



# Diagnosi virologica delle infezioni oculari da virus dell'herpes simplex

Milena Furione

Servizio di Virologia, IRCCS Policlinico San  
Matteo, 27100 Pavia, Italy

# *HERPESVIRIDAE*

*alfa*-herpesvirus: Herpes Simplex Virus 1 (HHV-1)  
Herpes Simplex Virus 2 (HHV-2)  
Varicella Zoster Virus (HHV-3)

*beta*-herpesvirus: Human Cytomegalovirus (HHV-5)  
Human Herpes Virus 6 (HHV-6)  
Human Herpes Virus 7 (HHV-7)

*gamma*-herpesvirus: Epstein-Barr Virus (HHV-4)  
Human Herpes Virus 8 (HHV-8)

# *HERPESVIRIDAE*

- Contatto diretto cutaneomucoso
- incubazione variabile (2-12 gg per HHV-1)
- infezione primaria
- fase di latenza
- infezione ricorrente

# Herpes simplex virus

- **Infezione primaria**
  - » replicazione virale muco-cutanea
  - » terminazioni neurosensitive
  - » trasporto ai gangli nervosi (flusso neuronale)
- **Latenza**
  - » assenza di replicazione virale
  - » genoma virale in forma episomica
- **Infezione ricorrente**
  - » replicazione virale
  - » trasporto alla sede dell'infezione primaria
  - » lesione muco-cutanea

# HHV-1 infezione primaria: forme cliniche

- Gengivostomatite                   + + frequente
- herpes oculare
- encefalite/meningite
  
- infezione nella prima infanzia
- in età adulta circa 80% sieropositività

# HHV-2 infezione primaria: forme cliniche

- herpes genitale + + frequente
- herpes neonatale
- trasmissione sessuale o perinatale
- incremento della seroprevalenza a partire dall'adolescenza
- in età adulta circa 15-50% sieropositività

# Infezione erpetica ricorrente: forme cliniche

- Localizzazione nella sede della lesione iniziale
- eruzione cutaneo-mucosa
- herpes oculare
- encefalite/meningite

# Infezione erpetica generalizzata

- Rara
- Paziente immunocompromesso
- Herpes neonatale

# Herpes oculare

## Forme cliniche

- Blefarite
- Congiuntivite follicolare
- Cheratite
  - » epiteliale
  - » stromale
- Uveite/retinite

## Altri virus

**varicella-zoster**

**adenovirus**

**varicella-zoster**

**varicella-zoster**

**citomegalovirus**

**varicella-zoster**

# Herpes oculare

## Forme cliniche

- Necrosi retinica acuta
  - Traumi
  - Terapia corticosteroidea
  - HHV-2
  - Herpes neonatale

## Altri virus

**citomegalovirus**  
**varicella-zoster**  
**Epstein-Barr**

(Tran et al., Am J Ophthalmol 2004)

# Diagnosi virologica: perché?

- Farmaci antivirali virus-specifici
- Terapia tempestiva migliora la prognosi
- **Terapia steroidea** controindicata in caso di infezione virale

# Diagnosi virologica

## campione biologico

→ prelievo prima del trattamento locale o sistemico!!

- cheratocongiuntivite                   - tampone  
  blefarite                                 - *scraping*
  
- uveite                                       - umor acqueo o vitreo  
  retinite

# Diagnosi virologica

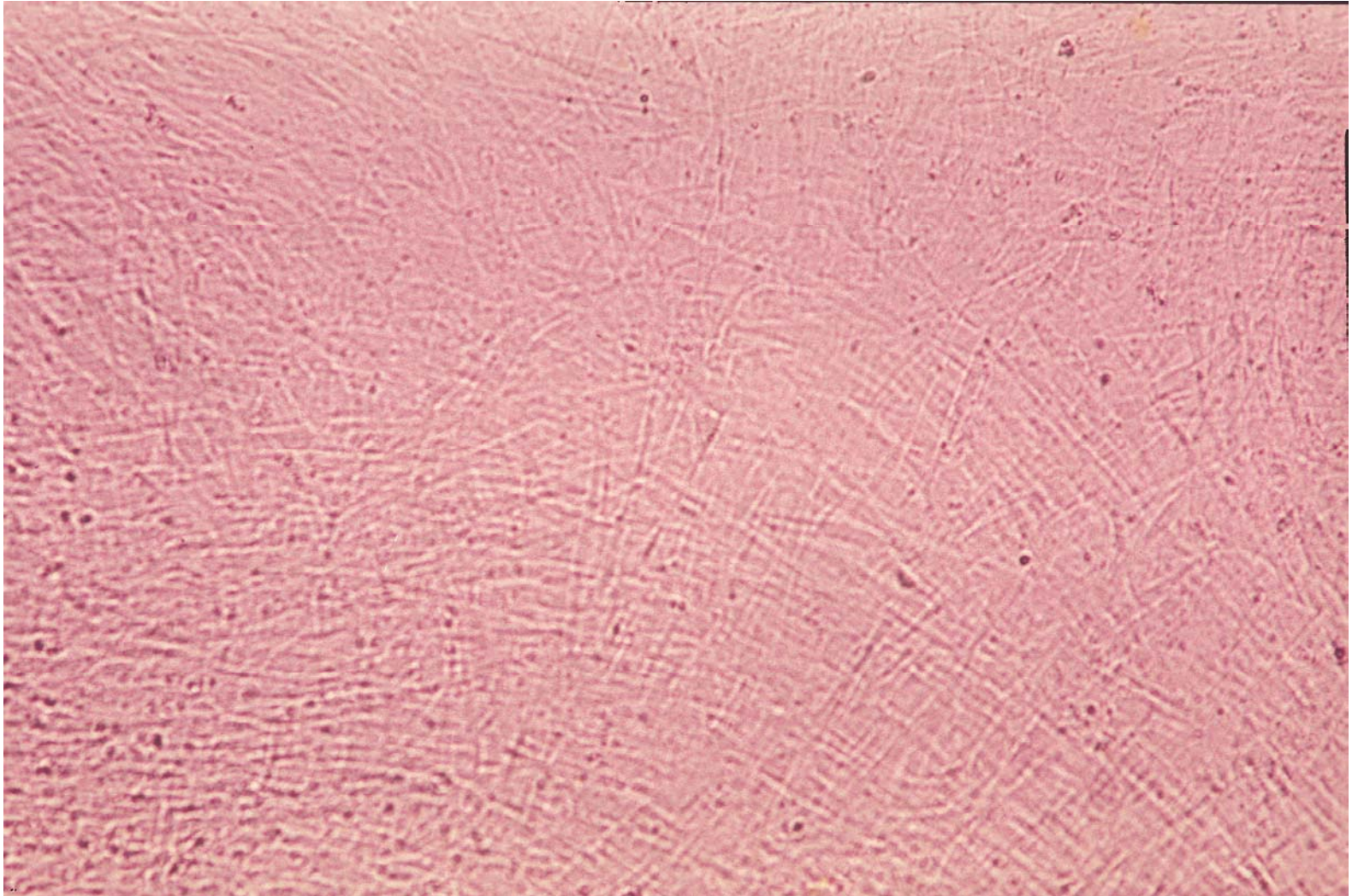
- isolamento virale **24-48 ore**
  - Classico
  - Rapido
- ricerca diretta antigeni virali **1-2 ore**
- ricerca acidi nucleici virali **6-8 ore**
- ricerca anticorpi specifici

# Isolamento virale

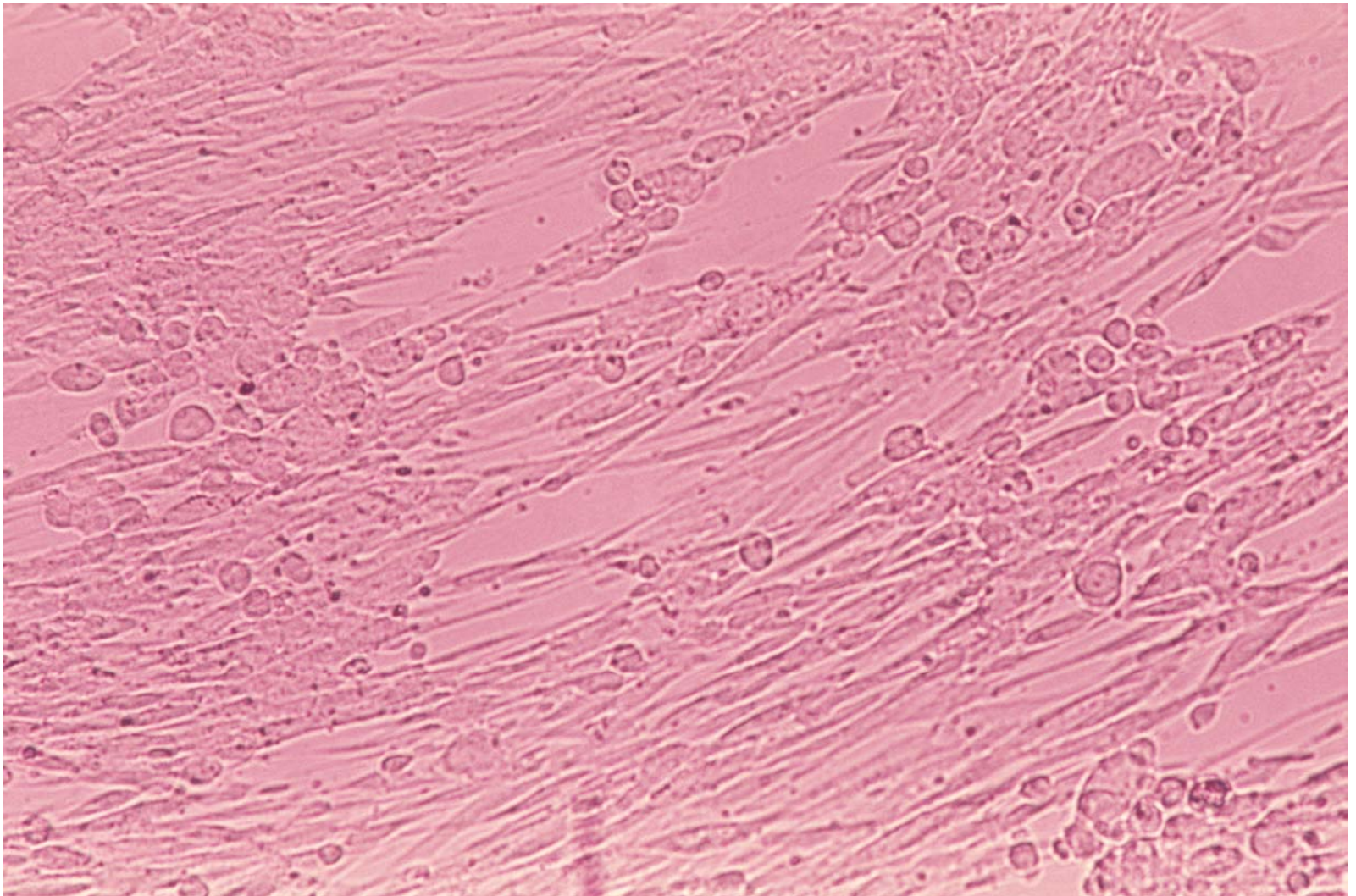
→ **Tampone della lesione** (terreno di trasporto per virus)

- inoculo su colture cellulari (fibroblasti embrionali umani, linee continue)
- effetto citopatico 24-48 ore
- diagnosi differenziale con altri agenti virali

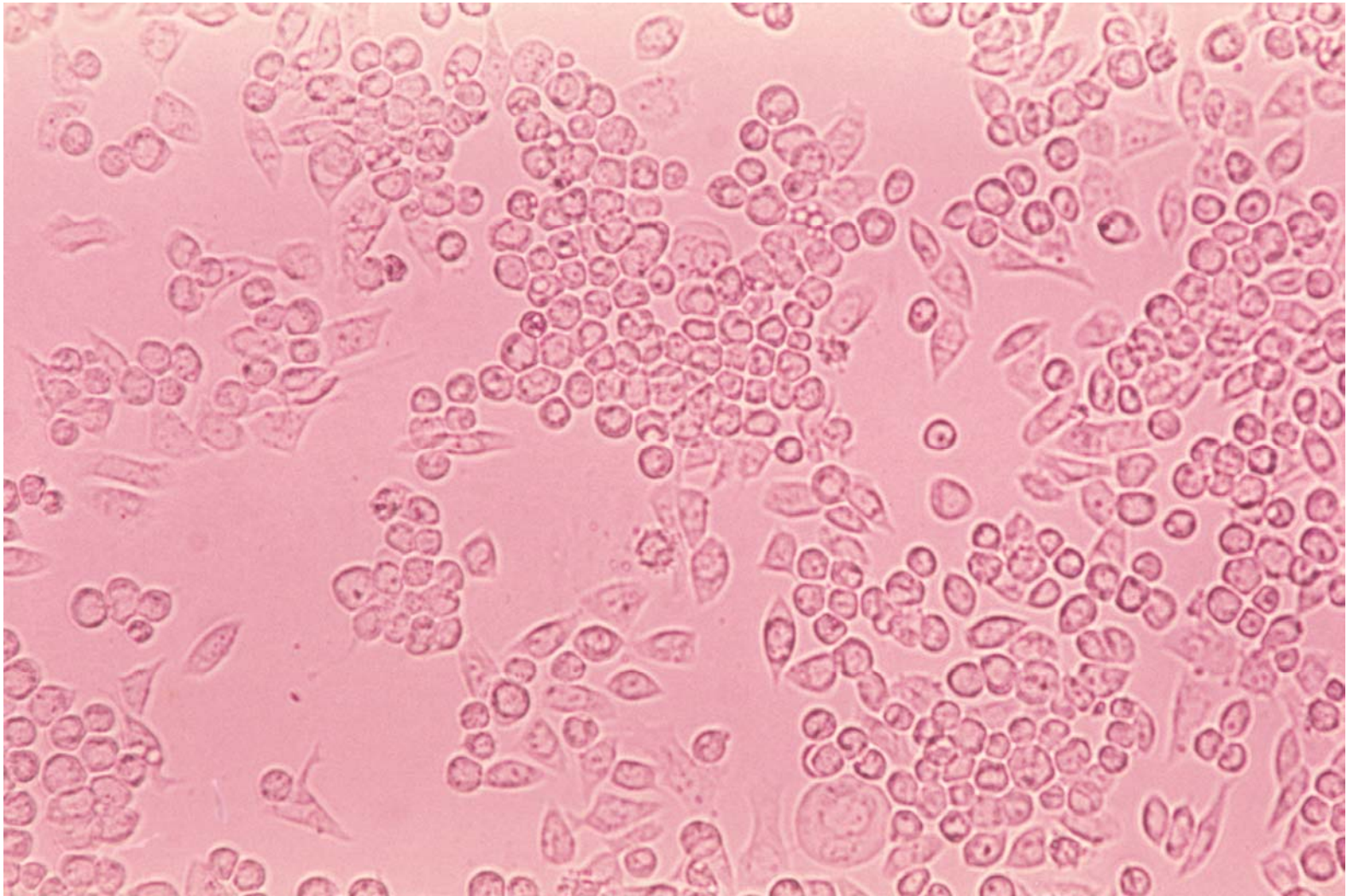
## Fibroblasti embrionali umani



## Fibroblasti embrionali infettati da HHV-1



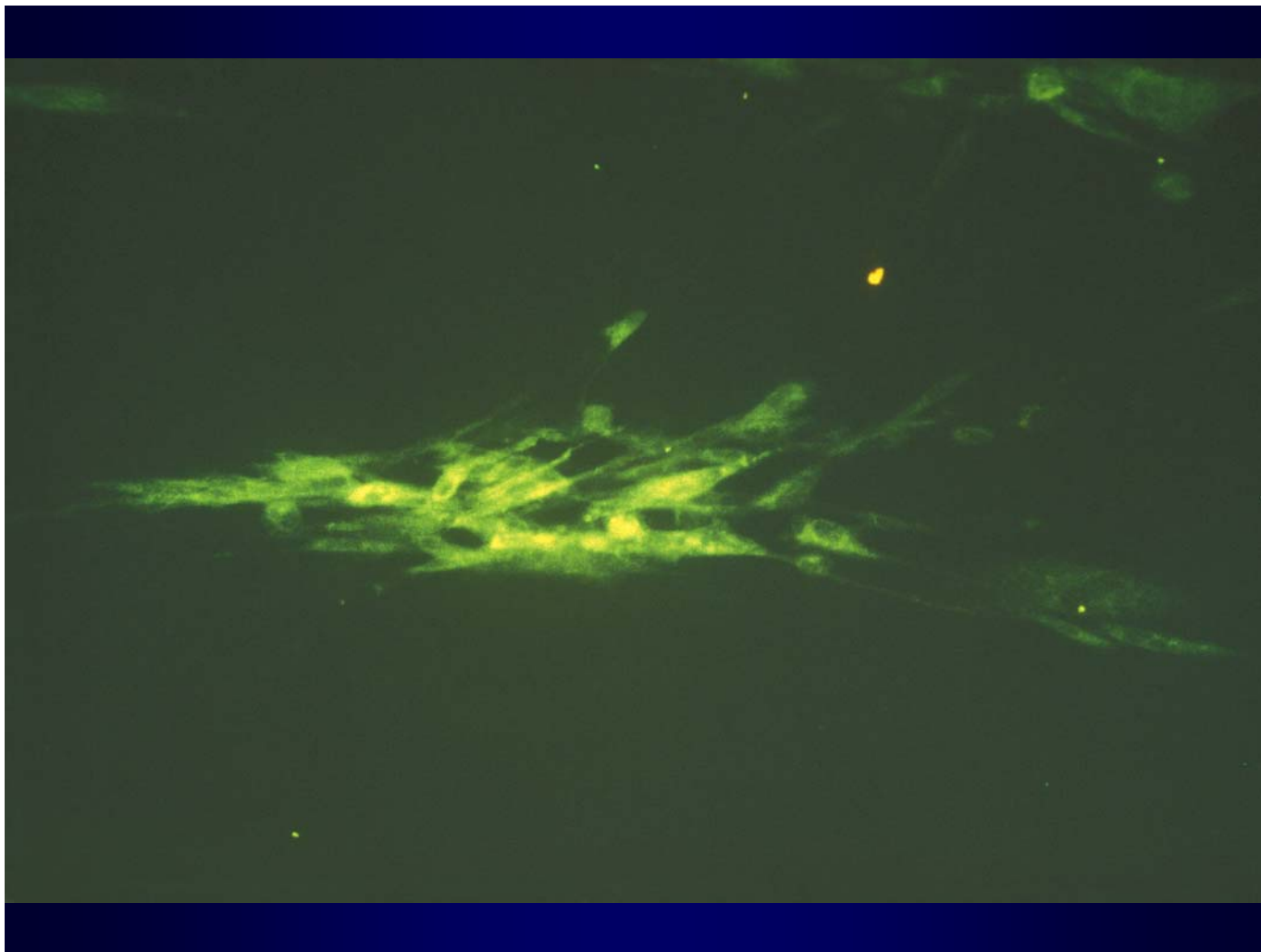
## Linea cellulare VERO infettata da HHV-1

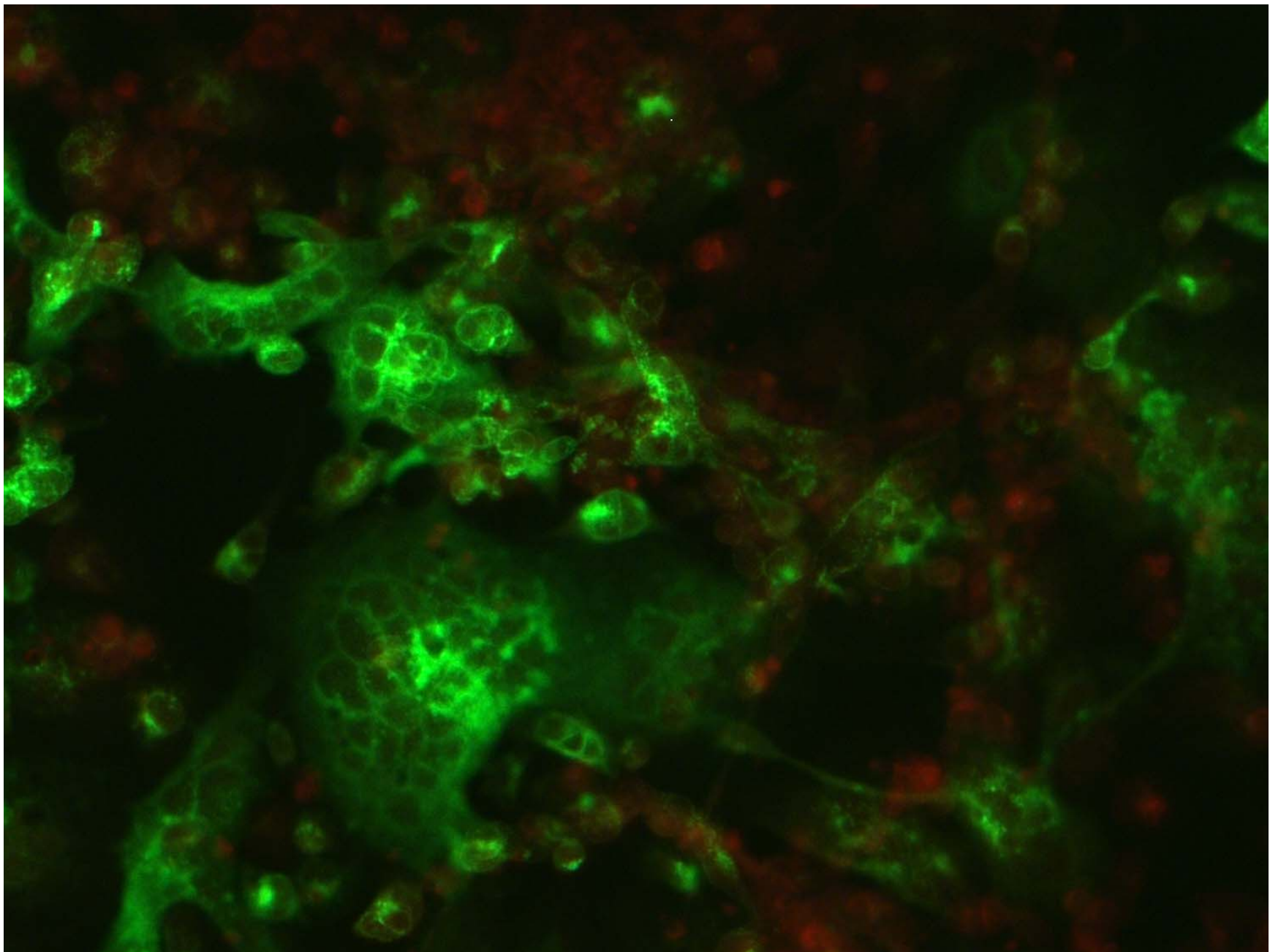


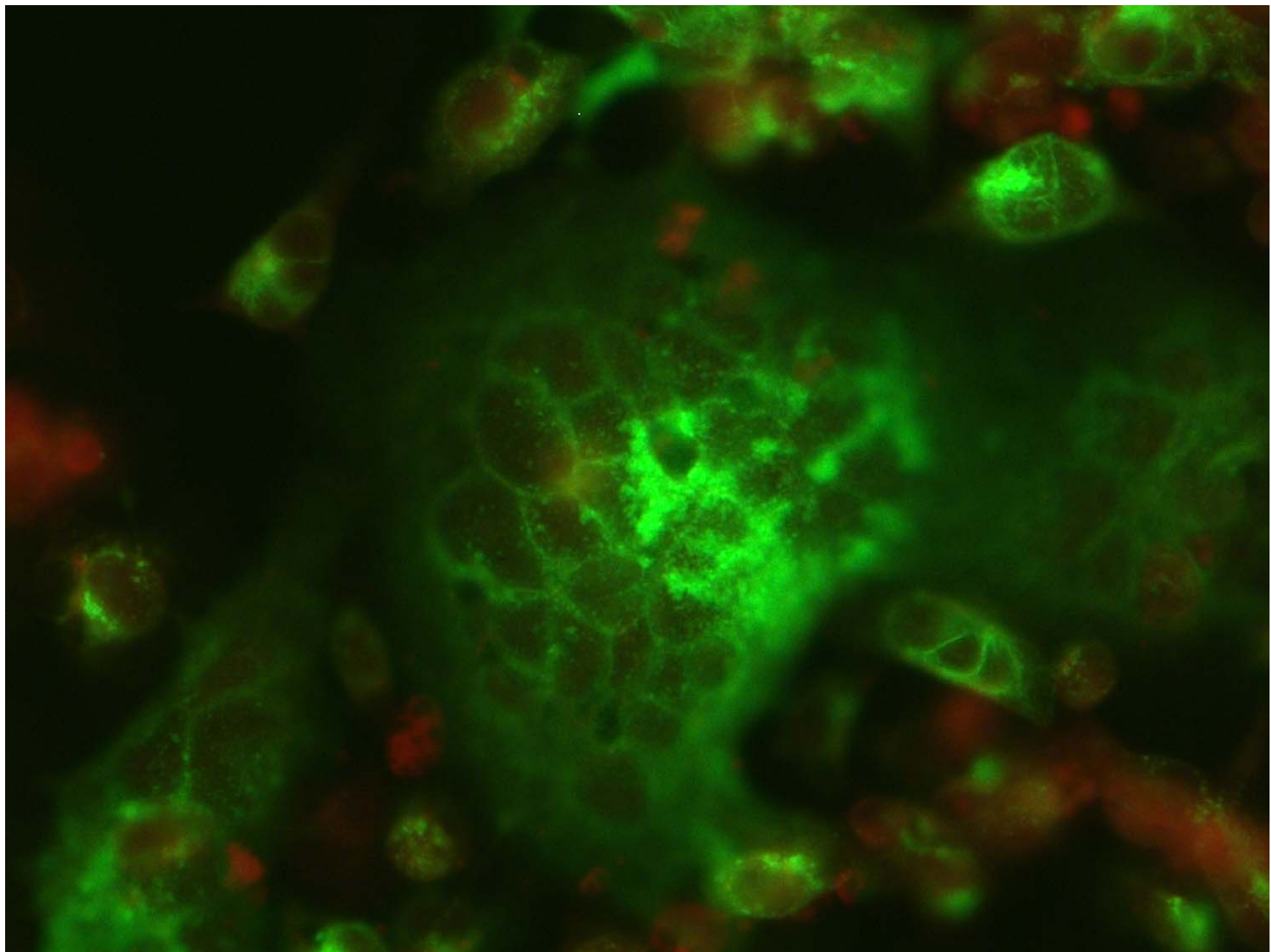
# Identificazione virale

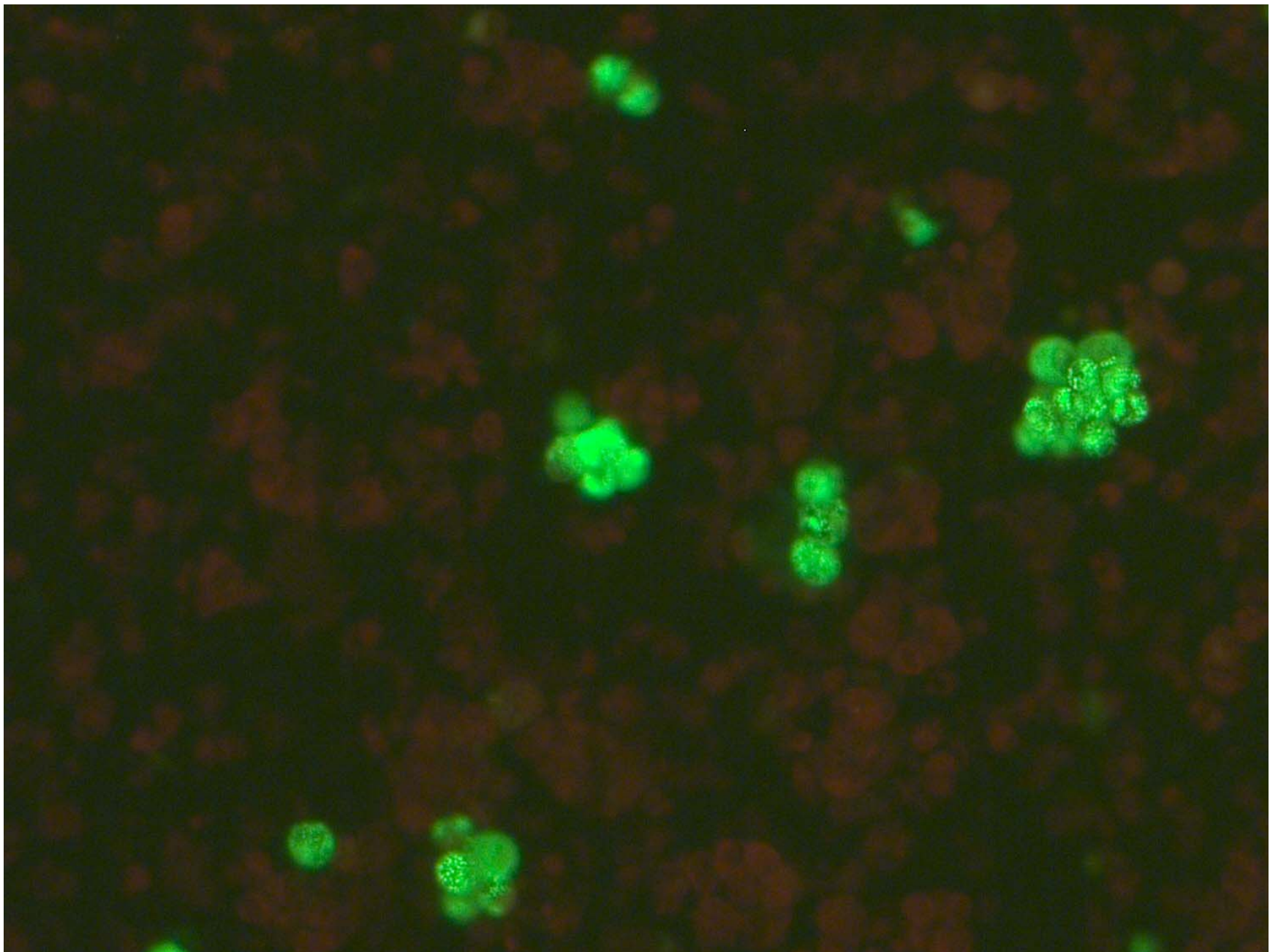
- **Immunocolorazione** del tappeto cellulare o delle cellule infettate (previa tripsinizzazione) con **anticorpi monoclonali specifici**

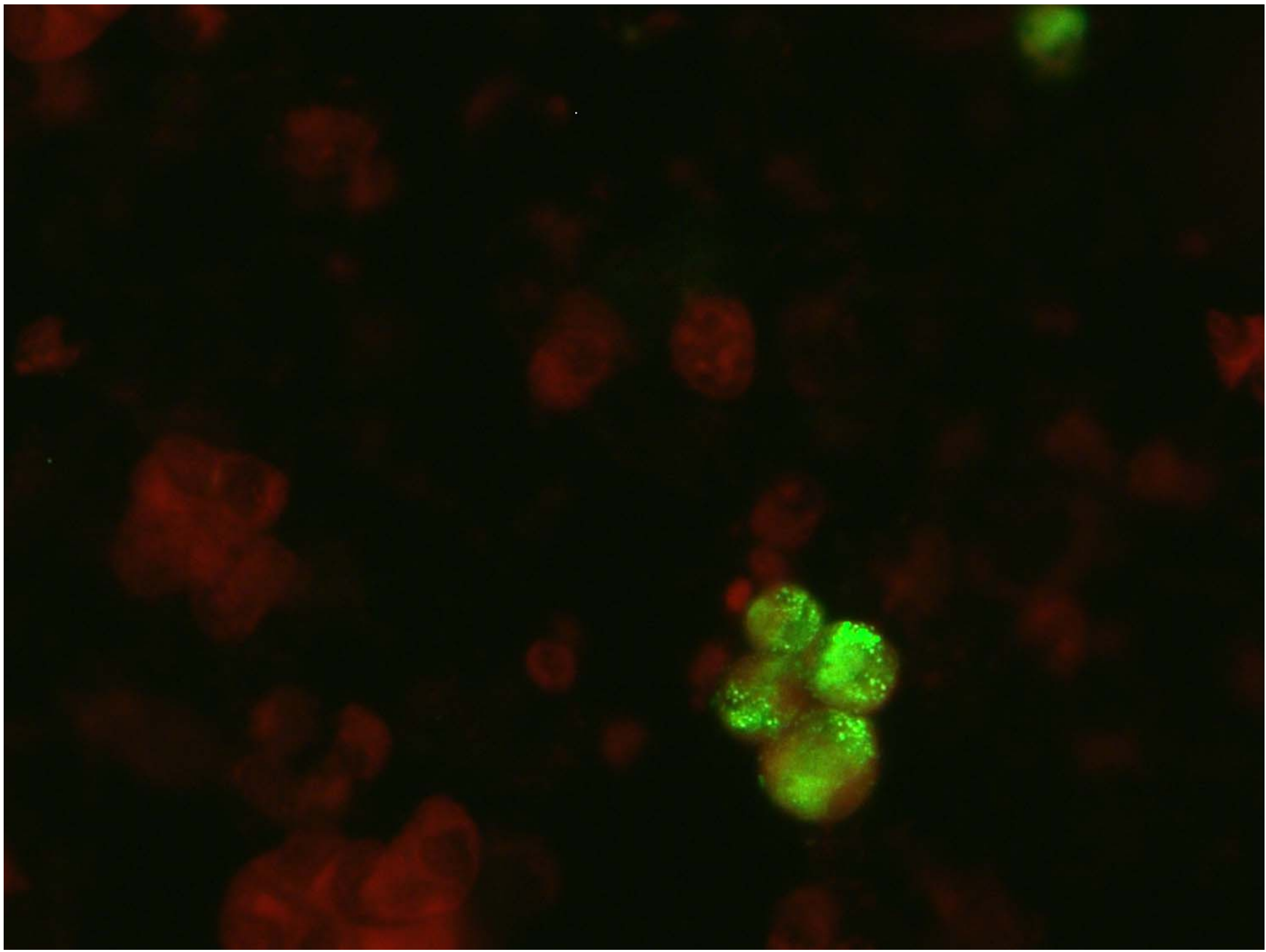
## Identificazione virale di HHV-1 su coltura di fibroblasti embrionali umani









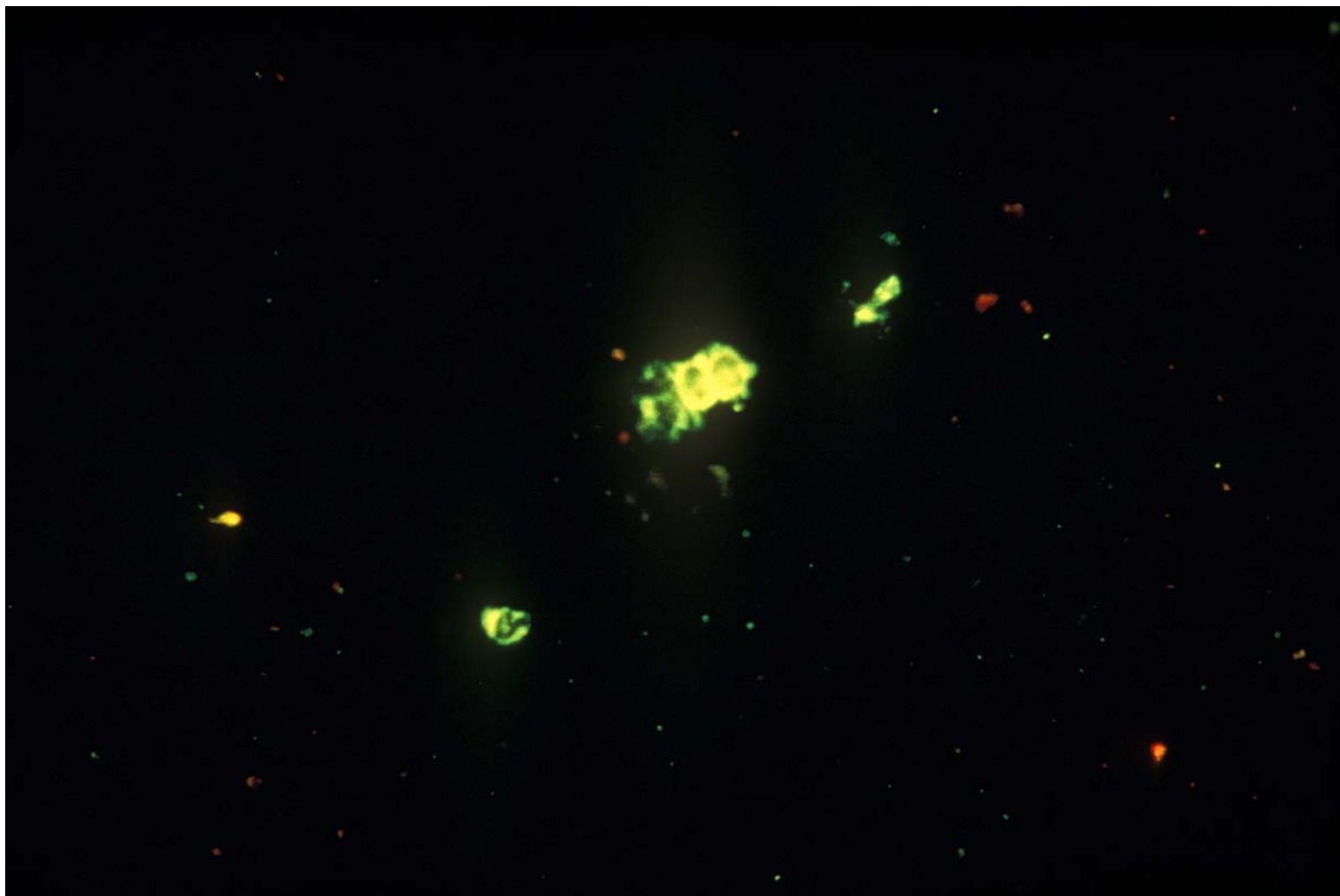


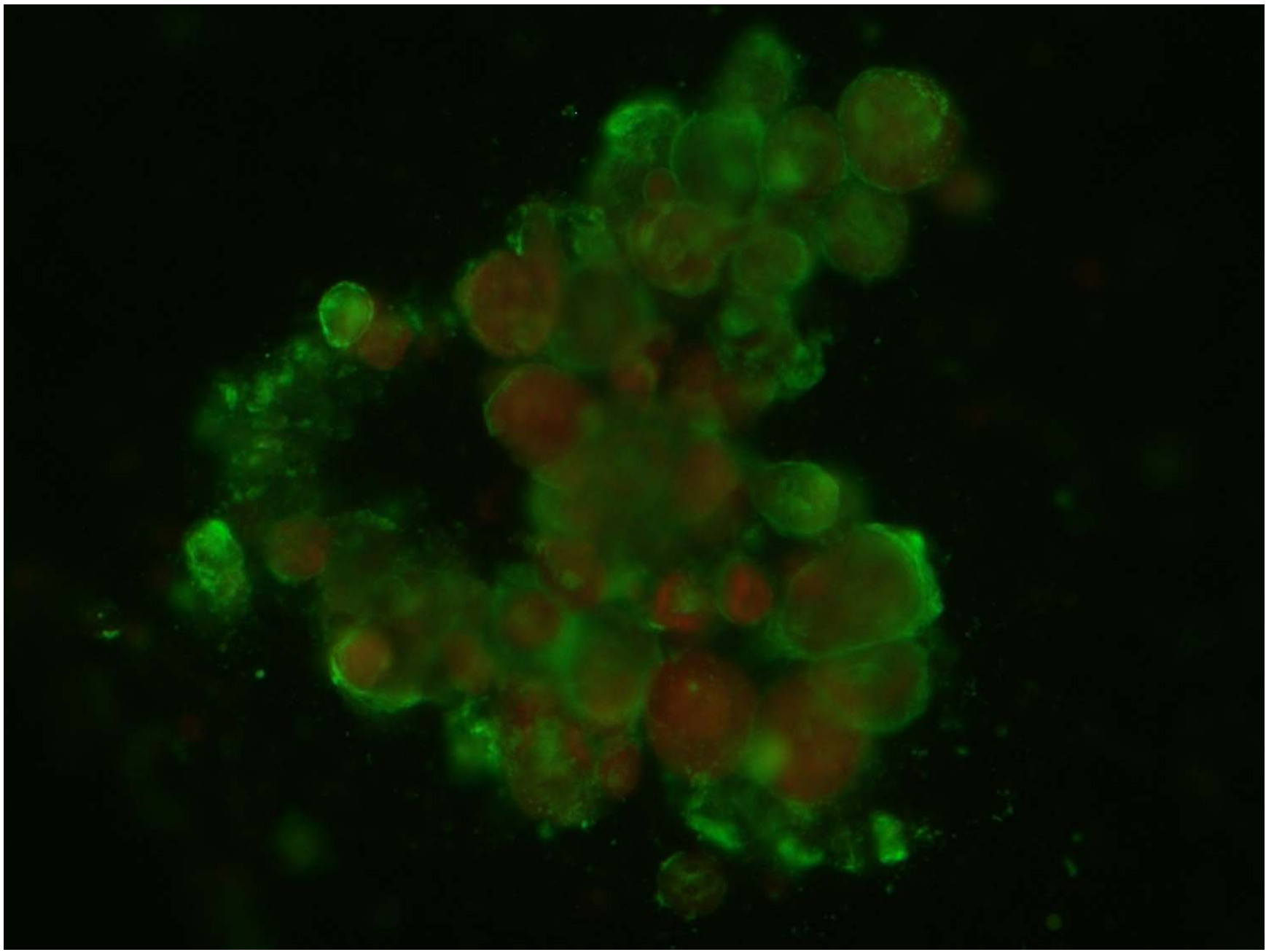
# Ricerca diretta di antigeni virali

→ *Scraping* : raccolta di cellule infettate alla base della lesione

- immunocolorazione con anticorpi monoclonali herpesvirus specifici
- esito in 1-2 ore
- possibile diagnosi differenziale con altri agenti virali (varicella-zoster)

## Evidenziazione diretta di HHV-2 da *scraping* vescicolare





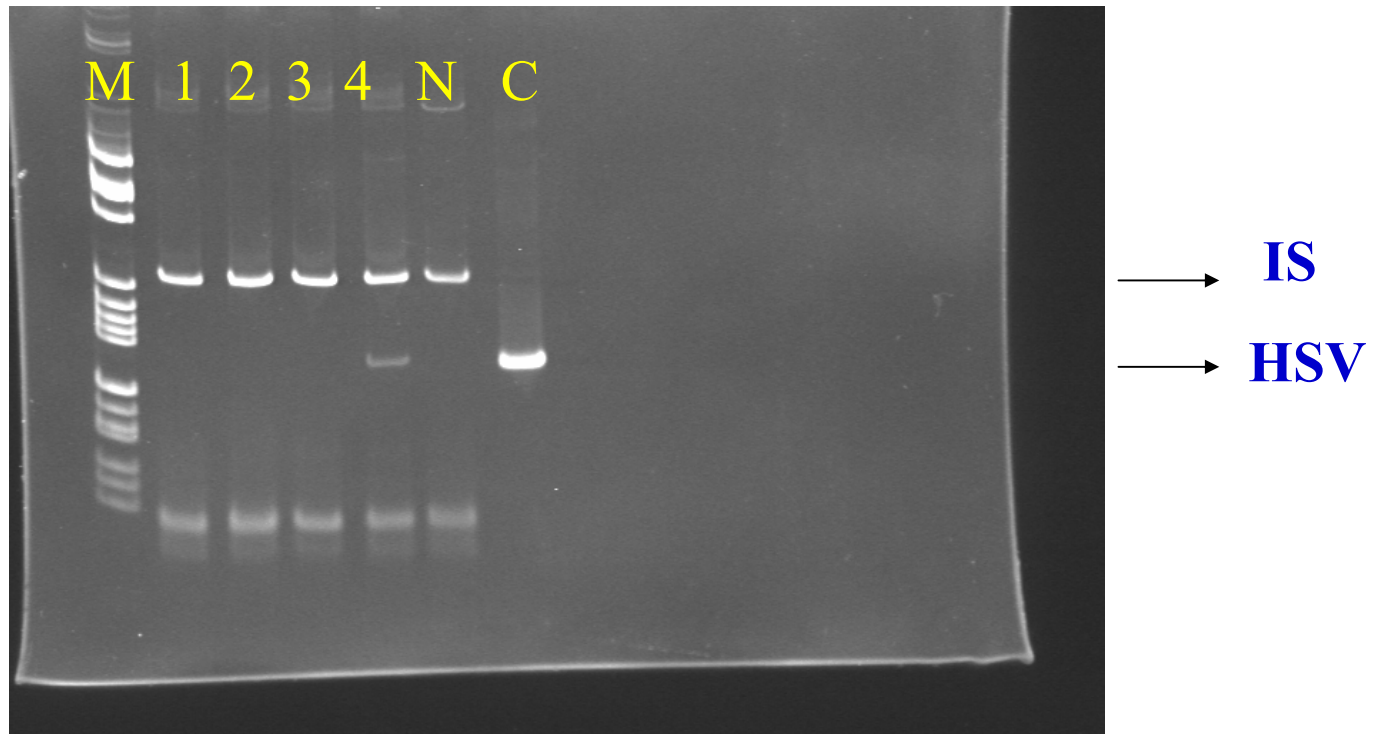
# Ricerca di DNA virale

→ Tampone per virus

→ umor acqueo o vitreo

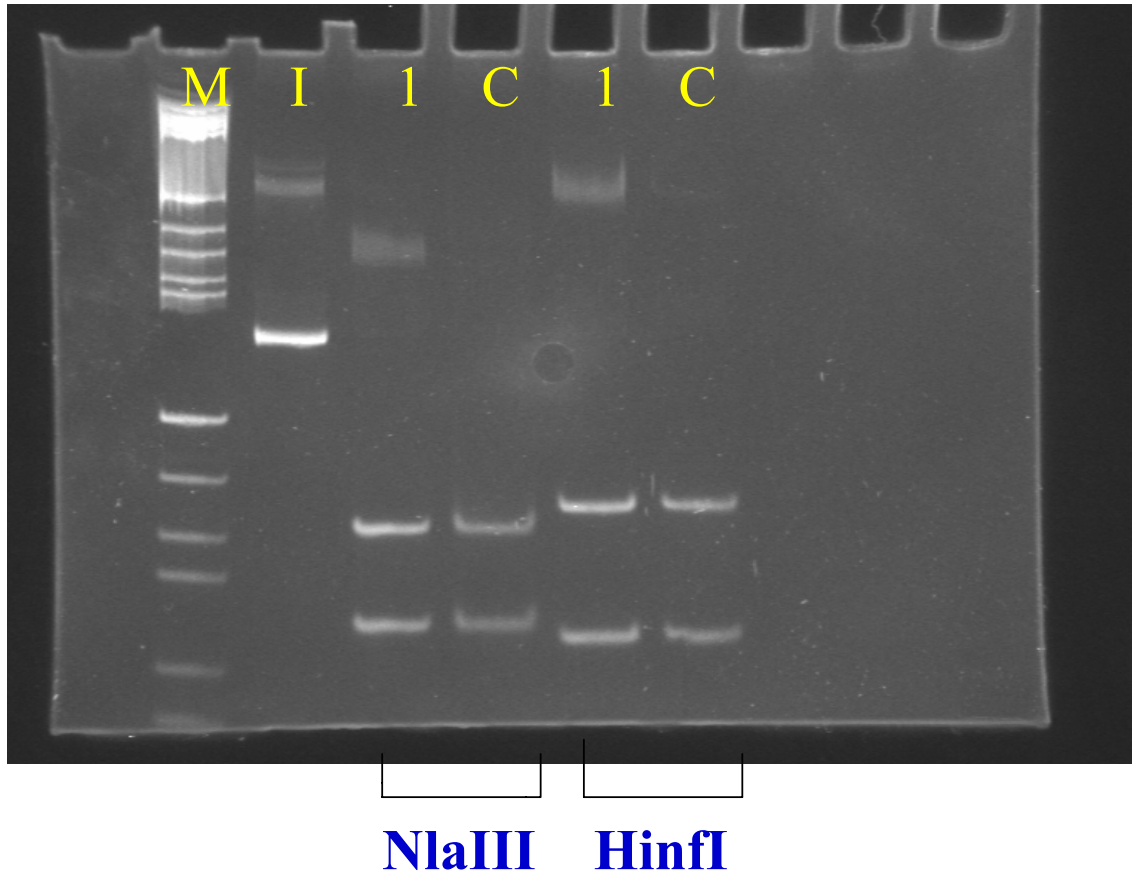
- ricerca del DNA virale (gene polimerasi)
- esito in 6-8 ore
- tipizzazione del genoma virale mediante digestione enzimatica dei prodotti di amplificazione (RFLP)
- diagnosi differenziale

## Herpes Simplex Virus DNA (gene DNAPolimerasi)



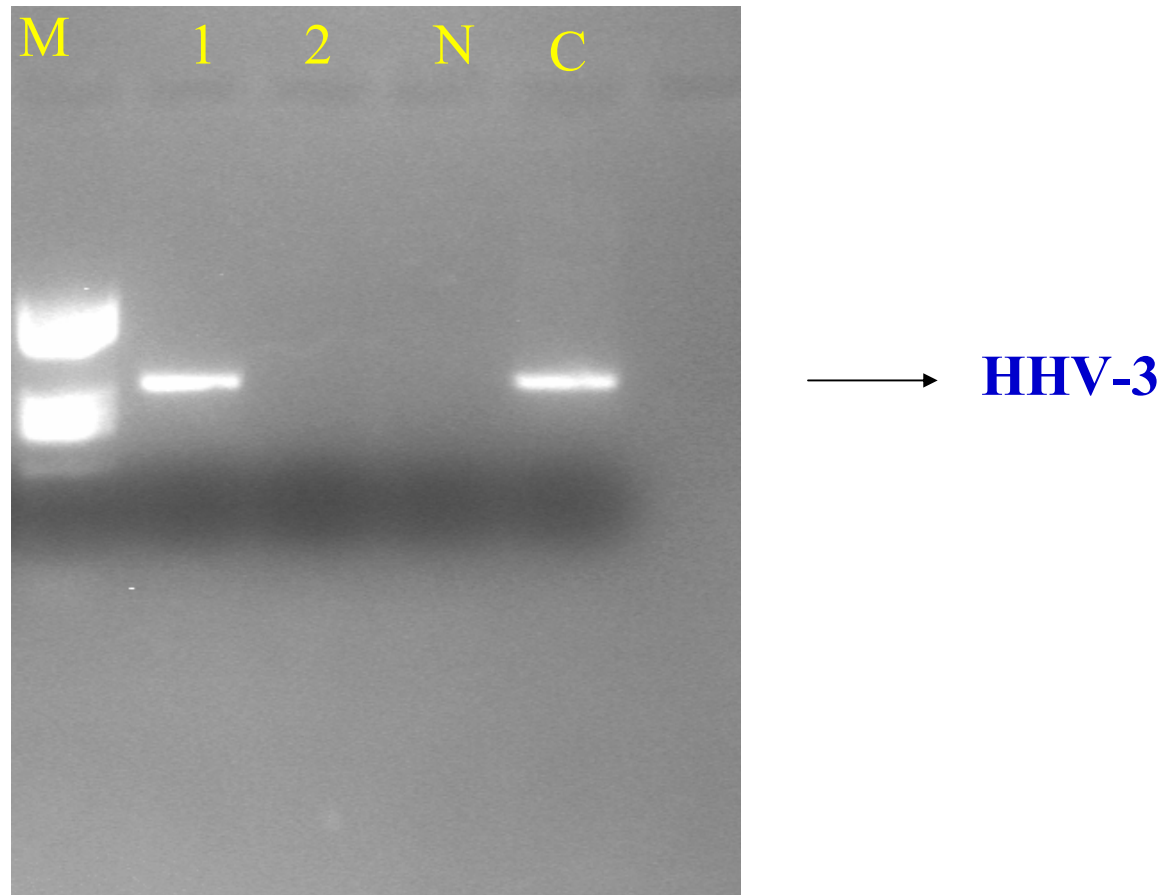
M, marcatore di peso molecolare; N, controllo negativo; C, controllo positivo; IS, controllo interno di amplificazione; HSV, herpes simplex virus.

## Genotipizzazione di HHV -1 DNA (RFLP)



M, marcatore di peso molecolare, I, prodotto di PCR non digerito; C, controllo HHV-1 RFLP; restriction fragment length polymorphism assay

## Determinazione di HHV-3 (VZV) DNA (gene 29)

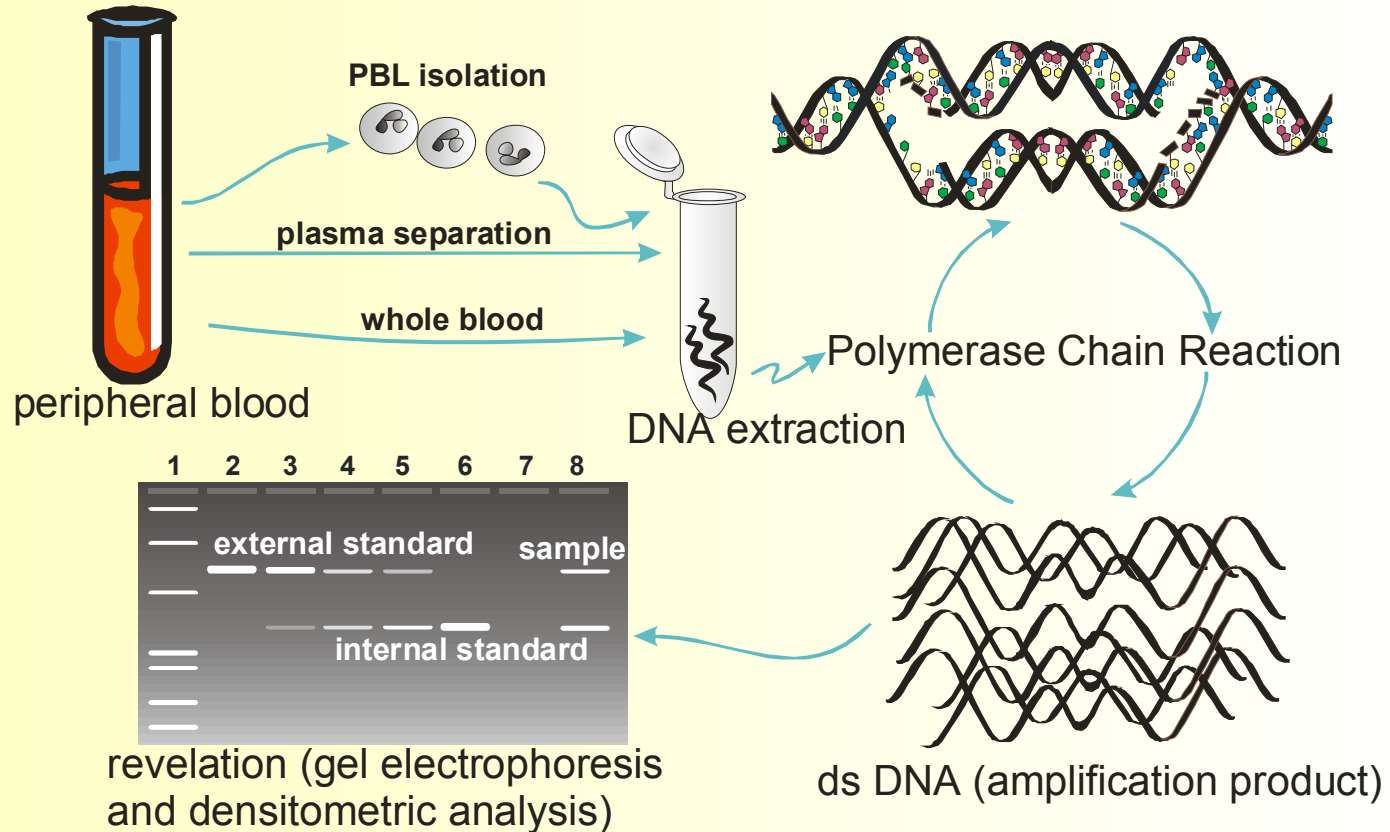


M, marcatore di peso molecolare; N, controllo negativo; C, controllo positivo,

# Determinazione di HHV-5 (CMV) DNA (gene IE1)

## DNAemia

Quantification of HCMV DNA in PBL, plasma or whole blood



# Conclusioni

- Nel caso di sospetta infezione virale inviare sempre il campione clinico opportuno al laboratorio di virologia
- La diagnosi eziologica è essenziale per la terapia