

Nachweis von HCMV-DNA im Kammerwasser zur Diagnosesicherung der viralen Retinitis

J. Garweg¹, T. Fenner², H. Schmitz³ und M. Böhnke⁴

¹ Universitäts-Augenklinik (Direktor: Prof. Dr. J. Draeger), Martinstraße 52, W-2000 Hamburg 20, Bundesrepublik Deutschland

² Institut für Klinik-Hygiene (Direktor: Prof. Dr. F. Daschner) der Universität, Hermann-Herder-Straße 11, W-7800 Freiburg i.Br., Bundesrepublik Deutschland

³ Virologische Abteilung, Bernhard-Nocht-Institut für Schiffs- und Tropenkrankheiten (Direktor: Prof. Dr. H. Schmitz), Bernhard-Nocht-Straße 74, W-2000 Hamburg 4, Bundesrepublik Deutschland

⁴ Universitäts-Augenklinik (Direktor: Prof. Dr. F. Körner), Inselspital, CH-3010 Bern, Schweiz

Identification of HCMV-DNA in the aqueous humour in the diagnosis of viral retinitis

Zusammenfassung. Die Differentialdiagnose der viralen Retinitis erfolgt im wesentlichen nach der Einschätzung des klinischen Befundes durch den Augenarzt und kann endgültig erst immunhistologisch gestellt werden. Wir stellen eine neue diagnostische Methode, die Polymerasekettenreaktion (PCR), vor, mit der bereits früh die Diagnose gesichert werden kann. Die Methode basiert auf der Amplifizierung eines bestimmten Abschnittes der gesuchten DNA, die dann in einem zweiten Schritt hochspezifisch nachgewiesen werden kann. In die Untersuchung wurden 5 Patienten mit dem klinischen Bild einer frischen Zytomegalieretinitis bei Aids und 10 Kontrollpersonen eingeschlossen. Wir untersuchten Konjunktival- und Hornhautepithel, Vorderkammerpunktate sowie Urin und Sputum auf das Vorhandensein zytomegaloviraler DNA. Parallel dazu wurden die Seren der Patienten auf das Vorhandensein von CMV-IgM-Antikörpern untersucht, die jedoch infolge des Immundefektsyndroms in keinem Fall nachgewiesen werden konnten. Mit der PCR konnten wir in keinem Fall in der Kontrollgruppe, jedoch in 4 von 5 Vorderkammerproben von Patienten mit dem klinischen Bild einer CMV-Retinitis CMV-Genom nachweisen und damit die Diagnose bestätigen. In einem Fall fanden wir CMV-DNA zusätzlich im Urin, in einem weiteren in Urin und Sputum. In Konjunktival- und Hornhautepithel fanden wir CMV-Genom nicht. Die Ergebnisse belegen den diagnostischen Wert der PCR-Methode in der gezielten Uveitidsdiagnostik.

Schlüsselwörter: Polymerasekettenreaktion (PCR) – Uveitidsdiagnostik – Vorderkammerpunktat – Virale Retinitis – Zytomegalieretinitis – Akute Retinaneekrose – Aids

Summary. The differential diagnosis of viral retinitis is mainly based on the evaluation of the clinical findings by the ophthalmologist; for confirmation of the diagnosis, immunohistological testing is necessary. We present the method of polymerase

chain reaction (PCR) as a new diagnostic tool in the examination of viral retinitis. The method is based on the selective amplification of a defined segment of viral DNA, which can in a second step be specifically detected by hybridization. Five patients with the typical clinical picture of a fresh cytomegaloviral retinitis of recent origin due to Aids and ten normal healthy controls were included in the study. We looked for CMV-genome in conjunctival and corneal epithelium, anterior chamber punctates, urine and sputum. Serum samples from the same patients were tested for CMV-IgM antibodies as sign of systemic immune response. They were all negative due to the systemic immune deficiency syndrom of these patients. We did not find CMV genome in any case in the control group or in any of the conjunctival and corneal epithelial samples, but we did find it in four of five anterior chamber punctates of patients with the clinical picture of CMV retinitis. We found CMV-DNA additionally in the urine of one patient and in urine and sputum of another. These results show the high value of the method of polymerase chain reaction in the diagnosis of uveitis.

Key words: Polymerase chain reaction (PCR) – Uveitis diagnosis – Anterior chamber punctate – Viral retinitis – Cytomegalovirus retinitis – Acute retina necrosis – Aids

Die Zytomegalieinfektion wird als Ausdruck einer schweren Schädigung des Immunsystems bei Patienten mit Tumorleiden, unter immunsuppressiver Therapie und als opportunistische Infektion bei Aids beobachtet. Klinisch manifestiert sie sich als Hepatitis, Enteritis, Pneumonie und Retinitis [16]. Serologische Untersuchungen können zur Bestätigung der Diagnose hilfreich sein. Die Immunantwort ist jedoch in der Regel deutlich abgeschwächt, sie kann sogar vollständig fehlen [16]. Die diagnostische Einordnung der Retinitis basiert somit vor allem auf der Einschätzung des klinischen Befundes durch den Augenarzt [12] (Abb. 1). Dabei ist die Diagnose durchaus nicht immer eindeutig zu stellen [1, 5, 7, 13, 23]. Denn immer häufiger werden gleichzeitige Koinfektionen auch mit anderen Erregern beobachtet [23] (Abb. 2).

Vortrag gehalten auf der 88. Tagung der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft in Baden-Baden

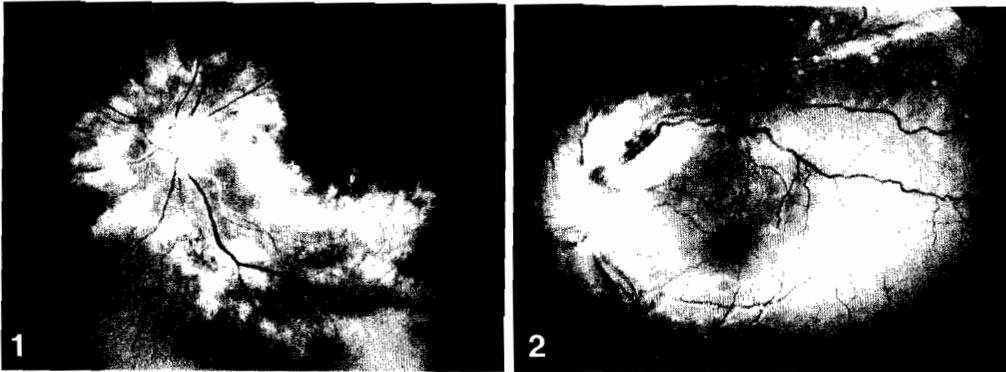


Abb. 1. Das klinische Bild der CMV-Retinitis, typischer Befund

Abb. 2. CMV-Retinitis und gleichzeitig aufgetretene Chorioretinitis anderer Ursache, untypisches Bild

Die Diagnose einer CMV-Retinitis hat für den Patienten erhebliche Konsequenzen, da dieser dann bis zur Besserung seiner Immunlage, also in der Regel lebenslänglich, jeden Tag Virustaticainfusionen zur Rezidivprophylaxe benötigt [8, 12, 14, 15, 17, 25].

Bei einem ausgewählten Patientenkollektiv versuchten wir, die klinische Diagnose der Zytomegalieretinitis durch den Nachweis zytomegaloviraler DNA mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion, kurz PCR genannt, zu objektivieren.

Material und Methode

Mit der Methode der PCR untersuchten wir Konjunktival- und Hornhautepithel, Vorderkammerpunkate sowie Urin und Sputum von 5 Patienten mit der klinischen Diagnose einer typischen frischen Zytomegalieretinitis bei Aids (Tabelle 1b).

Als Kontrollkollektiv diente eine Gruppe immunologisch unauffälliger Patienten, die wegen einer Katarakt oder Hornhauttrübungen an den Augen operiert wurden (Tabelle 1a).

Die PCR ist eine Methode zum Aufspüren von DNA-Fragmenten mit bekannter DNA-Sequenz. Dabei kann wegen der hohen Spezifität der Methode noch das Vorhandensein weniger DNA-Fragmente im Versuchsansatz nachgewiesen werden [21].

Tabelle 1. Das Patientenkollektiv

Patient	Alter	Geschlecht	Diagnose
<i>Kontrollgruppe</i>			
1	73	m	Katarakt
2	60	m	Katarakt
3	22	m	Z. n. Keratitis
4	75	m	Katarakt
5	70	m	Katarakt
6	80	m	Katarakt
7	75	m	Katarakt
8	62	w	Katarakt
9	69	m	Katarakt
10	77	m	Katarakt
<i>Untersuchungsgruppe</i>			
1	25	w	Unklare Chorioretinitis und HCMV-Retinitis
2	30	m	z.B. HCMV-Retinitis
3	42	m	HCMV-Retinitis
4	49	m	HCMV-Retinitis
5	45	m	z. n. Retinochorioiditis HCMV-Retinitis

Die Reaktion läuft im wesentlichen in 3 Schritten ab, die sich regelmäßig wiederholen:

Im ersten Schritt wird das Virusgenom, das als Doppelstrang-DNA vorliegt, bei 95°C in 2 Einzelstränge aufgetrennt [9, 21].

Der zweite Schritt ist die Anbindung zweier komplementärer synthetisch hergestellter Startermoleküle (Primer) an jeweils einen der beiden im ersten Schritt getrennten Ausgangs-DNA-Stränge. Dies ist jedoch nur dann möglich, wenn die Primer eine zu der Ausgangs-DNA vollständig komplementäre DNA-Sequenz aufweisen und geschieht bei einer Reaktionstemperatur von 58°C.

Im dritten Schritt wird das zwischen den Primern liegende Zwischenstück entlang der Ausgangs-DNA synthetisiert.

Dies geschieht bei einer Reaktionstemperatur von 72°C unter Zugabe der DNA-Polymerase. Die Polymerase ist ein Enzym, das aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen wird, sein Wirkoptimum bei 72°C hat und DNA- oder RNA-spezifisch ist. Dieses Enzym sorgt für die Verlängerung der Oligonukleotidprimer entlang der Ausgangs-DNA durch die Anlagerung der komplementären Desocynukleotide dATP, dGTP, dCTP und dTTP, die in dem Reaktionsansatz vorhanden sind. Dieser Schritt des künstlichen DNA-Fragmentaufbaus heißt Elongation und dauert in dem von uns durchgeführten Nachweisverfahren 90 Sekunden.

Durch jede Wiederholung der 3 Amplifikationsschritte wird die Anzahl der im Reaktionsansatz vorhandenen DNA-Doppelstränge verdoppelt, so daß nach x Zyklen bis zu 2^x DNA-Doppelstränge synthetisiert sind. Die DNA-Amplifikation kann bis zu 50mal wiederholt werden. Damit wird die DNA mit konventionellen Methoden wie der Gelelektrophorese nachweisbar [4, 6, 10, 19, 22]. Wir ließen in unserem Versuchsprotokoll den Ansatz insgesamt 30 Zyklen durchlaufen.

Der Versuchsansatz enthält

- 10 µl Kammerwasser,
- 75 pM jedes Primers (MIE-Region des HCMV-Genoms),
- je 200 µM der Nukleotide dGTP, dATP, dTTP und dCTP,
- 10 nM Trispuffer (pH 8,3),
- 50 mM KCl und 2,5 mM MgCl₂,
- 0,02% Gelatine und
- 2 Einheiten *Thermus-aquaticus*-DNA-Polymerase (Perkin-Elmer-Cetus, Emeryville, California),
- aufgefüllt auf ein Endvolumen von 50 µl mit aqua dest.

Das Versuchsprotokoll beinhaltet

1. die Denaturierung bei 95°C für 30",
2. die Anlagerung der Primer bei 58°C für 30",
3. die Elongation bei 72°C für 90",
4. werden 30 Zyklen durchlaufen.

Wir amplifizierten 2 verschiedene DNA-Bereiche mit einer Länge von 435 und 110 Basenpaaren aus der MIE-Region (main immediately early region) des humanen CMV-Genoms [11] (Tabelle 2). Die MIE-Region ist die für den Proteinaufbau des Virus verantwortliche Region des Virusgenoms.

Zunächst wurde die Amplifikation in dem von Demmler et al.

Tabelle 2. Basensequenzen der verwandten Primer

Primer	Sequenzen (5' nach 3')	Produktlänge des Amplifikates (bp)	Bereich
MIE-4*	CCAAGCGGCCTCTGATAACCAAGCC	435	1142-1166
MIE-5*	CAGCACCATCCTCCTCTTCCTCTGG	435	1576-1552
MIE-5's	AGTGTGGATGACCTACGGGCCATCG	110	1267-1291
MIE-3's	GGTGACACCAGAGAATCAGAGGAGC	110	1376-1352
Marker	GAGGCTATTGTAGCCTACACTTTGG		1312-1336

**Abb. 3.** Die ³²P-markierten Banden nach Amplifikation der Vorderkammerproben von Patienten mit CMV-Retinitis (Färbung eines Röntgenfilms)

1988 [4] beschriebenen Virusgenombereich mit den von ihm angegebenen Primern (Basen 1142 - 1166 und 1576 - 1552) durchgeführt. Das Amplifikat wurde spezifisch mit einem synthetisch hergestellten und mit ³²P gelabelten Oligonukleotid (2×10^5 cpm, aus dem Bereich 1312 - 1336 der Basensequenz) markiert [4].

Die Anlagerung des markierten Oligonukleotids kann nur bei vollständiger komplementärer Übereinstimmung aller Basen in dem amplifizierten und nachzuweisenden Bereich der HCMV-DNA erfolgen [9, 10, 22].

Der Versuchsansatz wird schließlich in einem 15% Polyacrylamidgel (Mini-Elektrophorese-Kammer, Fa. Biorad, München) über 25 min aufgetrennt, um die gebundene radioaktiv markierte Probe von der freien Probe zu trennen. Die Auswertung erfolgt über spezifische Bandenmuster auf einem Röntgenfilm und wird durch die Schwärzung des Films sichtbar [10, 22] (vergl. Abb. 3).

Außerdem untersuchten wir bei gleichen technischen Vorgehen die Amplifikation eines 110 Basenpaare langen Amplifikates ebenfalls aus der MIE-Region des HCMV-Genoms. Die Markierung erfolgte mit dem gleichen ³²P-gelabelten Oligonukleotid (1312 - 1336)

Ergebnisse

Ein HCMV-DNA-Nachweis gelang in keinem Fall in den Materialien der Kontrollgruppe.

In konjunktivalem und Hornhautepithel konnte CMV-DNA ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

Zunächst versuchten wir das aus der Literatur bekannte 435 bp lange HCMV-DNA-Amplifikat herzustellen. Dabei fanden wir kein positives Ergebnis ohne einen klinischen eindeutigen Befund, jedoch nur in 3 der 5 klinisch als CMV-Retinitis eingeschätzten Fälle ein positives Ergebnis (HCMV-DNA-Nachweis) im Vorderkammerpunktat mit der PCR. Deshalb untersuchten wir an den Vorderkammerpunktaten zusätzlich die Amplifikation eines 110 Basenpaare langen Ge-

Tabelle 3. HCMV-DNA-Nachweis mit der PCR ($n = 5$)

	<i>n</i>	[%]
Urin	2	40
Sputum	1	20
Konj.-Epithel	0	0
HH-Epithel	0	0
VK-Punktat ^a	4	80

^aDie Vorderkammerpunktate von 10 gesunden Kontrollpersonen waren sämtlich negativ

nomfragmentes aus dem gleichen Bereich der MIE-Region des HCMV-Genoms.

Auch hier fanden wir im Vergleich mit den klinischen Befunden kein falsch-positives PCR-Ergebnis, jedoch 4 von 5 klinisch typischen Fällen mit der PCR bestätigt. Wenn dies in höheren Fallzahlen bestätigt werden kann, entspricht es einer Sensitivität von 80% bei einer Spezifität von 100%. Im fünften Fall gelang der HCMV-DNA-Nachweis aus der Vorderkammerprobe nicht (Tabelle 3).

Bei einem Patienten fanden wir mit der PCR HCMV-DNA zusätzlich im Urin, bei einem weiteren Patienten in Urin und Sputum (Tabelle 3).

In Abb. 3 sind in den Spuren 3, 4 und 6 die gebundenen Oligonukleotide dargestellt, die das Vorliegen HCMV-DNA-spezifischer Fragmente zeigen. In Bande 5 ist die negative Pufferprobe zu finden. Die breite Bande unten stellt die Front der freien durchgelaufenen Radioaktivität dar (Abb. 3).

Diskussion

Die PCR ist eine hochempfindliche molekularbiologische Methode zum Nachweis bekannter Strukturen [9, 10, 19, 22]. Wir beschreiben hier die Anwendung in der Uveitidiagnostik zum Nachweis der Zytomegalieretinitis in vivo.

Dieser war bisher nur an Gewebeproben, bei der Retinitis folglich erst post mortem, am sichersten immunhistologisch möglich [3, 7, 22, 23].

Die Anwendung der PCR zur Diagnostik der CMV-Infektion an post mortem gewonnenen frischen Geweben und Paraffinschnitten und ein Vergleich mit immunhistochemischen Methoden [3, 23] sowie aus peripheren Blutzellen [26] wurde vor kurzem vorgestellt. Dabei wurden die hohe Spezifität und Sensitivität der Methode herausgestellt, die dem Vergleich mit der Immunhistochemie, verschiedenen Immunoassays und der Viruskultur standhält [21], was die eigenen Ergebnisse untermauern.

Die Basensequenz der zu verwendenden Primer hängt ab von der DNA-Sequenz des nachzuweisenden Erregers und sollte so gewählt werden, daß Überlappungen mit Sequenzen artverwandter Spezies ausgeschlossen sind. Mögliche Ausgangssequenzen sowie Überlappungen mit anderen Sequenzen kann man aus DNA-Libraries erfahren, die kommerziell zugreifbar sind und ständig aktualisiert werden [11].

Die von uns gewählten Primer zeigen in Homologievergleichen anhand der bekannten Genkarten eine Übereinstimmung von unter 90% zu anderen als der gesuchten DNA, insbesondere auch verwandter Viren aus der Herpesfamilie (HSV, VZV), die die wichtigste Differentialdiagnose der Zytomegalieretinitis darstellen. Damit ist trotz der kurzen Amplifikate von 110 bzw. 435 Basenpaaren Länge die Amplifikation von Fremd-DNA ausgeschlossen [4, 11, 22]. Die Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes hat für die Spezifität und Sensitivität einer Methode eine wesentliche Bedeutung. Je kürzer der zu amplifizierende Bereich gewählt wird, desto höher ist die Sensitivität, aber desto geringer auch die Spezifität der Methode [22].

In unseren Untersuchungen zeigte die Amplifikation an dem 110 Basenpaare langen Genomfragment bei 30 Amplifikationszyklen eine deutlich höhere Sensitivität als die Amplifikation an dem in der Literatur beschriebenen 435 Basenpaare langen Genomfragment bei – soweit bei der geringen Anzahl untersuchter Materialien festzustellen – vergleichbarer Spezifität [4].

Die negativen PCR-Ergebnisse an Hornhaut- und Konjunktivalepithel lassen vermuten, daß es sich bei der oft parallel zur Retinitis beobachteten Konjunktivitis eher um eine konjunktivale Vaskulitis als um eine Erkrankung des Oberflächenepithels durch die Zytomegalieviren handelt.

Bei systemischen CMV-Infektionen wird das Virus nur in einem relativ geringen Prozentsatz in Urin und Sputum nachgewiesen [4]. Insofern überraschen die nur vereinzelt positiven Befunde mit der PCR in Urin und Sputum nicht, sind aber andererseits als Indiz für die systemische Beteiligung mit ubiquitärer Virusstreuung zu verstehen.

Wenn eine Sekundärkontamination des Ansatzes mit der gesuchten DNA durch geeignete Kontrollen ausgeschlossen werden kann, bedeutet die hohe Spezifität der Markierung durch ein gelabeltes Oligonukleotid, das selektiv nur den amplifizierten Genombereich markiert, den Nachweis des Vorhandenseins der gesuchten DNA im Versuchsansatz [22].

Wegen der hohen Sensitivität der Methode (– noch das Vorhandensein einzelner weniger Genomfragmente kann nachgewiesen werden –) muß an die Möglichkeit einer sekundären Verunreinigung des Versuchsansatzes mit dem gesuchten Material gedacht werden. Hier liegt der wesentliche Schwachpunkt der PCR-Technik. In unseren Versuchsreihen wurden immer Pufferkontrollen ohne DNA mituntersucht, die negativ blieben. Somit kann eine Einschleppung von Fremd-DNA und Sekundärkontamination als ausgeschlossen betrachtet werden (Abb. 3, Bande 5) [9]. In keinem der untersuchten Seren waren IgM-Antikörper gegen HCMV nachweisbar. Die durchweg negativen Resultate sind im Sinne des Fehlens einer spezifischen Immunantwort der Plasmazellen der immuninkompetenten Patienten zu verstehen [21, 22]. Der Nachweis der DNA aus Vorderkammerpunktionen bei der klinischen Diagnose einer Retinitis legt die Vermutung nahe, daß die CMV-Erkrankung nicht nur die Retina, sondern die ge-

samte Uvea befällt. So ist wohl auch die in der Regel bei Patienten mit CMV-Retinitis zu beobachtende Ausschwemmung von Pigmentzellen und Ablagerung auf der Hornhautrückfläche durch die Schädigung der vorderen Uvea, insbesondere auch des Pigmentepithels, durch CMV zu erklären [20]. Auffällig ist allerdings, daß sich lediglich eine geringe Schrankenstörung in der vorderen Uvea findet (Tyndall-Phänomen ist in der Regel nur in der Akutphase schwach positiv). Schließlich darf gerade im Fall der Zytomegalieinfektion nicht vergessen werden, daß oft eine erhebliche Diskrepanz zwischen dem Nachweis der Erreger im Untersuchungsgut und den klinischen Beschwerden der Patienten besteht [5, 16]. Da das Virus sich bis auf die kurzen Viraemiephasen nur innerhalb der infizierten Zellen findet, sollten zur Auffindung möglicher Virusreservoirs weitere Körperzellen mit der PCR untersucht werden. Dabei ist auch an die zelluläre DNA von Blutzellen zu denken, wie von Laehr et al. [19] für HIV und von Shibata et al. [26] für HCMV bereits gezeigt werden konnte.

Die Methode der PCR wird nicht nur in der Erforschung der genetischen Basis von Enzymdefekten [2, 28], der Feststellung des HLA-Typs [6, 27] und der forensischen und ethnologischen Forschung [24], sondern auch in der Ophthalmologie zunehmend an Bedeutung gewinnen, da mit kleinsten Materialmengen definierte DNA-Strukturen und somit zum Beispiel das Vorhandensein bestimmter Erreger nachgewiesen werden können.

Bei unklarer Uveitis bietet die PCR vielleicht bald einen wichtigen weiteren Schritt zur Diagnose. Die PCR erreicht mit der von uns angewandten Methode eine Spezifität von 100% bei einer Sensitivität von 80% in Vorderkammerproben mit frischer CMV-Retinitis.

Zur Einschätzung ihrer Bedeutung sind höhere Fallzahlen und die Untersuchung auch anderer Erreger erforderlich.

Für eine breite klinische Nutzbarkeit der Methode in der Uveitisdiagnostik fehlen bisher die Erfahrungen in der Diagnostik von Kammerwasser mit der PCR für weitere Viren der Herpesfamilie. Wegen des hohen technischen Aufwandes und der zahlreichen Fehlermöglichkeiten bei falscher Handhabung der Methode ist die PCR als Routinemethode in der Ophthalmologie zur Zeit noch nicht einsetzbar, in klinisch unklaren Fällen kann sie jedoch bereits jetzt eine Schlüsselfunktion einnehmen.

Literatur

1. Bloom JN, Palestine AG (1988) The diagnosis of cytomegalovirus retinitis. *Ann Intern Med* 109:963-969
2. Boehm CD (1989) Use of polymerase chain reaction for diagnosis of inherited disorders. *Clin Chem* 35:1843-1848
3. Chehab FF, Xiao X, Kan YW, Yen TS (1989) Detection of cytomegalovirus infection in paraffinembedded tissue specimens with the polymerase chain reaction. *Mod Pathol* 2:75-78
4. Demmler GJ, Buffone GJ, Schimbor CM, May RA (1988) Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using polymerase chain reaction. *J Inf Dis* 158 6:1177-1184
5. Drew WL, Buhles W, Ehrlich KS (1988) Herpesvirus infections (cytomegalovirus, herpes simplex virus, varicella-zoster virus). How to use ganciclovir (DHPG) and acyclovir. *Infect Dis Clin North Am* 2:495-509
6. Eisenstein BI (1990) The polymerase chain reaction: a new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *N Engl J Med* 322:178-181

7. Emanuel D, Peppard J, Chehimi J, Hammerling U, O'Rheilly R (1987) The diagnostic, prophylactic, and therapeutic uses of monoclonal antibodies to human cytomegalovirus. *Transpl Proc [Suppl 7]* 19:132-137
8. Erice A, Chou S, Biron KK, Stanat SC, Balfour HH jr, Jordan MC (1989) Progressive disease due to ganciclovir-resistant cytomegalovirus in immunocompromised patients. *N Engl J Med* 320:289-293
9. Erlich HA, Gelfand DH, Saiki RK (1988) Specific DNA Amplification. *Nature* 331:461-462
10. Fenner F, Schmitz H (1991) Sensitivität und Spezifität beim Nachweis von HIV-1-DNA durch Polymerase Kettenreaktion. *Ärztl Laboratorium* 37 (im Druck)
11. Fleckenstein B, Muller I, Collins J (1981) Cloning of the complete human cytomegalovirus genome in cosmids. *Gene* 18:39-46
12. Garweg J, Böhnke M, Stellbrink HJ (1991) Untersuchungen zur planimetrischen Verlaufsbeurteilung der HCMV-Retinitis unter Therapie mit Ganciclovir bei Patienten mit AIDS. *Fortschr Ophthalmol* 88:44-48
13. Henderly DE, Freeman WR, Smith RE, Causey D, Rao NA (1987) Cytomegalovirus retinitis as the initial manifestation of the acquired immune deficiency syndrome. *Am J Ophthalmol* 103:316-320
14. Jabs DA, Wingard JR, Bustros S de, Miranda P de, Saral R, Santos GW (1986) BW B759U for cytomegalovirus retinitis: intraocular drug penetration. *Arch Ophthalmol* 104:1436-1437
15. Jabs DA, Enger C, Bartlett JG (1989) Cytomegalovirus retinitis and acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Ophthalmol* 107:75-80
16. Jacobsen MA, Mills J (1989) Serious cytomegalovirus disease in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Ann Intern Med* 108:585-594
17. Jacobson MA, O'Donnell JJ, Brodie HR, Wofsy C, Mills J (1988) Randomized prospective trial of ganciclovir maintenance therapy for cytomegalovirus retinitis. *J Med Virol* 25:339-349
18. Kotler DP, Culpepper-Morgan JA, Tierney AR, Klein EB (1986) Treatment of disseminated cytomegalovirus infection with 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine: evidence of prolonged survival in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *AIDS Res* 2:299-308
19. Laehr D von, Hufert FT, Fenner TE, Schwander S, Dietrich M, Schmitz H, Kern P (1990) CD 34⁺ hematopoietic progenitor cells are not a major reservoir of the human immunodeficiency virus. *Blood* 76:1281-1286
20. Miceli MV, Newsome DA, Novak LC, Beuerman RW (1989) Cytomegalovirus replication in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Curr Eye Res* 8:835-839
21. Olive DM, Al-Mufti S, Simsek M, Fayez H, al Nakib W (1989) Direct detection of human cytomegalovirus in urine specimens from renal transplant patients following polymerase chain reaction amplification. *J Med Virol* 29:232-237
22. Olive DM, Simsek M, Al-Mufti S (1989) Polymerase chain reaction assay for detection of human cytomegalovirus. *J Clin Microbiol* 27:1238-1242
23. Qavi HB, Green MT, SeGall GK, Font RL (1989) Demonstration of HIV-1 and HHV-6 in AIDS-associated retinitis. *Curr Eye Res* 8:379-387
24. Remick DG, Kunkel SL, Holbrook EA, Hanson CA (1990) Theory and applications of the polymerase chain reaction. *Am J Clin Pathol [Suppl 1]* 93:49-54
25. Robinson MR, Teitelbaum C, Taylor-Findlay C (1989) Thrombocytopenia and vitreous hemorrhage complicating ganciclovir treatment. *Am J Ophthalmol* 107:560-561
26. Shibata D, Martin WJ, Appleman MD, Causey DM, Leedom JM, Arnheim N (1988) Detection of cytomegalovirus DNA in peripheral blood of patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 158:1185-1192
27. Tiercy JM, Jeannet M, Mach B (1990) A new approach for the analysis of HLA class II polymorphism: 'HLA oligotyping'. *Blood Rev* 4:9-15
28. Triggs-Raine BL, Feigenbaum ASJ, Natowicz CB, Skomorowski MA, Schuster SM, Clarke JTR, Mahuran DJ, Kolodny EH, Gravel RA (1990) Screening for carriers of Tay-Sachs-Disease among Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* 323:6-12

