replicazione virale e tardivi (*late*, L) codificanti proteine strutturali.

Geni immediatamente precoci (IE). Codificano per proteine IE dette α che, una volta prodotte, stimolano la trascrizione dei geni precoci. VZV codifica almeno tre proteine IE localizzate nel tegumento: IE4, IE62 e IE63. IE4 e IE62 transattivano promotori IE, E e L, mentre IE63 ha funzione opposta, reprimendo l'attivazione di vari promotori di VZV oltre a inibire la funzione dell'interferone-alfa.

Geni precoci (E). Portano alla produzione di proteine β necessarie per la replicazione virale come ad esempio la DNA polimerasi virale (codificata da ORF28 e ORF16), bersaglio dell'azione farmacologica dell'acyclovir, la timidina chinasi virale (ORF36), protein chinasi (ORF47 e ORF66) e altri enzimi come dUTPasi, timidilato sintetasi, proteasi, DNasi e uracil-DNA glicosilasi.

Geni tardivi (L). Comprendono proteine strutturali dette γ , come proteine del tegumento (ORF10), proteine del capsido (ORF40 e ORF21) e le 7 glicoproteine di VZV: gB (ORF31), gC (ORF14), gE (ORF68), gH (ORF37), gI (ORF67), gK (ORF5), gL (ORF60), gM (ORF50) e gN (ORF9A). Queste ultime risultano fondamentali nella varie fasi dell'infezione virale. La glicoproteina B è fondamentale per l'ingresso del virus nella cellula, mentre le H e M sono fondamentali per la diffusione del virus.

REPLICAZIONE

Il VZV, come anche gli altri *herpesvirus*, è in grado di legare la cellula ospite mediante fusione dell'*envelope* virale con la membrana cellulare. Questo avviene grazie al legame della glicoproteina B presente nell'*envelope* con l'eparan-solfato e permette l'ingresso del capsido nel citoplasma della cellula per endocitosi. Oltre alla glicoproteina B, la glicoproteina H sembra facilitare la fusione dell'*envelope* alla membrana cellulare.

Una volta entrato nella cellula ospite, il capsido, associato con proteine del tegumento (ORF4, 10 e 62), migra verso il nucleo dove il genoma virale circolarizza e inizia la trascrizione dei geni virali mediante l'azione congiunta di proteine transattivatrici virali (ORF4, 10, 61, 62 e 63) e RNA polimerasi II della cellula.

I geni di VZV vengono trascritti con un ordine temporale ben preciso: da 2 a 4 ore post-infezione vengono trascritti mRNA immediatamente precoci (IE) che codificano per proteine α , seguite dalle proteine β codificate dagli mRNA precoci (E) e infine si ha la produzione delle proteine γ codificate dai geni tardivi (L).

Il principale fattore trascrizionale è rappresentato da IE62. IE62 ha localizzazione nucleare e si lega direttamente ai fattori trascrizionali cellulari Sp1, USF e TFIIB, oltre che alle proteine virali IE4 e IE63²⁵. IE62 in questo modo interagisce con il complesso trascrizionale della RNA polimerasi II cellulare e transattiva l'espressione dei geni virali. In particolare, la presenza di Sp1 sul promotore della glicoproteina gI recluta IE62 risultando fondamentale per la sua attivazione. Infatti, siti di legame per Sp1 sono stati ritrovati in quasi tutti i promotori di VZV¹².

Gli mRNA IE sono i primi ad essere trascritti e tradotti nel citoplasma. Le proteine α risultanti sono trasportate nel nucleo dove inducono la produzione delle proteine β , coinvolte nella replicazione del DNA virale. Infine, gli mRNA L sono tradotti nelle proteine γ che formeranno il capsido e che entreranno nel nucleo rivestendo il DNA di VZV neosintetizzato. Successivamente, passando dal nucleo al citoplasma, il nucleocapside viene rivestito dall'*envelope*, formando virioni maturi. Tutto il processo di replicazione virale, dall'ingresso nella cellula ospite fino alla formazione di nuovi virioni (Tab. 1.II), richiede

TABELLA 1.II. Fasi della replicazione virale di VZV.

Fase	Caratteristiche
Adesione e ingresso	Le glicoproteine virali legano i glicosamminoglicani (eparansolfato) presenti sulla superficie cellulare e penetrano per fusione (gB) dell' <i>envelope</i> con la membrana cellulare o in alternativa per endocitosi recettore-mediata
Spogliazione e sintesi proteine virali	Dopo l'ingresso nella cellula, il nucleocapside è liberato nel citoplasma e va nel nucleo, dove viene liberato il genoma virale. Le proteine del tegumento codificate da IE4, ORF10 e IE62 inducono la cascata di trascrizione dei geni IE, E e L da parte della RNA polimerasi-DNA dipendente cellulare (RNA polimerasi II)
Replicazione genoma virale	La DNA polimerasi virale produce nuovi genomi di VZV secondo il modello del "circolo rotante", in cui il filamento interno è utilizzato come stampo
Impacchettamento	I nuovi genomi virali sono impacchettati all'interno dei capsidi
Fuoriuscita nuovi virioni	I nuovi virioni acquisiscono l' <i>envelope</i> dalla membrana nucleare e dal sistema membranoso del Golgi ed infine fuoriescono per lisi o esocitosi

VZV: *Varicella zoster virus*; IE: *immediate early*; E: *early*; L: *late*.

circa 9-12 ore. Una caratteristica peculiare dell'infezione da VZV è quella di indurre le cellule infettate a formare sincizi.

DIAGNOSI MICROBIOLOGICA

La diagnosi di infezione da VZV viene effettuata mediante la ricerca del virus o dei suoi prodotti in tessuti o fluidi, come ad esempio tamponi di lesioni vescicolari, fluidi vescicolari o pelle (Tab. 1.III). Le diagnosi di laboratorio risultano fondamentali nel determinare il trattamento antivirale da assumere, soprattutto in presenza di pazienti ad alto rischio.

I test diagnostici di laboratorio comprendono esami di biologia molecolare, quali la reazione di polimerizzazione a catena (PCR), che rappresenta lo standard diagnostico, l'immunofluorescenza (IF) e metodiche sierologiche e colturali. PCR e IF sono le metodiche predilette in termini di accuratezza, velocità e costi.

Poiché VZV potenzialmente può causare problemi neurologici in assenza di rash (ad es. meningoencefalite, vasculopatia o necrosi della retina), il DNA virale viene ricercato tramite PCR in campioni di liquor o sangue¹³. Nel liquor si esegue anche la ricerca di anti-

corpi anti-VZV, in particolare di IgG che indicano un'infezione cronica attiva¹⁴. La ricerca di IgG contro VZV nel sangue risulta utile per determinare la situazione immunologica in caso di anamnesi non chiara di infezione. Di norma, un aumento di quattro volte o più del titolo di IgG in campioni sequenziali di sangue è considerato significativo a livello diagnostico, permettendo di discriminare infezione primaria (sieroconversione da IgG-negativo/Ig-M positivo a IgG-positivo) da *Herpes zoster*¹⁵.

La rivelazione diretta della presenza di VZV nei campioni può essere effettuata tramite microscopia, IF, per la ricerca degli antigeni virali, PCR o metodi sierologici.

L'analisi microscopica permette di evidenziare cellule giganti multinucleate con profili cromatinici alterati tipici sia dell'infezione da VZV che da HSV. Oggigiorno, questa tecnica è in disuso in quanto sostituita dall'utilizzo delle più sensibili PCR e IF. Il maggiore uso diagnostico della microscopia fa riferimento all'analisi del fluido vescicolare mediante microscopia elettronica allo scopo di distinguere gli *herpesvirus* da altri agenti patogeni sfruttando la peculiare morfologia degli *herpesvirus*, ma senza però dare prova di infezione specifica da VZV.

TABELLA 1.III. Tipologie di campioni per diagnosi di VZV.

Tipo campione	Raccolta e test diagnostici
Materiale cellulare da lesioni	Le cellule epiteliali infette sono raccolte dalla base della lesione mediante l'utilizzo di un ago sterile. Il tempo tra raccolta e analisi è critico a causa della scarsa resistenza di VZV nell'ambiente. Il materiale può poi essere fissato su vetrino per la ricerca diretta di antigeni virali, PCR o IF
Fluido vescicolare	Viene raccolto con tamponi (tecnica meno indicata), capillari o siringhe. Contiene virus libero ed è indicato per diversi test diagnostici eccetto IF
Tessuto	Fettine istologiche di tessuto vengono depositate su vetrini per eseguire l'IF o utilizzati per estrarre DNA da analizzare in PCR
Sangue e liquor	Il virus può essere isolato da sangue e più raramente da liquor. La presenza di VZV viene rivelata in modo efficace tramite PCR

VZV: *Varicella zoster virus*; PCR: reazione a catena della polimerasi; IF: immunofluorescenza

L'analisi sierologica per diagnosi di varicella o *Herpes zoster* risulta particolarmente utile in adulti che non hanno mai manifestato varicella. I test sierologici più utilizzati si basano su saggi immunoenzimatici (ELISA) commerciali¹⁶, sull'uso di anticorpi fluorescenti per antigeni di membrana (FAMA)¹⁷ e sui test di agglutinazione¹⁸. La presenza di anticorpi contro VZV può essere valutata con il metodo della riduzione delle placche su cellule infettate.

La rivelazione diretta di antigeni di VZV su preparati istologici o cellule infette viene effettuata tramite IF, utilizzando anticorpi monoclonali diretti verso proteine specifiche del virus. La marcatura può essere effettuata in modo diretto (utilizzando un anticorpo specifico coniugato) o indiretto (richiede l'utilizzo di un anticorpo secondario marcato). La marcatura diretta risulta essere più specifica rispetto al metodo indiretto in quanto si riduce il rischio di non-specificità dovuto all'utilizzo di più anticorpi.

L'utilizzo di anticorpi fluorescenti è il metodo più utilizzato nelle valutazioni sierologiche per identificare la presenza di VZV. Sebbene l'IF rappresenti una tecnica molto sensibile e precisa, il gold standard per l'analisi di laboratorio è rappresentato dall'utilizzo delle tecniche molecolari¹⁹.

La ricerca del genoma virale tramite PCR è ad oggi la tecnica più utilizzata per identificare la presenza del virus in campioni cutanei e fluidi vescicolari¹⁹, secrezioni respiratorie e oculari, sangue e liquor. Ad oggi, la tecnica di PCR più utilizzata è la *real-time* PCR, che dà il vantaggio di essere più veloce, meno laboriosa e costosa rispetto alla PCR tradizionale³². Mediante *real-time* PCR è possibile analizzare contemporaneamente nello stesso campione più target diversi, siano essi diversi geni di VZV o geni appartenenti a diversi virus. I metodi basati sulla PCR sono stati sviluppati in modo da poter distinguere tra il ceppo Oka, utilizzato nei vaccini, e i ceppi selvatici del virus²⁰, per esempio tramite l'individuazione di specifici polimorfismi di sequenza o l'analisi dei frammenti di restrizione (RFLP).

BIBLIOGRAFIA

1. Head H, Cambell AW. The pathology of herpes zoster and its bearing on sensory localisation. *Brain* 1900;23:353-61.
2. MacNeil A, Reynolds MG, Carroll DS *et al.* Monkeypox or varicella? Lessons from a rash outbreak investigation in the Republic of the Congo. *Am J Trop Med Hyg* 2009;80:503-7.
3. Garland J. Varicella following exposure to herpes zoster. *N Engl J Med* 1943;228:336-7.
4. Weller Th, Witton HM, Bell EJ. The etiologic agents of varicella and herpes zoster: isolation, propagation and cultural characteristics in vitro. *J Exp Med* 1953;108:843-68.
5. Gilden DH, Vafai A, Shtram Y *et al.* Varicella-zoster virus DNA in human sensory ganglia. *Nature* 1983;306:478-80.
6. Straus SE, Reinhold W, Smith Ha *et al.* Endonuclease analysis of viral DNA from varicella and subsequent zoster infection in the same patient. *N Engl J Med* 1984;311:1362-4.
7. Davison AJ, Scott J. The complete DNA sequence of varicella-zoster virus. *J Gen Virol* 1986;67:1759-816.
8. Takahashi M. Clinical overview of varicella vaccine: development and early studies. *Pediatrics* 1986;78:736-41.
9. Whitley RJ, Gnann Jr. JW, Hinthorn D *et al.* Disseminated herpes zoster in the immunocompromised host: a comparative trial of acyclovir and vidarabine. The NIAID Collaborative Antiviral Study Group. *J Infect Dis* 1992;165:450-5.
10. Arvin AM, Gilden D. In: Knipe D, Howley P, editors. *Fields Virology* 6th Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 2015-57.
11. Grose C. Pangaea and the Out-of-Africa Model of Varicella-Zoster Virus Evolution and Phylogeography. *J Virol* 2012;86:9558-65.
12. Ruyechan WT. Roles of cellular transcription factors in VZV replication. *Curr Top Microbiol Immunol* 2010;342:43-65.
13. Wolf J, Nagel MA, Mahalingam R *et al.* Chronic active varicella zoster virus infection. *Neurology* 2012;79:828-9.

14. Gilden DH, Wright RR, Schneck SA *et al.* Zoster sine herpette, a clinical variant. *Ann Neurol* 1994;35:530-3.
15. Kneitz RH, Schubert J, Tollmann F *et al.* A new method for determination of varicella-zoster virus immunoglobulin G avidity in serum and cerebrospinal fluid. *BMC Infect Dis* 2004;4:33.
16. Saiman L, LaRussa P, Steinberg S *et al.* Persistence of immunity to varicella-zoster vaccination among health care workers. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2001;22:279-83.
17. Williams V, Gershon A, Brunell P. Serologic response to varicella-zoster membrane antigens measured by indirect immunofluorescence. *J Infect Dis* 1974;130:669-72.
18. Gershon A, Steinberg S, LaRussa P. detection of antibodies to varicella-zoster virus by latex agglutination. *Clin Diagn Virol* 1994;2:271-7.
19. Schmutzhard J, Merete Riedel H, Zweyberg Wirgart B *et al.* Detection of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2 and varicella-zoster virus in skin lesion. Comparison of real-time PCR, nested PCR and virus isolation. *J Clin Virol* 2004;29:120-6.
20. Sauerbrei A, Eichhorn U, Gawellek S *et al.* Molecular characterization of varicella-zoster virus strains in Germany and differentiation from the Oka vaccine strain. *J Med Virol* 2003;71:313-9.