

*Einsatz von Restriktionsenzymen zur Überprüfung der Spezifität von PCR-Produkten zum Nachweis von *Toxoplasma gondii**

Astrid Müller, A. Haßl, H. Aspöck

Einleitung Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist ein Verfahren zur Vermehrung (Amplifikation) von Nucleinsäurestücken bekannter Sequenz. Sie wird seit ihrer Erfindung durch MULLIS im Jahre 1983 weltweit zur Amplifikation von DNS-, aber auch von definierten RNS-Teilen verschiedenster Erreger eingesetzt (7, 14, 20, 21, 22, 24, 25). Seit eineinhalb Jahren setzten wir die PCR im Routinelabor als Verfahren zum direkten Nachweis von *Toxoplasma gondii* in verschiedenen Patientenmaterialien ein (19).

Der Vorteil der PCR gegenüber anderen direkten Nachweismethoden, wie z. B. der Anfärbung der ganzen Parasitenzellen sowie der Isolierung und Anzüchtung der Parasiten in vivo oder in vitro, liegt in der Kombination von Sensitivität, Spezifität und einfacher, rascher Durchführbarkeit bei hoher Probenkapazität (17, 23, 28). Der Nachteil bei der Anwendung der PCR ist, daß eine Möglichkeit zur Spezifitätsüberprüfung unmittelbar nach der elektrophoretischen Auftrennung der Amplifikationsprodukte fehlt. Zwar kann man z. B. durch den Einsatz einer Nested-PCR (2, 26) die Wahrscheinlichkeit der Spezifität der Amplifikationsprodukte erhöhen, der Beweis, daß es sich um die nachzuweisende DNS handelt, fehlt jedoch auch in diesem Fall. Dieser Mangel war für uns Anlaß, den Einsatz von Restriktionsenzymen zur Überprüfung der Spezifität von PCR-Produkten zu untersuchen. Dabei schneidet das Restriktionsenzym das PCR-Produkt an einer bestimmten Stelle der Basensequenz, sodaß letztendlich zwei DNS-Stücke mit unterschiedlicher und durch die Schnittstelle genau definierter Länge vorliegen.

Material und Methoden Von Oktober 1992 bis September 1993 wurden insgesamt 981 Proben eines Kollektivs von 218 HIV-positiven Personen verarbeitet. Bei einem Großteil der Proben (75%) handelt es sich um Sedimente von induzierten Sputa nach Schleimlösung mittels 0,4% 1,4-Dithiothreitol, bei 17% um Bronchiallavage-Materialien, bei 2% um Pleurapunktate, bei 1,5% um Sedimente von Liquores cerebrosпинаles und bei 1% um Proben von Lymphknoten. Die restlichen Proben umfaßten autoptische und bioptische Hirnmaterialien, bioptisches Hautmaterial, Aszites-, Knochenmark- und Lumbalpunktate sowie Lymphdrainage-Proben. Ein Teil der Patienten (36%) befand sich zum Zeitpunkt der Materialentnahme im AIDS-Stadium IV, der andere Teil im Stadium III nach CDC (6). Bei 80% der Patienten handelte es sich um Männer, die beiden größten Risikogruppen waren Homosexuelle (29%) und Drogenabhängige (38%).

Zum Nachweis von *Toxoplasma gondii* mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion verwendeten wir ein 194 bp langes Stück des B1-Gens, das 35fach im Genom von *Toxoplasma gondii* vorliegt (3, 17). Die Aufbereitung der DNS der Proben einschließlich der Positiv- und Negativkontrollen sowie die Durchführung der Polymerase-Ketten-Reaktion erfolgte wie bereits in anderen Arbeiten beschrieben (18, 19). Die Auftrennung der PCR-Produkte wurde entweder mittels Agarose-Gel-Elektrophorese oder mittels Phast-Elektrophorese-System durchgeführt.

Auftrennung der Amplifikationsprodukte in der Agarose-Gel-Elektrophorese Je 30 µl des Amplifikationsproduktes wurden elektrophoretisch auf einem 1 cm dicken, 3%igen Agarose-Gel (Agarose NA, Pharmacia Ges. m. b. H., Wien) aufgetrennt (Spannung: 195 V; Laufzeit: 2 - 3 Stunden). Als Elektrophorese-Puffer wurde 1 × konzentrierter TBE-Puffer (5 × Stocklösung: 89 mM Trisbase; 89 mM Natriumborat; 2,5 mM EDTA; pH 8.3; Reagenzien: LKB-Produkte AB, Bromma, Sweden) verwendet. Das Gel wurde vor der Elektrophorese mit 60 µl Ethidiumbromid (Stocklösung: 10 mg/ml Aqua destillata; LKB-Produkte AB) versetzt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die DNS-Banden mittels UV-Licht-Durchstrahlung (302 nm) beurteilt.

Die Auswertung der DNS-Banden erfolgte mit Hilfe einer shareware zur Molekulargewichtsbestimmung (9).

Auftrennung der Amplifikationsprodukte im Phast-System (Pharmacia Ges. m. b. H., Wien) Je 2,5 µl des PCR-Produktes wurden elektrophoretisch auf einem Polyacrylamid-Gel (20%iges, homogenes Phast-Gel; Pharmacia) aufgetrennt (Spannung: 400 V; Laufzeit: 30 min.). Zur Pufferung des Systems wurden native Pufferstreifen (Phast-Gel Native Buffer Strips; Pharmacia) verwendet. Die DNS-Banden wurden nach der Elektrophorese mittels Silberfärbung sichtbar gemacht (17).

Zur Auswertung der DNS-Banden, daß heißt zur Berechnung deren Basenpaaranzahl stand ein Einlesegerät (Pharmacia) mit spezieller Software zur Verfügung.

Durchführung der Restriktionsenzymanalyse Zur Durchführung der Restriktionsenzymanalyse wurden je 5 µl der positiven PCR-Proben mit 2,5 Units des Restriktionsenzym ALU I (Pharmacia) versetzt und mit Aqua bidestillata auf 50 µl Reaktionsansatz aufgefüllt. Das Enzym schneidet die DNS zwischen den Basenkombinationen AG und CT, in unserem Fall also zwischen dem 88. und 89. Basenpaar. Das Reaktionsgemisch wurde daraufhin eine Stunde lang bei 37° C im Thermalreaktor „Hybaid Thermal Reactor“ (Biomedica Ges. m. b. H., Wien) inkubiert. Anschließend wurden die Proben mittels Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt (siehe oben). Die Berechnung der Basenpaaranzahl der DNS-Banden erfolgte mit Hilfe der oben genannten shareware zur Molekulargewichtsbestimmung.

Von den insgesamt 82 PCR-Produkten, bei denen eine Restriktionsenzymanalyse durchgeführt wurde, stammten 65% der Proben von induzierten Sputa, 27% von Bronchoalveolarlavage-Materialien, 6% von Lymphknotenproben und 2% von biopsischen Hirnmaterialien.

Ergebnisse Von insgesamt 981 Proben waren 127 (13%) in der PCR positiv. Bei 82 der 127 positiven PCR-Proben (64,5%) wurde eine Restriktionsenzymanalyse mit dem Restriktionsenzym ALU I durchgeführt. In 80% der Fälle wurde die Spezifität der PCR-Produkte durch Restriktionsenzymanalyse bestätigt. In 17,5% der Fälle wurden die PCR-Produkte zwischen dem 78. und 79. bp bzw. zwischen dem 80. und 81. bp geschnitten. In 2,5% der Fälle wurden die PCR-Produkte nicht geschnitten. Einzelheiten sind der Tabelle 1 zu entnehmen.

Die Abbildung 1 zeigt die schematische Darstellung einer Agarose-Gel-Elektrophorese mit positiven PCR-Proben vor und nach dem Restriktionsenzymchnitt.

Diskussion Die Diagnostik der Toxoplasma-Infektionen des Menschen basiert zwar im wesentlichen auf dem Nachweis spezifischer Antikörper im Serum, jedoch kommt dem direkten Nachweis von *Toxoplasma gondii* mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion zunehmend Bedeutung zu. Dies gilt vor allem einerseits für die pränatale Diagnostik andererseits für die Diagnostik von Toxoplasma-Infektionen bei Immunsupprimierten (3, 4, 5, 8, 10, 11, 23, 29). Wie eingangs erwähnt, weist die Polymerase-Ketten-Reaktion gegenüber anderen direkten Nachweismethoden, wie zum Beispiel der GIEMSA-Färbung, dem Direkten Immunfluoreszenztest (DIFT), der Isolierung und Anzucht des Erregers in Versuchstieren oder in Gewebekulturen (12) oder dem Nachweis von zirkulierenden Antigenen in Körperflüssigkeiten des Menschen (13), den Vorteil auf, rasch und einfach durchführbar zu sein. Außerdem ist die Polymerase-Ketten-Reaktion ein Verfahren mit hoher Probenkapazität (17).

Tabelle 1:

Ergebnisse der Restriktionsenzymanalyse.

Aufgelistet ist die Zahl der geschnittenen und ungeschnittenen PCR-Produkte sowie die unterschiedlichen Schnittstellen innerhalb der amplifizierten Sequenz.

Material	Anzahl der geschnittenen PCR-Proben	geschnitten zwischen			nicht geschnitten
		88/89 bp	78/79 bp	80/81 bp	
IS*	53	45	5	2	1
BAI**	22	18	3	-	1
Lymphknoten	5	1	2	2	-
Hirnmateri***	2	1	1	-	-
gesamt	82	65	11	4	2

*) induzierte Sputa

**) Bronchoalveolarlavage-Materialien

***) bioptisch oder autoptisch



Abbildung 1:

Schema einer Agarose-Gel-Elektrophorese zur Auftrennung von PCR-Produkten vor und nach dem Restriktionsenzymchnitt (RS). Die DNS-Banden der *Toxoplasma*-positiven Proben liegen vor dem RS bei 194 Basenpaaren (bp). Nach dem RS erhält man je zwei DNS-Banden – eine mit 88 bp und eine mit 106 bp.

Proben:

Nr. 1 + 6 = DNS-Marker (123 bp ladder)

Nr. 2 + 4 = positive PCR-Proben

Nr. 3 + 5 = positive Proben nach Restriktionsenzym-schnitt

Nr. 7 + 8 = Positiv-Kontrolle (10^6 Tachyzoiten; RH-Stamm; vor und nach dem Restriktionsenzym-schnitt)

↑ Laufrichtung der Elektrophorese

Die Auftrennung und der Nachweis der PCR-Produkte erfolgen entweder mittels Agarose-Gel-Elektrophorese durch Anfärbung mit Ethidiumbromid und Sichtbarmachung durch UV-Bestrahlung oder im Phast-Elektrophorese-System mittels Silberfärbung. Im ersten Fall erfolgt die Identifizierung der PCR-Produkte mittels einer Software zur Molekulargewichtsbestimmung (9), im zweiten Fall steht für die Berechnung der Anzahl der Basenpaare der DNS-Banden ein Einlesegerät mit spezieller Software zur Verfügung. Beide Systeme sind zwar überaus benutzerfreundlich, eine Möglichkeit, die Spezifität der DNS-Banden zu überprüfen, fehlt jedoch. Diesem Mangel kann man durch den Einsatz von Restriktionsenzymen begegnen. „Positive“ PCR-Proben werden mit dem Restriktionsenzym ALU I versetzt; dieses schneidet das amplifizierte, 194 bp lange DNS-Stück zwischen dem 88. und 89. bp, wodurch die Sequenz in ein Stück mit 88 bp Länge und in ein Stück mit 106 bp Länge geteilt wird. Die Auftrennung der DNS-Banden erfolgt mittels Agarose-Gel-Elektrophorese, die Identifizierung und Auswertung mittels des Molekulargewichtsbestimmungsprogrammes (siehe oben).

Auf diese Weise untersuchten wir 82 von insgesamt 127 positiven PCR-Proben. In 80% der Fälle wurden die PCR-Produkte tatsächlich an der oben genannten Stelle geschnitten, – ein Umstand, der beweist, daß es sich bei dem Amplifikationsprodukt um das gesuchte, 194 bp lange DNS-

Stück des B1-Gens von *Toxoplasma gondii* handelt. In 17,5% der Fälle wurden die PCR-Produkte zwischen dem 78. und 79. bp bzw. zwischen dem 80. und 81. bp, in 2,5% der Fälle gar nicht geschnitten. Das bedeutet, daß sich bei einem Großteil der Proben die ALU I-Schnittstelle zwischen dem 88. und 89. bp innerhalb der von BURG et al. (1989) beschriebenen Sequenz des B1-Gens befindet. Bei den restlichen Proben ist die Schnittstelle um zehn bzw. acht Basenpaare verschoben oder, wie in wenigen Fällen gar nicht vorhanden. Es ist derzeit noch unsicher, ob diese Ergebnisse auf eine primär falsch-positive PCR oder auf eine Variation der Basensequenz innerhalb des B1-Gens zurückzuführen sind. Die Klärung dieser Frage kann nur durch eine Analyse der Sequenz der amplifizierten DNS erbracht werden; diese Möglichkeit steht uns jedoch momentan nicht zur Verfügung.

Die Abbildung 1 zeigt ein Schema einer Agarose-Gel-Elektrophorese nach Auftrennung der Proben (jeweils vor und nach dem Restriktionsenzym-schnitt) sowie die einfache Beurteilbarkeit der Resultate.

Wie eingangs erwähnt, stellt die Durchführung einer Nested-PCR eine Möglichkeit zur Erhöhung der Spezifität der PCR-Produkte dar. Bei der Nested-PCR wird ein zusätzliches Primer-Paar eingesetzt, wobei die zwei Primer dieses Paares eine DNS-Sequenz einschließen, die innerhalb der Sequenz liegt, die an das erste Primer-Paar anschließt. Die Nested-PCR erhöht die Spezifität, weil die Wahrscheinlichkeit, daß sich zwei Primer-Paare an unspezifische DNS-

Stellen anlagern, noch geringer ist, als bei Verwendung von nur einem Primer-Paar (15, 16, 27). Der Nachteil bei der Anwendung dieser PCR-Variante ist – verglichen mit der Durchführung einer „normalen“ PCR – der doppelte Zeit- und Materialaufwand.

Eine weitere Möglichkeit, die Spezifität der PCR-Produkte zu überprüfen ist die Inokulation des Ausgangsmaterials in die Peritonealhöhle von SPF-Mäusen. Der Maus-Inokulationstest gilt im Vergleich mit den anderen, oben genannten direkten Nachweisverfahren als Goldstandardmethode. Probleme bei der Anwendung des Inokulationstests ergeben sich jedoch aus der Tatsache, daß ein Ergebnis erst nach vier bis sechs Wochen vorliegt, wodurch die Routinetauglichkeit dieses Tests – unserer Meinung nach – nicht gegeben ist.

Die Restriktionsenzymanalyse bietet den Vorteil, einfach und rasch durchführbar zu sein (Mehraufwand ca. zweieinhalb Stunden). Auf Grund der in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse konnte gezeigt werden, daß sich die Restriktionsenzymanalyse zur Überprüfung der Spezifität von PCR-Produkten sehr gut eignet.

Zusammenfassung

Es wird der Einsatz von Restriktionsenzymen zur Überprüfung der Spezifität von PCR-Produkten beschrieben. Die PCR wird zum Nachweis von *Toxoplasma gondii* in unserem Routinelabor eingesetzt, wobei wir als Zielsequenz ein 194 bp langes DNS-Stück des B1-Gens von *Toxoplasma gondii* verwenden. Von insgesamt 127 positiven PCR-Proben wurden 82 Proben mittels Restriktionsenzymanalyse auf ihre Spezifität untersucht. Als Enzym verwendeten wir ALU I, welches das amplifizierte, 194 bp lange DNS-Stück zwischen dem 88. und 89. bp schneidet. In 80% der Fälle wurden die PCR-Produkte an der genannten Stelle geschnitten. In 17,5% lag die Schnittstelle zwischen dem 78. und 79. bp bzw. zwischen dem 80. und 81. bp. In 2,5% der Fälle wurde das PCR-Produkt nicht geschnitten. Die Berechnung der Anzahl der Basenpaare der DNS-Stücke vor und nach der Restriktionsenzymanalyse erfolgte mittels einer shareware zur Molekulargewichtsbestimmung. Der Einsatz von Restriktionsenzymen stellt eine rasch und einfach durchführbare Möglichkeit dar, um die Spezifität von PCR-Produkten zu überprüfen.

Schlüsselwörter

Polymerase-Ketten-Reaktion, *Toxoplasma gondii*, PCR-Produkt, Restriktionsenzymanalyse, Spezifität.

Summary

Application of restriction enzymes for checking specificity of PCR-products

The application of restriction enzymes for checking the specificity of PCR-products is described. PCR is used in our laboratory for the detection of *Toxoplasma gondii*. Our target is a 194 bp long sequence of the B1-gene of *Toxoplasma gondii*. The specificity of 82 out of altogether 127 positive PCR-samples was checked by using the restriction enzyme ALU I. This enzyme cuts the amplified DNA fragment between the bp no. 88 and no. 89. The specificity of the PCR-products was confirmed in 80% of the cases, that means they were cut at the described position. In 17,5% of the cases the PCR-products were cut between the bp no. 78 and 79 or between the bp no. 80 and 81 respectively. In 2,5% of the cases the PCR-product was not cut. The identification of the DNA-fragments before and after restriction enzyme analysis is done by using a shareware for molecular weight determination. The application of restriction enzymes offers a rapid and reliable possibility to check the specificity of PCR-products.

Key words

Polymerase chain reaction, *Toxoplasma gondii*, PCR-products, restriction enzyme analysis, specificity.

Literatur

1. BREZIN, A. P., EGWUAGU, C. E., BURNIER, M., SILVEIRA, C., MAHDI, R., GAZZINELLI, R. T., BELVORT, R., NUSSENBLATT, R. B. (1990):
Identification of *Toxoplasma gondii* in paraffin-embedded sections by the Polymerase Chain Reaction. *Am. J. Ophthalmol.* 110, 599-604.
2. BRUISTEN, S. M., KOPPELMAN, M. H. G. M., VAN DER POEL, C. L., HUISMAN, J. G. (1991):
Enhanced detection of HIV-1 sequences using Polymerase Chain Reaction and a liquid hybridization technique. *Vox Sanguinis* 61, 24-29.
3. BURG, J. L., GROVER, C. M., POULETTY, P., BOOTHROYD, J. C. (1989):
Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol.* 27, 1787-1792.
4. CAZENAVE, J., BROUSSIN, B., CABEILH, C., DISCAMP, G. (1992):
Rapid detection of *Toxoplasma* by the Polymerase Chain Reaction technique – a contribution to the prenatal diagnosis. *Presse Medicale* 21, 221.
5. CAZENAVE, J., CHEYROU, A., BLOUIN, P., JOHNSON, A. M., BEGUERET, J. (1991):
Use of Polymerase Chain Reaction to detect *Toxoplasma*. *Journal of Clinical Pathology* 44, 1037-1039.
6. CDC (1986):
Classification system for Human T-lymphotropic virus type II-I/Lymphadenopathy-associated virus infections. *Morb. Mort. Weekly Rep.* 35, 334-339.
7. CHAPPUIS, B. B., STRIK, M., BOURQUIN, P., MÜLLER-HERMELINK, H. K. (1990):
Die Polymerase-Ketten-Reaktion: Eine neue Methode und ihre Anwendungsmöglichkeiten in der Pathologie. *Der Pathologe* 11, 125-129.
8. CRISTINA, N., DEROUIN, F., PELLOUX, H., PIERCE, R., CESBRON-DE-LAUWN, M. F., AMBROISE-THOMAS, P. (1992):
Polymerase Chain Reaction (PCR) detection of *Toxoplasma gondii* in AIDS Patients using the repetitive sequence TGR1E. *Pathologie Biologie* 40, 52-55.
9. GRABNER, M., HOFBAUER, R. (1991):
A computer program for molecular weight determination of DNA fragments (HOWBIG). *Cabios* 3, 317-319.
10. GROSS, U., ROGGENKAMP, A., JANITSCHKE, K., HEESEMANN, J. (1992):
Improved sensitivity of the Polymerase Chain Reaction for detection of *Toxoplasma gondii* in biological and human clinical specimens. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 11, 33-39.
11. GROVER, C. M., THULLIEZ, P., REMINGTON, J. S., BOOTHROYD, J. C. (1990):
Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using Polymerase Chain Reaction and amniotic fluid. *Journal of Clinical Microbiology* 10, 2297-2301.
12. HARMER, Ch., HASSL, A., ASPÖCK, H. (1993):
Vergleich verschiedener Nährmedien für die Züchtung von *Toxoplasma gondii* in der Gewebekultur. *Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol.*, 16, 123-126
13. HASSL, A., ASPÖCK, H., FLAMM, H. (1988):
Circulating antigens of *Toxoplasma gondii* in patients with AIDS: Significance of detection and structural properties. *Zbl. Bakt. Hyg. A* 270, 302-309.
14. KLAPPER, P. E., CLEATOR, G. M., DENNETT, C., LEWIS, A. G. (1990):
Diagnosis of herpes encephalitis via Southern blotting of cerebrospinal fluid DNA amplified by polymerase chain reaction. *Journal of Medical Virology* 32, 261-264.
15. LEBECH, M., LEBECH, A. M., NELSON, S., VUUST, J., MATHIESEN, L., PETERSEN, E. (1992):
Detection of *Toxoplasma gondii* DNA by Polymerase Chain Reaction in cerebrospinal fluid from AIDS patients with cerebral toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* 165, 982-983.
16. LIESENFELD, O., HOPPENWORTH, P., HAHN, H. (1993):
„Nested PCR“ zum Nachweis von *Toxoplasma gondii*-DNA aus klinischen Materialien. *Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol.*, 16, 147-152

17. MÜLLER, Astrid (1993):
Etablierung einer Polymerase-Ketten-Reaktion zum Nachweis von *Toxoplasma gondii*.
Diplomarbeit an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Wien. 109 pp.
18. MÜLLER, A., HASSL, A., ASPÖCK, H. (1992):
Vergleichende Versuche zur DNS-Gewinnung aus den Tachyzoiten von *Toxoplasma gondii*.
Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 14, 181-185.
19. MÜLLER, A., HASSL, A., ASPÖCK, H. (1993):
Die Polymerase-Ketten-Reaktion zum Nachweis von *Toxoplasma gondii* in biotischen und autoptischen
Materialien.
Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 15, 119-124.
20. MULLIS, K. B., FALOONA, F., SCHARF, S. J., SAIKI, R. K., HORN, G. T., ERLICH, H. A. (1986):
Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.
Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 51, 263-273.
21. MULLIS, K. B., FALLOONA, F. A. (1987):
Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.
Methods Enzymol. 155, 335-350.
22. OU, C. Y., KWOK, S., MITCHELL, S. W., MACK, D. H., SNINSKY, J. J., KREBS, J. W., FEORINO, P., WARFIELD, D.,
SCHOCHETMAN, G. (1988):
DNA amplification for direct detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cell.
Science 239, 295-297.
23. ROTH, A., ROTH, B., HÖFFKEN, G., STEUBER, S., KHALIFA, K. I., JANITSCHKE, K. (1992):
Application of the Polymerase Chain Reaction in the Diagnosis of Pulmonary Toxoplasmosis in
Immunocompromised Patients.
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 11, 1177-1180.
24. ROWLEY, A. H., WHITLEY, R. J., LAKEMEN, F. D., WOLINSKY, S. M. (1990):
Rapid detection of herpes-simplex-virus DNA in cerebrospinal fluid of patients with herpes simplex
encephalitis.
Lancet 335, 440-441.
25. SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K. B., HORN, G. T., ERLICH, H. A., ARNHEIM, N. (1985):
Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle
cell anemia.
Science 230, 1350-1354.
26. SHIOKAWA, S., YASUDA, M., YAMAMOTO, M., NOBUNAGA, M. (1991):
Application of nested Polymerase Chain Reaction for the detection of HTLV-1 genome.
Leukemia 5, 1010-1011.
27. STEFFAN, R. J., ATLAS, R. M. (1991):
Polymerase Chain Reaction – applications in environmental microbiology.
Annual Review of Microbiology 45, 137-161.
28. VAN DE VEN, E., MELCHERS, W., GALAMA, J., CAMPS, W., MEUWISSEN, J. (1991):
Identification of *Toxoplasma gondii* infections by B1-gene amplification.
J. Clin. Microbiol. 29, 2120-2124.
29. WEISS, L. M., CHEN, Y. Y., BERRY, G. J., STRICKLER, J. G., DORFMAN, R. F., WARNKE, R. A. (1992):
Infrequent detection of *Toxoplasma gondii* genome in toxoplasmic lymphadenitis – a Polymerase Chain
Reaction study.
Hum. Pathol. 23, 154-158.

Korrespondenzadresse: Mag. Astrid Müller
Abt. für Medizinische Parasitologie
Klinisches Institut für Hygiene der Universität Wien

Kinderspitalgasse 15
A-1095 Wien · Austria