

***L* la détection immunocytochimique de la phosphoprotéine 65 kDa du cytomegalovirus humain dans les noyaux des polynucléaires du sang périphérique : un marqueur de réactivation et de dissémination**

La détection immunocytochimique de la phosphoprotéine pp65 du tégment du CMVH dans les noyaux des polynucléaires du sang périphérique des patients atteints d'infection systémique est un test de grande spécificité et sensibilité ($\geq 90\%$) dont la positivité est corrélée à l'infection symptomatique. Elle facilite le suivi des patients recevant une chimiothérapie anti-CMV. La détection de la virémie par isolement du CMVH, de l'ADNémie par amplification avec PCR, de l'antigénémie pp65 par immunocytochimie et de l'expression des gènes CMV très précoces dans les différents types leucocytaires, suggère que les polynucléaires sont des sites primordiaux de l'infection initiale à CMVH, de sa réactivation et de sa dissémination hématogène.

Valérie Caro

Assistante technique, Clonatec, département Biosoft, 60, rue de Wattignies, 75580 Paris Cedex 12, France.

Yvonne Pérol

Professeur, attaché consultant. Service central de bactériologie-virologie-hygiène, hôpital Saint-Louis, 1, avenue Claude Vellefaux, 75475 Paris Cedex 10, France.

TIRÉS A PART

Y. Pérol.

m/s n° 6-7 vol. 9, juin-juillet 93

La pathologie des infections à cytomegalovirus humain (CMVH) est observée dans trois circonstances principales : l'infection congénitale du nouveau-né ; les allogreffes de moelle, de rein, de cœur, de foie ; les immunodéficiences acquises dont le SIDA.

Toute immunodéficiency expose l'individu infecté à une maladie systémique. Une virémie précède le passage de l'infection asymptomatique à l'infection symptomatique ; celle-ci est révélée par l'isolement du CMVH par coculture de la fraction leucocytaire d'un échantillon de sang avec des fibroblastes humains maintenus en monocouche *in vitro* ; elle est quantifiée en rapportant le nombre de leucocytes formant centre infectieux (LFCI) au nombre de leucocytes inoculés ; ceux-ci sont révélés par l'apparition d'une plage de lysc ou, lors du premier cycle de réplication, par la détection d'antigènes très précoces (IEA) par immunocytochimie, ou d'acides nucléiques viraux par hybridation *in situ*. Récemment, de nouvelles méthodes de détection de la virémie ont été développées et comparées à cette méthode de référence (Tableau I).

Des anticorps monoclonaux, dirigés contre une protéine antigénique du CMVH, la phosphoprotéine de 65kDa, révèlent sa présence dans les noyaux des polynucléaires du patient virémique ; le nombre de polynucléaires marqués rapporté au nombre de polynucléaires testés quantifie cette antigénémie.

Des sondes nucléiques spécifiques du

CMVH détectent les copies génomiques dans les leucocytes par hybridation *in situ* ou après amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) : l'ADNémie est exprimée en équivalents génomes pour n cellules traitées ou en picogrammes, femtogrammes voire attogrammes d'ADN-CMV par microlitre de sang.

L'antigénémie pp65 outil du diagnostic et du suivi thérapeutique

La méthode la plus simple et la plus rapide pour détecter l'infection disséminée et assurer le suivi d'une chimiothérapie est la recherche de l'antigénémie pp65. Elle est à la portée des laboratoires ne disposant pas de cultures cellulaires et ne nécessite pour tout appareillage qu'une cytocentrifugeuse : (1) les polynucléaires de 5 à 10 ml de sang hépariné sont séparés par sédimentation en présence de dextran ; (2) les hématies contaminant la fraction polynucléaire sont éliminées par lyse rapide à l'eau distillée ou au chlorure d'ammonium ; (3) des spots de 200 000 cellules sont déposés sur lame par cytocentrifugation ; (4) une fixation par le formaldéhyde est suivie d'une perméabilisation des membranes par le Nonidet P40 ; (5) celle-ci permet l'accès des molécules d'un anticorps monoclonal anti-pp65-68 dans le noyau des polynucléaires ; (6) la liaison de l'anticorps anti-pp65-68 à l'antigène viral, quand il est présent, est révélée par un conjugué anti-IgG de souris.

Tableau I			
MÉTHODES DE DÉTECTION DU CMVH DANS LES LEUCOCYTES DU SANG PÉRIPHÉRIQUE			
Cibles	Techniques	Outils - Délai	Sensibilité
Virémie pouvoir infectant des leucocytes	Coculture centrifugée 45 min à 37 °C (10 % SFB)	Fibroblastes humains cultivés en monocouche > 48 heures	1 LFCI, ou IEA (+) ou ADN (+)/ <i>n</i> leucocytes inoculés <i>n</i> ≈ 10 ⁶
ADNémie ARNémie séquences conservées sans homologie avec : - autres virus herpétiques - génome humain	Hybridation : <i>Dot-blot</i> <i>In situ</i> PCR	Sondes nucléiques <i>Eco</i> R1J (exon 4) du gène IE1 <i>Hind</i> III/L gène UL83 → pp65 < 48 heures	< 1 LFCI parmi 106 20 à 40 génomes 0,01 picog à 3 attog ADN-CMV
Antigénémie Protéine du tégument viral pp65-68 dans les noyaux des polynucléaires	Immunoenzymologie Immunofluorescence	Anticorps monoclonaux C10-C11, 1C3, F6b... 3 heures	1 polynucléaire/ <i>n</i> polynucléaires testés <i>n</i> ≈ 2.10 ⁵ . <i>x</i> spots

LFCI : leucocyte formant centre infectieux ; IEA : immediate early antigen ; SFB : sérum foetal de bovidé.

Un seul noyau marqué suffit pour affirmer l'antigénémie (figure 1), mais il est possible d'en compter jusqu'à 2 000 dans le spot. Quelques cellules marquées sont des cellules mononucléées infectées. Quand les populations mononucléées et polynucléées sont testées séparément, toutes les antigénémies détectées dans la fraction mononucléée le sont également dans la fraction polynucléée, dans laquelle 80 % des cellules marquées sont décomptées.

C'est en 1988 que Win van der Bij dans l'équipe hollandaise de T. H. The à Groningen a développé cette technique [1, 2]. Les anticorps monoclonaux utilisés par ces auteurs, nommés C10-C11, étaient censés reconnaître une protéine de 70kDa dont il était dit (et c'était une erreur) qu'elle était la protéine très précoce majeure de 72kDa. De 1988 à 1991, de nombreux laboratoires se sont efforcés de mettre au point cette technique sans y parvenir car aucun anticorps monoclonal dirigé contre les antigènes très précoces ne révèle d'antigène en abondance dans les polynucléaires des patients virémiques. En fait, l'antigène révélé par les anticorps C10-C11 est la phosphoprotéine pp65, constitutive du tégument du virion [3]. G. Revello, de l'équipe italienne de Gerna à Pavie, a montré que dans un panel de sept

anticorps monoclonaux dirigés contre la pp65, seuls quatre d'entre eux reconnaissent la pp65 dans les polynucléaires au niveau de trois épitopes différents dont deux sont similaires à ceux reconnus par C10 et C11 [4]. Le choix des anticorps utilisés est donc un élément essentiel de l'optimisation de la technique ; on peut utiliser indifféremment le *pool* C10-C11, le F6b [5], le 1C3 [4] ; un mélange d'anticorps monoclonaux correspondant aux différents épitopes exprimés dans les poly-

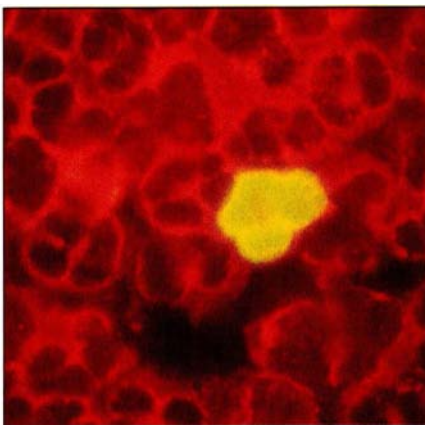


Figure 1. Polynucléaire marqué par un anticorps monoclonal anti-pp65 : antigénémie.

nucléaires est préférable [6]. D'autres paramètres contribuent au bon rendement de la recherche d'une antigénémie : (1) l'absence de délai entre le prélèvement de sang, la séparation des polynucléaires et la préparation des lames ; (2) le type de fixation : le méthanol est à rejeter, l'acétone si on l'utilise doit être anhydre [7], le formaldéhyde, selon Randall [8], autorise le meilleur marquage [6] ; (3) la révélation en immunofluorescence détecte un plus grand nombre de noyaux qu'une révélation immunoenzymatique [6, 9], mais celle-ci est perfectible. La spécificité de la méthode est excellente, sa sensibilité équivalente ou supérieure à celle de l'isolement après culture [1, 2, 10] : les malades virémiques sont aussi antigénémiques, et vice versa, à deux types de discordances près (Tableau II) : quand les titres de la virémie ou de l'antigénémie sont proches du seuil de sensibilité de la technique [1, 10], et quand le patient est sous traitement par le ganciclovir (9 [1,3-dihydroxy-2-propoxyméthyl]guanine, DHPG) [1, 10]. La surveillance de l'antigénémie facilite le suivi des receveurs de greffe d'organe sous chimiothérapie anti-CMVH [11-14]. La valeur prédictive positive de l'antigénémie est comparable à celle de la virémie ; au cours du suivi des

patients, le nombre de polynucléaires marqués augmente puis décroît quand l'évolution est favorable ; la période antigénémique (délai moyen d'apparition 31 jours après la greffe d'organe) est aussi celle de la virémie (délai moyen d'apparition 33 jours) et toutes deux encadrent la symptomatologie [1, 15] dont l'apparition est corrélée aux antigénémies, révélant plus de 50 polynucléaires infectés pour 2.10^5 cellules testées [16]. La recherche d'une ADNémie par amplification de l'ADN extrait des polynucléaires du sang périphérique est d'une valeur prédictive moins intéressante : la détection de 0,1 picogramme d'ADN-CMVH extrait des granulocytes précède en moyenne de 8 à 10 jours l'apparition de l'antigénémie ou de la virémie, mais, si elle reste isolée, elle n'est pas associée à une infection symptomatique [16]. Au cours d'une évolution favorable, les recherches se négativent dans l'ordre : virémie-antigénémie-ADNémie, cette dernière persistant parfois de façon prolongée [16-18].

Chez les patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine et le SIDA, les recherches d'antigénémie ont confirmé les données apportées par l'étude de la virémie, c'est-à-dire son apparition dans les phases tardives de l'évolution, quand le chiffre des CD4 est inférieur à 50 [19] ; une antigénémie est détectable dans les cellules d'un liquide céphalo-rachidien inflammatoire, au cours de manifestations neurologiques centrales, même en l'absence d'antigénémie (M. G. Revello, communication personnelle).

La phosphoprotéine 65-68kDa du tégument du CMVH

Comme tous les virus de la famille herpétique, les CMVH sont des virus enveloppés dont la nucléocapside est entourée d'un tégument qui la relie à l'enveloppe. Ce tégument contient trois phosphoprotéines que l'on peut différencier sur la base de leur comportement électrophorétique en gel dénaturant : la protéine matricielle de bas poids moléculaire (*lower matrix protein*) de 65kDa ; la protéine matricielle de haut poids moléculaire (*upper matrix protein*) de 71kDa et la phosphoprotéine basique de 150kDa.

m/s n° 6-7 vol. 9, juin-juillet 93

Tableau II			
EXEMPLE DE DISCORDANCES VIRÉMIE/ANTIGÉNÉMIE CMVH			
Patient	Virémie (coculture) n noyaux IEA (+) (7 ml de sang)	Antigénémie	
		n noyaux pp65 (+) (2.10^5 leucocytes)	Anticorps monoclonal/ Type de fixation
LOP n° 1	4	- 3 4	F6B/Acétone 1C3/Form NP40 F6B/Form NP40
RIC n° 2	9	- 12 13	F6B/Acétone 1C3/Form NP40 F6B/Form NP40
FAI n° 3	1	- 1	1C3/Form NP40 1C3/Form NP40
BOU n° 4	0	58	1C3/Form NP40

n°s 1 et 2 : la fixation par le formol suivie de perméabilisation au NP40 est préférable à la fixation par l'acétone.

n° 3 : l'exploration de deux spots, soit 4.10^5 polynucléaires, a été nécessaire pour démontrer cette antigénémie à faible titre.

n° 4 : ce patient traité par le DHPG reste fortement antigénémique alors que la virémie est négative.

IEA : immediate early antigen.

La pp65, décrite également sous les dénominations de gp66-69, gp64, pp68, ICP27, constitue environ 70 % des corps denses ; ces structures volumineuses (350 à 500 μ m de diamètre), arrondies ou ovalaires, enfermées dans les saccules de l'appareil de Golgi, s'accumulent avec les virions, auxquels ils fournissent leurs enveloppes au sein de l'inclusion cytoplasmique péricentriolaire de la cellule cytomégaly à partir de la 72^e heure de l'infection [20] (figure 2). Les gènes des deux phosphoprotéines pp65 et pp71 ont été positionnés en tandem dans le segment unique long du génome (fragment *Hind* III Lbc de la souche AD-169 (*map unit* 0,510 à 0,530), et séquencés [21]. Le gène UL82 code pour la pp71 ; celle-ci est un transactivateur puissant du promoteur du gène de la protéine majeure très précoce [22]. Le gène UL83 code pour la pp65-68, sous le contrôle d'un promoteur activé par les protéines très précoces [23] ; bien qu'il exprime des transcrits de 4 kb dès la 3^e heure de l'infection, ceux-ci ne sont abondants qu'après la réplication de l'ADN [24] : la protéine apparaît

d'abord dans le noyau ; elle n'est abondante et cytoplasmique qu'après 24 heures d'infection. Cette phosphoprotéine est une thréonine-sérine kinase, indépendante de l'AMP cyclique qui utilise l'ATP et le GTP comme donneurs de phosphate à un pH optimal de 7,8 [25].

Ces protéines du tégument viral sont introduites dans les cellules en tant que constituants des virions infectants. La pp65, détectée dans le noyau des polynucléaires, pourrait être la protéine apportée par l'*inoculum*, après phagocytose de virions et de corps denses ou endocytose relayée par un récepteur. Dans les fibroblastes humains infectés *in vitro*, la pp65 est révélée dans le noyau dès la première heure de l'infection. Il est probable que la migration de cette protéine dans le noyau résulte d'un transport actif, c'est-à-dire que la pp65 est reconnue par un récepteur, ce qui suppose la présence sur la pp65 d'un signal de localisation nucléaire (NLS) comme cela a été décrit pour l'antigène T du SV40 ou la protéine E1A des adénovirus, ou l'apparition d'un signal NLS après une modifica-

tion conformationnelle qui pourrait être une phosphorylation. Deux NLS putatifs ont été reconnus dans l'extrémité carboxyterminale de la pp65 dont les séquences génomiques apparaissent responsables du transport nucléaire [26]. La translocation nucléaire de la pp71 n'est pas démontrée.

L'infection des leucocytes du sang périphérique

Comme toute infection due à un virus de la famille herpétique, la primo-infection à CMVH est suivie d'une infection définitive autorisant des réactivations et des réinfections. Les types cellulaires responsables de la latence sont incomplètement identifiés et les mécanismes moléculaires gouvernant le caractère abortif semi-permissif ou productif de l'infection de chaque type cellulaire pratiquement inconnus. L'infection des leucocytes du sang périphérique désigne les cellules du système hématopoïétique comme l'une des cibles de l'infection latente.

Le sang non déleucocyté d'environ 10 % des donneurs bien portants, ayant fait leur primo-infection, transmet le CMVH à leur receveur (Tableau III) alors que le sang déleucocyté n'est pas contaminateur. Le pouvoir infectant de ces leucocytes n'est pas démontrable par coculture avec des fibroblastes humains, mais la présence d'ADN-CMV ainsi que celle de transcrits ARN a été montrée par hybridation *in situ* dans 0,03 à 2 % des leucocytes mononucléés de donneurs séropositifs asymptomatiques, 2,4 % étant des T4 et 0,8 % des T8 [27]. L'amplification génique par PCR a démontré la présence d'ADN-CMV principalement dans la population non T [28] de la fraction mononucléée [29]. Elle n'a pas été recherchée dans la fraction polynucléaire isolée du sang de donneurs bien portants, bien que les transfusions de granulocytes, pratiquées après greffe de moelle, se soient montrées particulièrement infectantes [30]. Une antigénémie pp65 n'a pas été recherchée chez le bien portant. L'expression de gènes très précoces (IE) semble fréquente dans les cellules épithéliales des parois capillaires des tissus glandulaires (rein, foie), ainsi que dans les lymphocytes et les macrophages spléniques [31].

Dans le sang des patients souffrant d'une infection systémique à CMVH, la densité de l'infection des différents types leucocytaires a été quantifiée (Tableau IV). Le caractère infectant est principalement lié aux polynucléaires ; le titre de la virémie varie de moins de 1 à 2 000 LFCI pour 10^6 leucocytes cocultivés avec des fibroblastes humains. La sensibilité optimale de l'isolement est atteinte avec l'inoculation de $4 \cdot 10^6$ leucocytes [32] ; quand le titre de la virémie est faible, l'infectivité des cellules mononucléées n'est que de 0,04 pour 10^6 cellules mononucléées : des monocytes stimulés et des lymphocytes T4 activés répliquent le CMVH [33]. En phase préterminale chez le grand immunosupprimé, de

grandes cellules cytomégaliqes exprimant des antigènes très précoces sont observées dans le sang périphérique (M. C. Mazeron, communication personnelle).

L'antigénémie pp65 détecte aisément 10^3 à $4 \cdot 10^3$ polynucléaires infectés pour $2 \cdot 10^5$ à $4 \cdot 10^5$ polynucléaires testés et seulement quelques cellules mononucléées qui sont des monocytes macrophages. La présence de l'antigène très précoce majeur p72 dans les polynucléaires et les monocytes est beaucoup moins importante et plus inconstante [34].

L'expression d'ARN transcrits de la région génomique très précoce IE a été démontrée dans les polynucléaires du sang périphérique après amplification

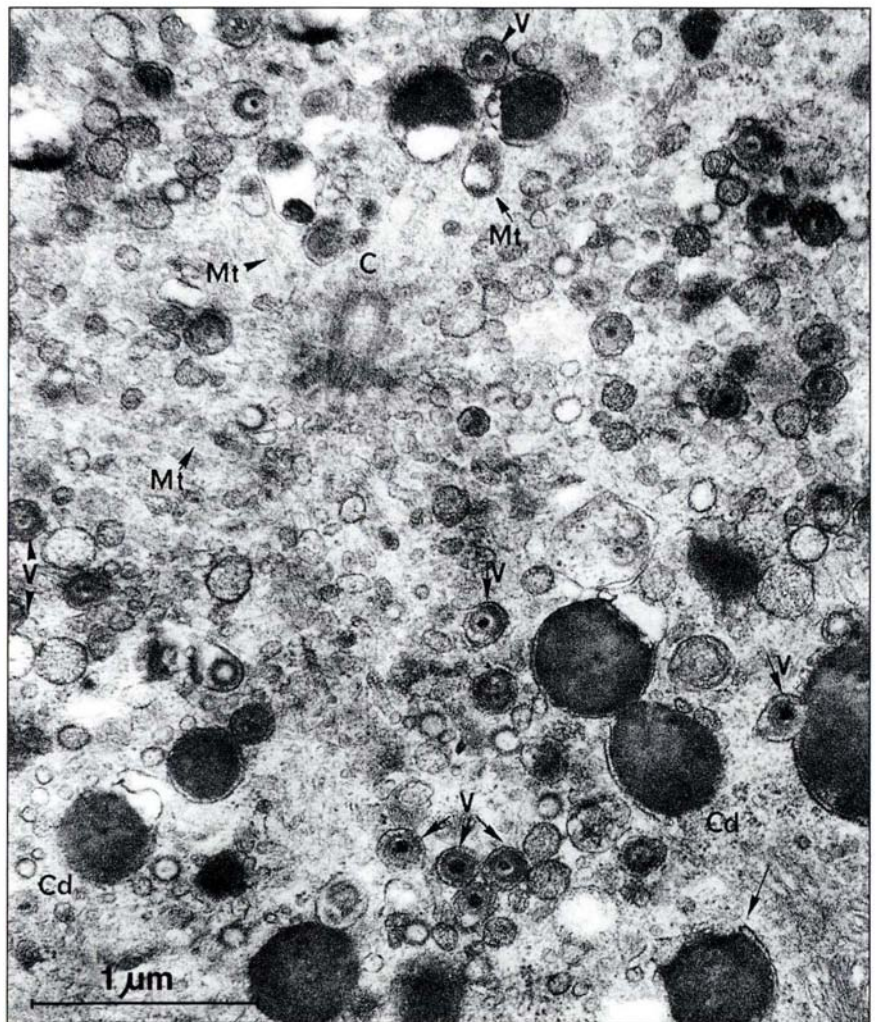


Figure 2. Inclusion cytoplasmique dans un fibroblaste humain infecté par le CMVH : virus (v) et corps denses (Cd). Mt : mitochondrie ($\times 36\ 000$.)

Tableau III				
INFECTION A CMVH DU SANG PÉRIPHÉRIQUE DE L'HOMME SÉROPOSITIF ⁽¹⁾				
	Polynucléaires	Monocytes	Lymphocytes	Sérum/Plasma
Pouvoir infectant <i>in vitro</i> <i>in vivo</i> ⁽²⁾	- +	- +/-	- +/-	- -
Antigènes très précoces (IEA) : p72	?	+/-	+/-	-
Hybridation <i>in situ</i> ADN	?	0,03 % à 2 % des leucocytes mononucléés 2,4 % sont des T4 0,8 % sont des T8		Technique non réalisable
Transcrits ARN (IE)	?	+	+	
PCR	?	+	+	-

(1) 10 % à 30 % des individus séronégatifs ont une ADNémie et ARNémie IE-CMVH leucocytaire.

(2) 10 % à 30 % des donneurs de sang séropositifs sont contaminateurs.

Tableau IV				
INFECTION A CMVH DU SANG PÉRIPHÉRIQUE AU COURS D'UNE INFECTION AIGUË (RÉACTIVATION ET DISSÉMINATION)				
	Polynucléaires	Monocytes	Lymphocytes T	Sérum/Plasma
Pouvoir infectant	++++ < 0,001 à 1 %	+ (différenciés)	+/- (T4 activés)	-(+?)
Antigènes très précoces IE pp 65-68	+ ++++ 0,001 à 1 %	+ ++ 0,001 à 0,01 %	+/- +/-	? ?
Hybridation <i>in situ</i> ADN	++++ < 1 à 10 %	++ < 0,01 à 0,1 %	+ < 0,01 %	Technique non réalisable
Transcrits ARN*	++++ 1 à 10 %	++ < 0,01 à 0,1 %	+ < 0,01 %	
Amplification génique (PCR)	++++	++++	++	++++

* : transcrits de la région génomique très précoce.

de l'ADNc [34] et par hybridation *in situ* [35].

L'ADNémie, démontrée par hybridation après amplification génique par PCR, est non seulement leucocytaire mais détectée dans le sérum ou le plasma [36] même après filtration sur filtre à pores de 0,2 µm, ce qui suggère la présence d'ADN-CMV circulant à l'état libre [37]; le seuil de détection atteint est de 1,6 génome par microlitre de sérum [38]. La provenance de cet ADN n'est pas connue. Le site initial de l'infection des polynucléaires et les processus qui en sont responsables ne sont pas connus. L'infection des polynucléaires *in vivo* pourrait résulter d'une endocytose ou d'une phagocytose de virions, ou de virions et de corps denses produits dans des foyers viscéraux, suivie de la migration de la pp65-68 dans le noyau et d'une expression active de transcrits. *In vitro*, 2 % des leucocytes du sang périphérique des donneurs bien portants expriment des antigènes précoces après inoculation avec des isolats; ce sont à 90 % des monocytes. L'infection des polynucléaires *in vitro* serait un modèle expérimental utile.

La présence du génome CMVH dans les polynucléaires pourrait également être consécutive à l'infection de progéniteurs dans la moelle osseuse. Les infections symptomatiques s'accompagnent de leucopénie et de thrombopénie et de la présence de grandes cellules cytomégaliennes dans la moelle osseuse [39]. *In vitro*, l'infection de cultures de cellules de moelle osseuse provenant de donneurs indifféremment séronégatifs ou séropositifs provoque une myélosuppression secondaire non seulement à une infection productive et destructrice des cellules de stroma mais encore à l'infection d'une faible proportion des progéniteurs hématopoïétiques [40]; ceux-ci hybrident avec une sonde spécifique des gènes très précoces du CMVH et expriment des virions infectants après coculture avec des fibroblastes permissifs [41]. Cette infection persiste dans les cellules issues de leurs divisions et de leur différenciation ce qui suggère la réplication du génome CMVH avec la division cellulaire. Ces progéniteurs médullaires infectés sont des réservoirs de virus qui engendrent des cellules infectées, capables de migrer dans la circulation péri-

phérique. Le passage d'une infection abortive à CMVH à une infection productive est favorisé par la différenciation cellulaire; l'infection productive est conditionnée par la synthèse des antigènes très précoces qui transactivent les promoteurs de gènes précoces et même tardifs. Lors d'une superinfection dans une cellule en différenciation, la conjonction de génomes CMVH provenant des progéniteurs myéloïdes et de l'apport intranucléaire de protéines du tégument viral capables de transactiver les promoteurs des gènes très précoces pourrait contribuer à la réactivation de l'infection et à sa dissémination chez l'immunosupprimé, en particulier chez le receveur de greffe de moelle dont on sait que l'infection est due à son propre CMVH et non à celui du donneur. ■

Remerciements

Les auteurs remercient très vivement Jean-Michel Molina, chef de clinique-assistant dans le service des maladies infectieuses de l'hôpital Saint-Louis, qui nous a confié des échantillons de sang de patients pour détection d'une infection à CMVH.

RÉFÉRENCES

1. Van der Bij W, Torensma R, van Son WJ, *et al.* Rapid immunodiagnosis of active cytomegalovirus infection by monoclonal antibody staining of blood leucocytes. *J Med Virol* 1988; 25: 179-88.
2. Van der Bij W, Schirm J, Torensma R, van Son WJ, Tegzess AM, The TH. Comparison between viremia and antigenemia for detection of cytomegalovirus in blood. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 2531-5.
3. Grefte JMM, van der Giessen M, van der Gun BTF, van Son WJ, The TH. The predominant viral antigen present in peripheral blood leucocytes during an active cytomegalovirus (CMV) infection is the lower matrix protein pp65. In: Landini MP, ed. *Progress in Cytomegalovirus Research*. Proceedings of the Third International Cytomegalovirus Workshop, Bologna, 11-14 June 1991. Amsterdam: Excerpta Medica, 1991: 233-6.
4. Revello MG, Percivalle E, Di Matteo A, Morini F, Gerna G. Nuclear expression of the lower matrix protein of human cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes of immunocompromised viraemic patients. *J Gen Virol* 1992; 73: 437-42.
5. Amadei C, Tardy-Panit M, Couillin P, *et al.* Kinetic study of the development and localization of human cytomegalovirus-induced antigens using monoclonal antibodies. *Ann Virol (Inst Pasteur)* 1983; 134 E: 165-80.
6. Gerna G, Revello MG, Percivalle E, Morini F. Comparison of different immunostaining techniques and monoclonal antibodies to the lower matrix phosphoprotein (pp65) for optimal quantitation of human cytomegalovirus antigenemia. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1232-7.
7. Van der Giessen M, The TH, van Son WJ. Cytomegalovirus antigenemia assay. *J Clin Microbiol* 1992; 29: 2909-10.
8. Randall RE, Dinwoodie N. Intranuclear localization of *Herpes simplex* virus immediate-early and delayed-early proteins: evidence that ICP 4 is associated with progeny virus DNA. *J Gen Virol* 1986; 67: 2163-77.
9. Jiwa NM, van de Rijke FM, Mulder A, *et al.* An improved immunocytochemical method for the detection of human cytomegalovirus antigens in peripheral blood leucocytes. *Histochemistry* 1989; 91: 345-9.
10. Revello MG, Percivalle E, Zavattoni M, Parea M, Grossi P, Gerna G. Detection of human cytomegalovirus immediate early antigen in leukocytes as a marker of viremia in immunocompromised patients. *J Med Virol* 1989; 29: 88-93.
11. Van den Berg AP, van der Bij W, van Son WJ, *et al.* Cytomegalovirus antigenemia as a useful marker of symptomatic cytomegalovirus infection after renal transplantation: a report of 130 consecutive patients. *Transplantation* 1989; 48: 991-5.

12. Boland GJ, de Gast GC, René RJ, *et al.* Early detection of active cytomegalovirus (CMV) infection after heart and kidney transplantation by testing for immediate early antigenemia and influence of cellular immunity on the occurrence of CMV infection. *J Clin Microbiol* 1990 ; 28 : 2069-75.
13. Van den Berg AP, Klompmaaker IJ, Haagsma EB, *et al.* Antigenemia in the diagnosis and monitoring of active cytomegalovirus infection after liver transplantation. *J Infect Dis* 1991 ; 164 : 265-70.
14. The TH, van der Bij W, van den Berg AP *et al.* Cytomegalovirus antigenemia. *Rev Infect Dis* 1990 ; 12 : S737-44.
15. Gerna G, Revello MG, Percivalle E, Zavattoni M, Parea M, Battaglia M. Quantification of human cytomegalovirus viremia by using monoclonal antibodies to different viral proteins. *J Clin Microbiol* 1990 ; 28 : 2681-8.
16. Gerna G, Zipeto D, Parea M, *et al.* Monitoring of human cytomegalovirus infections and ganciclovir treatment in heart transplant recipients by determination of viremia, antigenemia and DNAemia. *J Infect Dis* 1991 ; 164 : 488-8.
17. Alain-Albertini S, Mazon MC, Morinet F, Pérol Y. Diagnostic value of the polymerase chain reaction for cytomegalovirus viremia detection in bone marrow transplant recipients. In : Landini MP, ed. *Progress in Cytomegalovirus Research*. Proceedings of the Third International Cytomegalovirus Workshop, Bologna, 11-14 June 1991. Amsterdam : Excerpta Medica, 1991 : 109-12.
18. Boland GJ, de Weger RA, Tilanus MGJ, *et al.* Detection of cytomegalovirus (CMV) in granulocytes by polymerase chain reaction compared with the CMV antigen test. *J Clin Microbiol* 1992 ; 30 : 1763-7.
19. Gerna G, Parea M, Percivalle E, *et al.* Human cytomegalovirus viraemia in HIV-1-seropositive patients at various clinical stages of infection. *AIDS* 1990 ; 4 : 1020-31.
20. Ferchal F, Toulhier MC, Pérol Y. Organisation péricentriolaire de l'inclusion cytoplasmique observée dans les fibroblastes infectés par un cytomegalovirus humain. *J Microscopie* 1974 ; 19 : 213-20.
21. Rüger B, Klages S, Wala B, *et al.* Primary structure and transcription of the genes coding for the two virion phosphoproteins pp65 and pp71 of human cytomegalovirus. *J Virol* 1987 ; 61 : 446-53.
22. Liu B, Stinski MF. Human cytomegalovirus contains a tegument protein that enhances transcription from promoters with upstream ATF and AP-1 *cis*-acting elements. *J Virol* 1992 ; 66 : 4434-44.
23. Depto AS, Stenberg RM. Regulated expression of the human cytomegalovirus pp65 gene : octamer sequence in the promoter is required for activation by viral gene products. *J Virol* 1989 ; 63 : 1232-38.
24. Somogyi T, Michelson S, Masse MJO. Genomic location of a human cytomegalovirus protein with protein kinase activity (PK68). *Virology* 1990 ; 174 : 276-85.
25. Michelson S, Tardy-Panit M, Barzu O. Catalytic properties of a human cytomegalovirus-induced protein kinase. *Eur J Biochem* 1985 ; 149 : 393-9.
26. Schmolke S, Frieser M, Jahn G, Plachter B. The phosphorylated tegument protein pp65 of human cytomegalovirus is effectively transported to the cell nucleus. *Herpes Virus Workshop*, Glasgow, 1992.
27. Schrier RD, Nelson JA, Oldstone MBA. Detection of human cytomegalovirus in peripheral blood lymphocytes in a natural infection. *Science* 1985 ; 230 : 1048-51.
28. Taylor-Wiedeman J, Sissons JGP, Borysiewicz LK, Sinclair JH. Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J Gen Virol* 1991 ; 72 : 2059-64.
29. Stanier P, Kitchen AD, Taylor DL, Tys AS. Detection of human cytomegalovirus in peripheral mononuclear cells and urine samples using PCR. *Mol Cell Probes* 1992 ; 6 : 51-8.
30. Hersman J, Meyers JD, Thomas ED, Buckner CD, Clift R. The effect of granulocyte transfusions on the incidence of cytomegalovirus infection after allogeneic marrow transplantation. *Ann Intern Med* 1982 ; 96 : 149-52.
31. Toorkey CB, Carrigan DR. Immunohistochemical detection of an immediate early antigen of human cytomegalovirus in normal tissues. *J Infect Dis* 1989 ; 160 : 741-51.
32. Buller RS, Bailey TS, Ettinger NA, *et al.* Use of a modified shell vial technique to quantitate cytomegalovirus viremia in a population of solid-organ transplant recipients. *J Clin Microbiol* 1992 ; 30 : 2620-4.
33. Saltzman RL, Quirk MR, Jordan C. Disseminated cytomegalovirus infection. Molecular analysis of virus and leukocytes interactions in viremia. *J Clin Invest* 1988 ; 81 : 75-81.
34. Gerna G, Zipeto D, Percivalle E, Parea M, Revello MG, Maccario R, Péri G, Milanesi G. Human cytomegalovirus infection of the major leukocyte subpopulations and evidence for initial viral replication in polymorphonuclear leukocytes from viremic patients. *J Infect Dis* 1992 ; 166 : 1236-44.
35. Dankner WM, McCutchan JA, Richman DD, Hirata K, Spector SA. Localization of human cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes by *in situ* hybridization. *J Infect Dis* 1990 ; 161 : 31-6.
36. Ishigaki S, Takeda M, Kura T, *et al.* Cytomegalovirus DNA in the sera of patients with cytomegalovirus pneumonia. *Br J Haematol* 1991 ; 79 : 198-204.
37. Spector SA, Merrill R, Wolf D, Dankner WM. Detection of human cytomegalovirus in plasma of AIDS patients during acute visceral disease by DNA amplification. *J Clin Microbiol* 1992 ; 30 : 2359-65.
38. Brytting M, Xu W, Wahren B, Sundqvist VA. Cytomegalovirus DNA detection in sera from patients with active cytomegalovirus infections. *J Clin Microbiol* 1992 ; 30 : 1937-41.
39. Penchansky L, Krause JR. Identification of cytomegalovirus in bone marrow biopsy. *Southern Med J* 1979 ; 72 : 500-1.
40. Reiser H, Kühn J, Doerr HW, Kirchner H, Munk K, Braun R. Human cytomegalovirus replicates in primary human bone marrow cells. *J Gen Virol* 1986 ; 67 : 2595-604.
41. Maciejewski JP, Bruening EE, Donahue RE, Mocarski ES, Young NS, St Jeor SC. Infection of hematopoietic progenitor cells by human cytomegalovirus. *Blood* 1992 ; 80 : 170-8.

Summary

Detection of HCMV phosphoprotein 65 KDa in peripheral blood polymorphonuclear leukocytes : a marker of reactivation and dissemination

The cytomegalovirus antigenemia test is based on immunocytochemical detection of HCMV early-late structural protein pp65 in the nuclei of polymorphonuclear blood leukocytes of patients with systemic infection. Specificity and sensitivity are better than 90 %. There is a good positive correlation with HCMV disease, allowing an improved monitoring in patients undergoing chemotherapy. Detection of viremia by HCMV isolation, DNAemia by PCR amplification, pp65 antigenemia by immunocytochemical methods, immediate early antigen production in the different leukocyte subpopulations, all suggests that polymorphonuclear cells may be a main site of initial HCMV infection, reactivation and dissemination.