

# Nukleinsäurenachweis von *Toxoplasma gondii* in der Schwangerschaftsvorsorge

## Detection of *Toxoplasma gondii* nucleic acid in pregnancy

W. Tuma<sup>1</sup>, Elke Weber<sup>1</sup>, A. Haß<sup>2</sup>, G. Büniger<sup>1</sup>, A. Niebecker<sup>1</sup>, G. Maass<sup>1</sup>, M. Giesing<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Gemeinschaftspraxis für Laboratoriumsmedizin, Recklinghausen

<sup>2</sup>Klinisches Institut für Hygiene der Universität Wien

### Zusammenfassung:

Mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden wurden 88 Blutproben von Schwangeren auf Anwesenheit von *Toxoplasma gondii* spezifischer Nukleinsäure untersucht. Seronegative und IgG-positive/IgM-negative Patientinnen waren stets im molekularbiologischen Direktnachweis negativ. Bei Patientinnen mit einer serologisch diagnostizierten Toxoplasmose konnte immer auch *T. gondii* spezifische Nukleinsäure in den Blutproben nachgewiesen werden. In den Fällen, bei denen mittels serologischer Testung einer Serumprobe, sofort keine eindeutige Aussage bezüglich eines Vorliegens einer akuten *T. gondii* Infektion möglich war, wurde in ca. 1/3 der Proben spezifische Nukleinsäure nachgewiesen. Auf Basis dieser Untersuchungsergebnisse wurde ein Ablaufschema einer Toxoplasmose Stufendiagnostik für die Schwangerschaftsvorsorge entwickelt.

### Schlüsselwörter:

Toxoplasmose – Schwangerschaftsvorsorge – Nukleinsäurenachweis – Polymerase-Kettenreaktion

### Summary:

Using DNA-amplification methods, 88 blood samples of pregnant women were screened for the presence of *Toxoplasma gondii* specific nucleic acid. In seronegative and IgG-positive/IgM-negative patients specific DNA could never be found. Samples from women with an acute toxoplasmosis always reacted positive in the DNA amplification test. In about 1/3 of the blood samples which could not be classified at once by serological testing, toxoplasma specific DNA was detected. Based on these data, a scheme for toxoplasmosis screening during pregnancy is presented.

### Keywords:

Toxoplasmosis during pregnancy – detection of nucleic acid – polymerase chain reaction

## Einleitung

Akute Infektionen mit *Toxoplasma gondii* in der Schwangerschaft können, wie schon lange bekannt, zum Tod oder zu schweren Organschäden der Feten führen. In Mitteleuropa sind 30–60% der Schwangeren seronegativ, also nicht gegen eine Toxoplasma-Primärinfektion geschützt (1). Das Risiko einer Primärinfektion während der Schwangerschaft wird zwischen 0,5 und 1,5% angenommen (1–4). In Österreich und Frankreich sind deshalb Toxoplasmose-Vorsorgeuntersuchungen seit Jahren obligatorisch (5, 6). In der Bundesrepublik ist die Toxoplasmose-Überwachung während der Schwangerschaft in den Mutterschaftsrichtlinien nur für den Verdachtsfall festgelegt, sie wird aber vom Bundesgesundheitsamt (Kommission: „Toxoplasmose und Schwangerschaft“) in Form des Antikörpernachweises empfohlen. Zur Zeit

werden für den Nachweis von Toxoplasma-spezifischen Antikörpern verschiedene Testverfahren wie z.B. IFT, ELISA, RIA, KBR und ISAGA eingesetzt.

Bei der erstmaligen serologischen Untersuchung der Schwangeren treten nicht selten differentialdiagnostische Probleme auf. Vor allem der Nachweis von Toxoplasma-spezifischen Antikörpern des IgM-Typs birgt oft die Schwierigkeit in sich, zwischen einer relevanten Primärinfektion und persistierenden IgM Antikörpern einer auch mehr als 2 Jahren zurückliegenden Infektion unterscheiden zu müssen. In den seltensten Fällen liegt eine erkennbare Serokonversion oder ein sehr hoher IgM-Titer vor, sodaß die eindeutige Diagnose einer Primärinfektion sofort erstellt und eine Therapie empfohlen werden kann. Auch der Nachweis von spezifischen IgA allein beweist nicht eine frische Infektion, aber stellt einen wichtigen

Parameter dar, dessen diagnostischer Aussagewert jedoch in weiteren Studien noch abgeklärt werden muß. (7, 8). Häufig sind Zweituntersuchungen nach ca. 14 Tagen und die Kombination verschiedenster Tests für die genaue Differenzierung des Stadiums der Infektion nötig. Der alternativ zur serologischen Untersuchung mögliche direkte Erregernachweis aus dem Blut ist auf Grund seiner niedrigen Sensitivität und wegen des hohen Aufwandes ebenfalls keine Methode der Wahl.

Hingegen wurde in den letzten Jahren der molekularbiologische Direktnachweis, also die Detektion spezifischer Nukleinsäuren z.B. mit Hilfe der Genamplifikation, bei einer Vielzahl von Infektionserregern beschrieben. Der Nachweis einer Toxoplasma-Infektion mittels PCR wird vor allem bei der Diagnose von zerebraler und pulmonaler Toxoplasmose bei AIDS-Patienten und bei der Pränataldiagnostik nach Amniozentese in Speziallaboratorien routinemäßig eingesetzt (6, 9 – 12).

Das Ziel dieser Arbeit war es festzustellen, ob mit Hilfe molekularbiologischer Methoden eine Verbesserung der Diagnostik bei der Toxoplasmose-Vorsorgeuntersuchung zu erzielen ist und dadurch eventuell unnötige Therapien während der Schwangerschaft vermieden werden können.

## Material und Methoden

Es wurden ausschließlich Blutproben von Schwangeren aus den Einsendungen an die Gemeinschaftspraxis für Laboratoriumsmedizin Prof. Giesing und Partner, Recklinghausen, für die Untersuchungen herangezogen. Sowohl Vollblut als auch EDTA-Blut wurde für den DNA-Nachweis verwendet.

### Antikörpertests

Für das Austesten auf spezifische *T. gondii* Antikörper wurden folgende Tests herangezogen:

Komplementbindungsreaktion (KBR): Fa. Roche

IgG-ELISA: Fa. Behring

IgM-ELISA: Fa. Behring

IgM-IFT: Fa. bioMerieux

Alle Tests wurden genau nach Herstellerangaben durchgeführt und ausgewertet.

### Nukleinsäurenachweis

Die Isolierung von DNA erfolgte nach der Methode von Zeillinger et. al (13). Bei Verwendung von EDTA-Blutproben wurde eine Lymphozytenisolation mittels Gradientenzentrifugation durchgeführt. Die Genamplifikation wurde routinemäßig in der B1-Genregion als seminested Reaktion durchgeführt (21, 22) (Abb.1). Die Lage der Primer (Tox-10,-11,-5) ist in Abbildung 4 gekennzeichnet. Die Sonde wurde mittels Kinasereaktion (15) mit  $\gamma$ - $^{32}$ P-ATP 5'-endmarkiert. Um falsch positive Reaktionen durch „carry over“ zu vermeiden wurde nach den Richtlinien von Kwok et al. (14) vorgegangen: Die Spezifikations-

überprüfungen durch Restriktionsenzymanalyse und Southern Blot wurden wie in Lit. (15) beschrieben, durchgeführt.

## Ergebnisse

Es wurden mehrere Genamplifikationssysteme in den Genregionen B1, 16S- like rDNA, P30 und Gra4 etabliert und auf ihre Sensitivität analysiert. Das sensitivste Ergebnis mit der höchsten Spezifität brachte das System der B1-Genregion. Durch Einsatz einer „Eintopf“-seminested

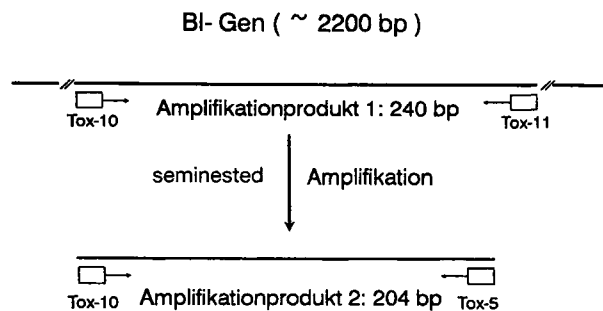


Abb. 1: Testprinzip der Genamplifikation zum Nachweis spezifischer *T. gondii* Nukleinsäure

Amplifikation in Kombination mit dem „hot-start“ Verfahren konnte routinemäßig eine einzelne Tachyzoitenzelle nachgewiesen werden. Die Abbildung 2 zeigt die Ergebnisse der Amplifikationen von 1000, 100, 10 und 1 Tachyzoitenzelle des Laborstammes RH. Die Amplifikationslänge beträgt 204 bp (Primerpaar Tox10/Tox5/Tox11).

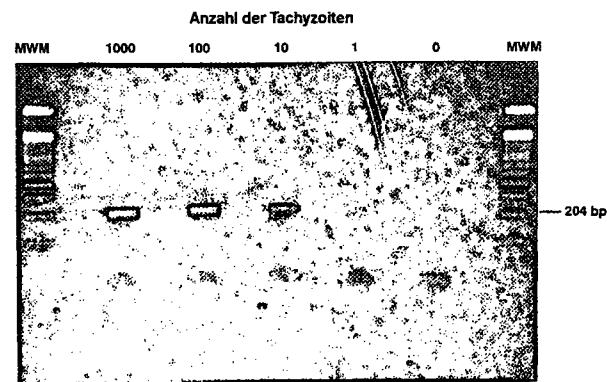


Abb. 2: Sensitivität des B1-Gen Amplifikationssystems  
MWM = Molekulargewichtsmarker, 100 bp Leiter

Die Spezifität der Amplifikation wurde durch Hybridisation mit einer sequenzspezifischen Sonde (Abbildung 3b), durch Restriktionsenzymanalyse und durch eine Sequenzanalyse überprüft. Abbildung 3a zeigt das Ergebnis des Schnittes des Genamplikates mit den Restriktionsenzymen Alu1, Cla1 und Sac1. Die Größe und Anzahl der entstehenden Banden entsprach genau der mittels Computer ermittelten Fragmentlängen.

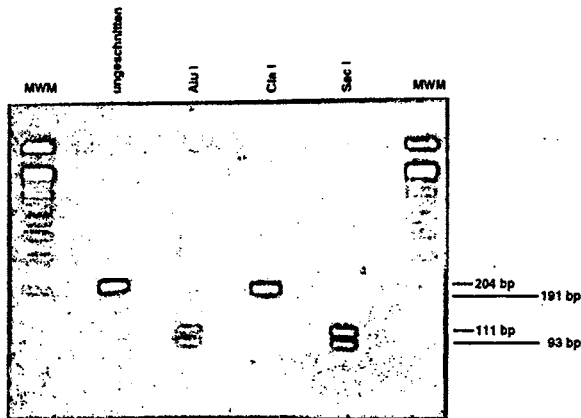


Abb. 3a: Restriktionsenzym-Analyse der Produkte der Genamplifikation

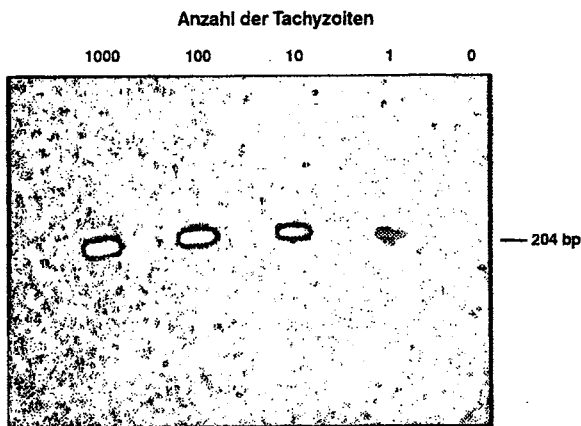


Abb. 3b: Southern Blot Analyse mit Toxoplasmose-spezifischer Sonde (Farbumkehr-Abbildung)

Die durch die Sequenzierung ermittelten Daten zeigt die Abbildung 4. Alle untersuchten Humanisolate zeigten die identische Sequenz und unterschieden sich gegenüber dem Laborstamm jeweils durch einen Basenaustausch (G-> A) an Position 84 des Amplifikates.

Mit Hilfe dieses Genamplifikationssystem wurden insgesamt 88 Blutproben von Schwangeren aus unserem Routinelabor auf Anwesenheit von Toxoplasmose-spezifischer Nukleinsäure untersucht. Die Proben wurden auf Grund der serologischen Ergebnisse in 4 verschiedene Gruppen unterteilt (siehe Material und Methoden).

Die mittels Genamplifikation erzielten Ergebnisse sind in der Tabelle 1 dargestellt. Die Gruppe 1 repräsentiert die serologisch ermittelten akuten Toxoplasma-Infektionen. In diesem Kollektiv waren auch alle Proben Toxoplasma gondii-Nukleinsäure positiv. Die Gruppen 3 und 4 repräsentieren jeweils Patientinnen mit latenter, für die Schwangerschaft nicht relevanter Toxoplasma-Infektion oder mit Seronegativität. In beiden Kollektiven erbrachte die Genamplifikation ausschließlich negative Ergebnisse.

Tab. 1: Gruppe 1: akute *T. gondii*- Infektion; Gruppe 2: IgM positiv, keine eindeutige Diagnose auf Basis Serologie möglich; Gruppe 3: IgG positiv, IgM negativ; Gruppe 4: IgG negativ, IgM negativ;

	Anzahl Patienten	Genamplifikation positiv (%)	Genamplifikation negativ (%)
Gruppe 1	11	11 (100 %)	-
Gruppe 2	27	10 (37 %)	17 (63 %)
Gruppe 3	20	-	20 (100 %)
Gruppe 4	30	-	30 (100 %)

Das labordiagnostisch interessanteste Kollektiv stellt die Gruppe 2 dar. Hier sind alle Patientinnen zusammengefaßt, bei denen auf Basis der Serologiedaten keine eindeutige Aussage betreffend dem Vorliegen einer akuten Toxoplasmainfektion möglich war. Hier zeigte die Genamplifikation in nur ca. 1/3 der Fälle eine positive Reaktion. Wir interpretieren dieses Ergebnis als eine vorliegende, therapiebedürftigen Akutinfektion.

In insgesamt 6 Fällen konnte der Behandlungserfolg 4 – 6 Wochen nach Therapiestart mittels Genamplifikation überprüft werden. In 5 von 6 Fällen war nach dieser Zeitspanne kein Erreger mehr molekularbiologisch nachweis-

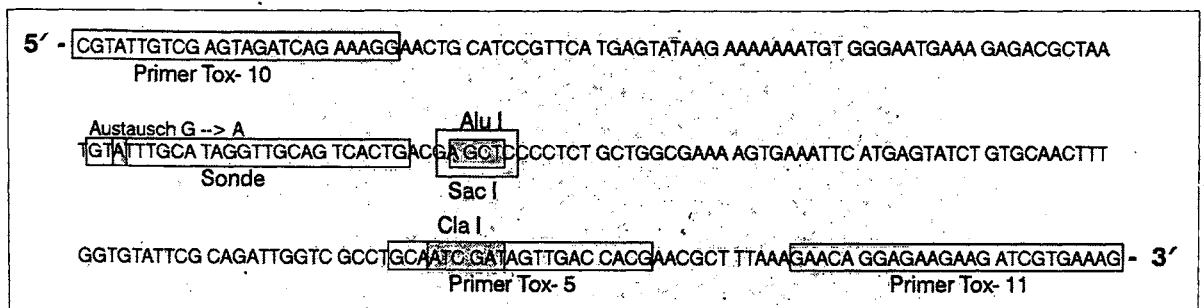


Abb. 4: Sequenz des Amplifikationsproduktes

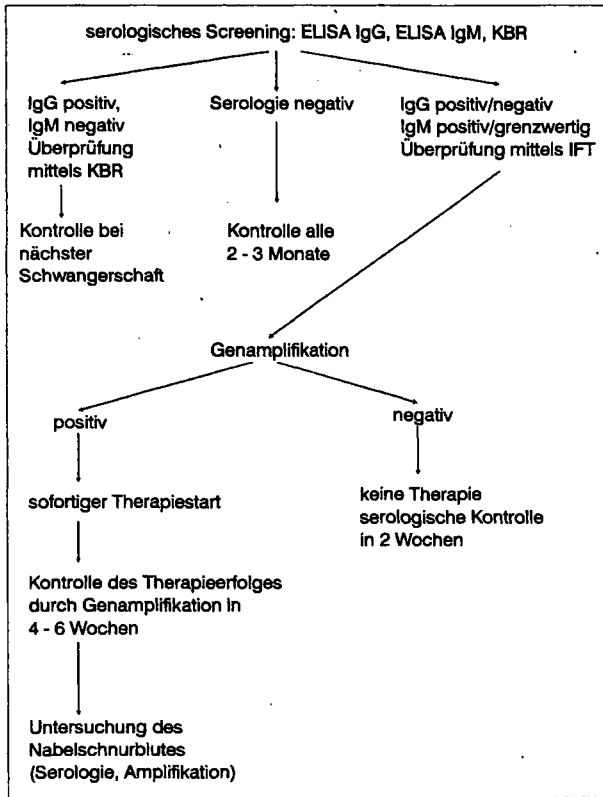


Abb. 5: Toxoplasmose-Screening in der Schwangerschaft (Gemeinschaftspraxis für Laboratoriumsmedizin, Recklinghausen)

bar. Bei einer Patientin war auch 3 Monate nach Therapiebeginn der Nucleinsäurenachweis positiv.

## Diskussion

Die Auswirkungen einer Primärinfektion mit *Toxoplasma gondii* während der Schwangerschaft sind seit langem bekannt. Aus diesem Grund wird in einigen Ländern Europas wie Österreich und Frankreich (ebenfalls in der früheren DDR) ein obligatorisches Toxoplasmose-Screening in der Schwangerschaftsvorsorge durchgeführt. Das Ziel ist es, eine aktive Infektion frühzeitig zu erkennen und sofort eine Chemotherapie einzuleiten.

Neueren Statistiken zufolge sind in der Bundesrepublik ca. 40 – 60% der Schwangeren seronegativ, also ohne Immunschutz (1, 16). Studien in Österreich zeigten, daß die Rate der seropositiven Schwangeren weiter abnimmt, bei gleichzeitigem Anstieg des *T. gondii* Infektionsrisikos während der Schwangerschaft (2). Das statistische Risiko für eine seronegative Frau während der Schwangerschaft eine Primärinfektion zu durchlaufen, wird in Mitteleuropa zwischen 0,5 und 1,5% eingeschätzt (1–4). Um eine transplazentare Infektion mittels Chemotherapie verhindern zu können, ist vor allem die frühzeitige Diagnose einer akuten *T. gondii* Infektion mit bestehender

Parasitämie entscheidend. Das Vorhandensein von aktiven Parasiten im Blut ist die Voraussetzung für eine fokale Invasion der Plazenta und damit für eine Gefährdung der Frucht.

Die Diagnose der Toxoplasmose basiert im Moment vor allem auf dem serologischen Nachweis von spezifischen Antikörpern. Bei Anwesenheit spezifischer IgM-Antikörper ist es aber in den seltensten Fällen auf Grund der Analyse einer Serumprobe möglich, eine sofortige Diagnose bezüglich dem Vorliegen einer frischen Infektion zu erstellen. Auf Basis spezifischer IgM-Antikörper die Differenzierung zwischen akuter und abgelaufener *T. gondii* Infektion zu erstellen, birgt spezielle Probleme. Vor allem die langanhaltende Persistenz (bis zu 2 Jahren) von Antikörpern des IgM Typs erschwert die exakte Bestimmung des Infektionsstadiums und führt häufig zu Fehlbeurteilungen (1, 16). Erschwerend kommt hinzu, daß in den seltensten Fällen den Labors Vorbefunde oder mehrere Serumproben vorliegen und deshalb oft eine gesicherte Serokonversion nicht ermittelt werden kann. Obwohl von einem positiven IgM- oder IgA-Befund nicht zweifelsfrei auf eine vorliegende akute *T. gondii* Infektion geschlossen werden kann, wird oft in solchen unklaren Fällen eine Chemotherapie durchgeführt. Der direkte Weg einer Parasitämie-Detektion mittels Antigen-Nachweis oder Isolierung ist entweder zu wenig sensitiv oder zu zeit- und kostenintensiv und damit für die Schwangerschaftsvorsorge nicht praktikabel (20).

Mit Hilfe molekularbiologischer Nucleinsäure-Direktnachweise ist es möglich, schnell und hochsensitiv Infektionserreger in klinischem Material zu detektieren. Vor allem die Genamplifikation bietet sich zum Erkennen von intrazellulären *T. gondii* spezifischen Nucleinsäuresequenzen in Zellen des peripheren Blutes der Schwangeren an. Diese Methode wird zur Zeit vorzugsweise bei immunsupprimierten und AIDS-Patienten in der Toxoplasmose-Diagnostik von Speziallaboratorien angewandt (6,9,10). Unser Ziel war es festzustellen, ob es mit Hilfe der Genamplifikation möglich ist, die Schwachstellen und Schwierigkeiten der serologischen *T. gondii*-Diagnostik zu überwinden und damit einen direkteren Weg zur Klärung der klinisch relevanten Fragestellung, Parasitämie vorhanden oder nicht, zu gehen.

Der Nachweis des B1-Gens wurde deshalb gewählt, da dieses Gen in 35-facher Kopienanzahl pro Genom vorliegt und damit eine höhere Testsensitivität zu erzielen ist (6, 9, 10, 19). Um diese weiter zu steigern und gleichzeitig eine Spezifitätsüberprüfung des Amplifikates durchzuführen, wurde ein seminestiertes Amplifikationssystem etabliert. Durch Beachtung stringenter Vorsichtsmaßnahmen (14), Durchführung der beiden Amplifikationsansätze in einem zwischendurch nicht geöffneten Reaktionsgefäß und den Einsatz von mehreren Kontrollen bei jedem Testdurchlauf traten falsch positive PCR Ergebnisse, bedingt durch Kontaminationen, nie auf.

Trotz des uns zur Verfügung stehenden relativ kleinen Patientenkollektivs, welches nicht die statistische Situation in der Bundesrepublik widerspiegelt, ist eine gute Korrelation zwischen dem Nucleinsäurenachweis und serologischen Daten zu erkennen. Bei serologisch eindeutig diagnostizierten akuten *T. gondii* Infektion (Gruppe 1) fanden wir stets auch spezifische Nucleinsäure im mütterlichen Blut und damit den Beweis für das Vorlie-

gen einer Parasitämie. In diesen Fällen wurde stets eine sofortige Chemotherapie empfohlen. Bei Seronegativität (Gruppe 4) oder Vorliegen einer Immunität (Gruppe 3) fiel der Nukleinsäurenachweis immer negativ aus. Das Vorliegen einer Parasitämie bei gleichzeitiger Seronegativität („diagnostisches Fenster“) konnte nicht beobachtet werden. Hierfür müßten unserer Meinung nach eine wesentlich größere Anzahl seronegativer Personen untersucht werden.

Die Gruppe 2 repräsentiert jene Fälle, die auf Grund der serologischen Daten keine sofortige Beurteilung bezüglich einer Akutinfektion zulassen. Dieser Fall tritt meistens dann ein, wenn nur eine Serumprobe vorliegt, spezifische IgM und IgG Antikörper gleichzeitig, oft mit einem niedrigen Titer, nachweisbar sind. Wie auch von anderen Gruppen beschrieben, ist der IgM Nachweis alleine nicht geeignet eine Differenzierung zwischen Akut- und alten Infektion zu treffen (1, 16). In solchen Fällen wird meist die Kombination von mehreren verschiedenen Tests, Affinitäts-Bestimmung, die Ermittlung der Titer gegen definierte *T. gondii*-Antigene und die Analyse weiterer Serumproben empfohlen. Mittels der PCR konnten wir in ca. 1/3 der Fälle der Gruppe 2 spezifische *T. gondii* Nukleinsäure nachweisen. Dieser Wert entspricht exakt dem von Hlobil et al. (16) ermittelten Vorderschätzwert (23,4 – 33,3%) für Akutinfektionen seiner positiven IgM- Testergebnisse. Den PCR- positiven Patientinnen wurde eine Chemotherapie empfohlen.

Bei 6 Fällen konnten wir den Therapieverlauf mittels Nukleinsäurenachweis überprüfen. Bei 5 Patientinnen wurde nach 4 – 6 Wochen keine spezifische *T. gondii* Nukleinsäure mehr detektiert. In einem Fall war auch nach 3 Monaten noch wiederholt die PCR positiv. Eine Erklärung dafür könnte das Vorliegen einer Therapie-resistenten Mutante sein oder es wurden nur DNA-Bruchstücke mittels der Genamplifikation nachgewiesen. Darüber hinaus wäre eine insuffiziente Therapiedurchführung von seiten der Patientin ebenfalls möglich.

Auf Grund dieser Daten führen wir in unserem Labor die in Abbildung 5 gezeigte Toxoplasmose-Stufendiagnostik bei Schwangeren routinemäßig durch. Mit Hilfe des molekularbiologischen Direktnachweises kann in den meisten Fällen durch die Untersuchung von nur 1 Serumprobe in Kombination mit der Serologie eine Beurteilung bezüglich einer aktiven *T. gondii* Infektion getroffen werden. Dadurch kann frühzeitig mit der Chemotherapie begonnen werden und damit die Gefahr einer transplazentaren Infektion stark minimiert werden. Andererseits können in der Mehrzahl der Fälle unnötig durchgeführte Therapien und die damit verbundenen Nebenwirkungen und seelischen Belastungen vermieden werden.

#### Anschrift des Autors:

Dr. Wolfgang Tuma  
Gemeinschaftspraxis für Laboratoriumsmedizin  
Berghäuserstraße 295  
45559 Recklinghausen

#### Danksagung:

Die Autoren danken Frau Sabine Jeuthe und Frau Petra Lakenberg für die ausgezeichnete technische Assistenz.

#### Literatur:

1. Roos, T.; Martius, J.; Gross, U.; Schrod, L. (1993): Systematic serologic screening for toxoplasmosis in pregnancy. *Obstetrics & Gynecology* 81, 243-250.
2. Aspöck, H.; Pollak, A. (1992): Prevention of prenatal toxoplasmosis by serological screening of pregnant women in Austria. *Scand. J. Infect. Dis.* 84, 32-38.
3. Sandow, D.; Bretschneider, R.; Bretschneider, M. et al. (1989): Hochrechnung zur Häufigkeit von primär Toxoplasma-infizierten Schwangeren und konnatalen Toxoplasmosen. *Z. Klin. Med.* 44, 1869-1873.
4. Maass, G.; Giesing, M. (1989): Toxoplasma-Infektionen. Untersuchungen zur Häufigkeit in Deutschland. *Münch. med. Wschr.* 131, 564-567.
5. Aspöck, H.; Flamm, H.; Picher, O. (1986): Die Toxoplasmose-Überwachung während der Schwangerschaft – 10 Jahre Erfahrung in Österreich. *Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol* 8, 105-113.
6. Daffos, F.; Forestier, F.; Capella-Pavlovsky, M. et al. (1988): Prenatal management of 746 pregnancies at risk for congenital toxoplasmosis. *N. Engl. J. Med.* 318, 271-275.
7. Janitschke, K.; Wahl, A.; Dudenhausen, J. (1993): Nachweis von Toxoplasma-IgA-Antikörpern mittels Enzymimmunoassay. *Klin. Lab.* 39, 587-590.
8. Janitschke, K.; Bug, C.; Stoffels, G. (1993): Marktübersicht und Bewertung kommerzieller Reagenzien zum Nachweis von Parasiten. VI. Toxoplasma-IgA-Antikörper. *Lab. med.* 17, 579-581.
9. Parmley, S.; Goebel, F.; Remington, J. (1992): Detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid from AIDS patients by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30, 3000-3002.
10. Ostergaard, L.; Nielsen, A.; Black, F. (1993): DNA Amplification on cerebrospinal fluid for diagnosis of cerebral toxoplasmosis among HIV-positive patients with signs or symptoms of neurological disease. *Scan. J. Infect. Dis.* 25, 227-237.
11. Cazenave, J.; Forester, F.; Bessieres, M. et al. (1992): Contribution of a new PCR assay to the prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Prenatal Diagnosis* 12, 119-127.
12. Grover, C.; Thulliez, P.; Remington, J. et al. (1990): Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid. *J. Clin. Microbiol.* 28, 2297-2301.
13. Zeillinger, R.; Schneeberger, C.; Speiser, P. et al. (1993): A simple method for isolation of DNA from blood clots suited for use in PCR. *BioTechniques* 14, 202-203.
14. Kwok, S.; Higuchi, R. (1989): Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339, 237-238.
15. Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989): *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
16. Hlobil, H.; Naser, K.; Niu, A. et al. (1993): Toxoplasmose- Screening in der Schwangerschaft-Vergleich unterschiedlicher Untersuchungsstrategien für eine Stufendiagnostik. *Klin. Lab.* 39, 261-273.
17. Janitschke, K.; Hummel, M.; Roth, A. et al. (1993): Probleme der Laboratoriumsdiagnostik der Toxoplasmose bei einem Herztransplantationspatienten. *Klin. Lab.* 39, 581-586.
18. Burg, J.; Grover, C.; Pouletty, P. et al. (1989): Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 27, 1787-1792.
19. Lebech, M.; Lebech, A.-M.; Nelsing, S. et al. (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.
20. Haßl, A.; Picher, O.; Aspöck, H. (1987): Untersuchungen über die Bedeutung des Nachweises von zirkulierendem Antigen für die Aufdeckung einer Erstinfektion mit *T. gondii* während der Schwangerschaft. *Mitt. Österr. Ges. Trop. Med. Parasit.* 9, 91-94.
21. Tuma, W.; Bünger, G.; Haßl, A. et al. (1994, in Vorbereitung).
22. Seelig, R.; Renz, M.; Böttner, C. et al. (1991): Tuberkulose-Schnelldiagnostik mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). *Immun. Infekt.* 19, 179-185.