SZAKÁL EVELYN DÓRA

A bakteriális vérhas kórokozóinak, a *Shigella* és enteroinvazív *Escherichia coli* törzsek diagnosztikája környezeti és klinikai mintákból

Tézisek

PhD Program: Bakteriális fertőzések molekuláris pathogenezise
Programvezető: Prof. Dr. Emődy Levente
Témavezető: Prof. Dr. Pál Tibor

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvosi Kar
Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet

Pécs 2003

1. ELŐZMÉNYEK

1.1. A bakteriális vérhas pathomechanizmusa és járványtana

A bakteriális vérhas, melyet a Shigellák és az un. enteroinvazív *Escherichia coli* (EIEC) törzsek okoznak, világszerte jelentős közegészségügyi probléma. Évente 200 millió megbetegedéssel és 650 ezer halálesettel kerül bizonyítottan összefüggésbe. Elsősorban a fejlődő országokban, a hasmenéses megbetegedések egyik legfontosabb formája, lázzal és toxémiával jár, jellemző a vastagbél nyálkahárthájának fekélyes gyulladása, a széklettel gyakran vér és/vagy nyálka ürül.

Az *Enterobacteriaceae* családba tartozó *Shigella* fajok és a pathogén enteroinvazív *E. coli* (EIEC) törzsek megegyező pathomechanizmussal okozzák a vérhast, a bélfal nyálkahártya hámsejtjeinek inváziója révén. Az invázió egyes lépései: 1, a baktérium behatolása a nem fagocitáló hámsejtekbe, 2, a baktérium megsokszorozódása a sejtben, 3, intra és intercelluláris terjedése, 4, gazdasejt elpusztítása. Az invazivitáshoz szükséges polipeptideket (inváziós plazmid antigének: IpaA, B, C, D) egy 140 kb nagyságú plazmid egy régiója kódolja.

A terjedés alacsony dózissal (10-100 baktériumsejt), általában közvetlen kontaktussal, a feco-orális úton történik. Emellett egyre növekvő számban fordulnak elő víz, és élelmiszer okozta járványkitörések. A shigellózis, bár a fejlődő országokban ölt járványméreteket, a fejlett ipari országokban is felbukkan. A fejlődő országok elsősorban trópusi klímájuk és a nem megfelelő higiéniás viszonyok miatt alkalmasak a shigellózis járványszerű terjedésére. A *Shigella flexneri* fertőzések endémiásak, a S. *dysenteriae* pedig pusztító járványokat okoz. A shigellózis a fejlődő országokban a gyermek-

halandóság egyik legfontosabb oka. A megelőzés és kontrol döntően közegészségügyi intézkedéseken és a klinikai esetek kezelésén alapul, mivel hatékony vakcina kidolgozására még nem került sor. A prevenciót sürgeti az antibakteriális szerekkel szemben multirezisztens törzsek megjelenése, és az HIV fertőzések megnövekedése.

1.2. A vérhas diagnosztikája

Mint minden fertőző betegség kapcsán, a bakteriális vérhas esetén is a gyors, olcsó, érzékeny és specifikus mikrobiológiai diagnosztika elengedhetetlen feltétele a beteg kezelésének, a megelőzésnek, a járványtani helyzet felmérésének és a szükséges preventív intézkedések meghozatalának. A kórkép két kórokozó csoportja közül a shigellák diagnosztikája kidolgozott, viszonylag egyszerű a hagyományos biokémiai és szerológiai módszerekkel, bár - különösen környezeti és élelmiszer minták esetén - nem kellően érzékeny.

Az enteroinvazív *Escherichia coli* (EIEC) törzsek a hagyományos diagnosztika számára csak igen korlátozott mértékben hozzáférhetőek, tekintve, hogy nem rendelkeznek a normál flóra tagjaitól őket egyértelműen elkülönítő biokémiai és szerológiai bélyegekkel.

A Shigellák diagnosztizálására a rutindiagnosztikai laborok mérsékelten szelektív szilárd táptalajokkal, mint az eozin-metilénkék (EMB) és a MacConkey agar (MAC), és fokozott szelektivitású táptalajokkal, mint a deoxykolát-citrát (DC), xilóz-lizin dekarboxiláz (XLD), és a Salmonell-Shigella agar (SS) bírnak. A folyékony táptalajban való dúsítás nem, vagy kevésbé terjedt el a gyakorlatban. Nagyon korlátozottak ismereteink az

EIEC törzsek szelektív tenyésztésének lehetőségeiről. Silva szerint az EIEC növekedését az SS agar támogatta a legjobban.

A *Shigella* törzsek virulenciája genetikai hátterének feltárásával párhuzamosan terjedtek el a molekuláris módszerek. A DNS hibridizációt elsősorban makrokolónia telep-blot formájában használják a mintákból véletlenszerűen válogatott klónokon. A különböző PCR rendszerek közül a legkiterjedtebben a plazmidon és kromoszómán is több kópiában megtalálható *ipa*H génre specifikus primereket használják. A mikrobák virulencia faktorainak megismerésével nyílt meg annak lehetősége, hogy a pathogén baktériumokat a virulencia specifikus antigénjeik révén ismerjék fel. Ezen immunológiai eljárások előnye, hogy általában nem igénylik a molekuláris módszerekhez szükséges és költséges berendezéseket, és technikailag is egyszerűbbek.

Intézetünkben került kidolgozásra egy olyan ELISA eljárás, mely érzékenyen és specifikusan ismerte fel az EIEC (és *Shigella*) törzseket. Később ezt az eljárást módosítottuk a poliklonális ellenanyagot egy IpaC-specifikus monoklonális antitesttel (MAIC-1) helyettesítve. Az ELISA teszt azonban csak előzetesen izolált telepek tesztelésére volt alkalmas, primokultúrák vizsgálatára, és környezeti minták esetén a szűréssel feldolgozott anyagok tanulmányozására nem. A Shiga-like toxint termelő enterohaemorrhagiás *E. coli* (EHEC) esetén a telep immunoblot módszer ígéretes alkalmazásáról számoltak be székletminták esetén (Hull, 1993). Ebből kiindulva választottuk disszertációnk egyik céljává a *Shigella* / EIEC - specifikus telep immunoblot módszer kifejlesztését, illetve az EIEC szelektív tenyészthetőségének vizsgálatát.

2. CÉLKITŰZÉSEK

2.1. Rövid távú célok

1. A vérhas kórokozóinak, a *Shigella* és enteroinvazív *Escherichia coli* törzsek (EIEC) kimutatására egy specifikus és megfelelően érzékeny telep immunoblot eljárás kidolgozása.
2. A módszer különböző klinikai és környezeti minták vizsgálatára történő (mint pl. víz, élelmiszer) alkalmazása.
3. A különböző szelektív, szelektív differenciáló és dúsító táptalajok hatékonyságának vizsgálata az enteroinvazív *Escherichia coli* törzsek diagnosztikájában.

2.2. Távlati célkitűzés

4. Egy technikailag egyszerű, olcsó vizsgálati módszer kidolgozása, mely nem igényel különös laboratóriumi felszereltséget, mely érzékenyen és specifikusan képes detektálni a bakteriális vérhas kórokozóit. Egy ilyen módszer nagyban hozzájárulna jelenlegi korlátozott tudásunk bővítéséhez az enteroinvazív *Escherichia coli* törzsek valódi jelentőségéről és járványtanáról.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. A minták előkészítése és tesztelése: a széklet-, víz- és tejmintákat egy higítási görbe alapján különböző, ismert mennyiségű virulens baktériummal kontaminálták. Az így létrehozott mintákat az általunk kidolgozott telep immunoblot módszerrel teszteltük. A vízmintákat 0,45 µm pórusnagyságú membránokon keresztül szűrtük, majd a membránokat TSA táptalajra helyeztük. A székletmintákat TSA-ra oltottuk és membránnal fedtük. A tejmintákat centrifugálás után üledékből oltottuk a TSA-ra. Éjszakán át történő inkubálás után a membránokon elvégeztük az immunreakciót. A telep immunoblottal párhuzamosan kontrolként a rutinban használt - tenyésztésen, biokémián és szerológián alapuló - hagyományos mikrobiológiai, illetve a legfejlettebb, molekuláris biológiai eljárásokat, mint a PCR és DNS hibridizáció, alkalmaztuk.

3.2. A telep immunoblot módszer: a membránokat a baktériumokat tartalmazó felszínével lefelé TSA lemezekre helyeztük, majd 37 ^{o}C -on inkubáltuk éjszakán át. Másnap a membránok PBS-ben történt mosása után a szabad kötőhelyeket pufferolt sovány tejjel blokkoltuk. Az IpaC antigénre fajlagos MAIC-1 antitest titrált hígításával inkubáltuk a membránokat 2 óra hosszat. Ezt követően, PBS-ben történt mosás után, egér Ig -re specifikus alkalikus foszfatáz konjugátumot adtunk a membránokhoz további 2 órára. Ismételt mosás után a reakciót Naftol AS-MX foszfát - Fast-Red TR sót tartalmazó szubsztráttal hívtuk elő.

3.3. Sejtinváziós teszt: HeLa vagy HEp-2 sejtek fél-konfluens tenyészetét használtunk a sejtinváziós képesség megállapításához. A sejttenyészet -baktérium inkubációja után a nem invazív sejteket gentamicin tartalmú tápfolyadékkal gátoltuk, PBS-el mostuk, az intracelluláris mikróbák jelenlétét immerziós fénymikroszkóppal vizsgáltuk.

3.4. Serény teszt: Tengerimalac szembe oltott, majd a purulens keratoconjuctivitisből visszaizolált baktériumtörzseket használtunk Serény módszere alapján (1955).

3.5. MAIC1- ELISA: A TSB-t tartalmazó ELISA lemezek lyukaiba oltott vizsgálandó telepeket 37 ^{o}C -on inkubáltuk. Ez alatt, ha a mikróba termelte az IpaC antigént, az a lemez falát érzékenyítette. Másnap az IpaC -specifikus MAIC-1 monoklonális ellenanyaggal, ezt követően pedig anti-egér-torma-peroxidáz konjugátummal elreagáltatva vizsgáltuk az IpaC termelést.

3.6. MAIC-1 monoklonális ellenanyag előállítása: *IpaC* specifikus MAIC-1 antitestként a hybrydóma sejttenyészet FSC mentes felülúszóját használtuk. Minden aliquot esetén a megfelelő munkahigítást titrálással állapítottuk meg.

3.7. Plazmid elektroforézis: Az inváziós plazmid jelenlétének vizsgálata Kado és Liu (1981) módszere szerint történt a plazmid extrakciójával és az azt követő agaróz-gél-elektroforésisével.

3.8. A széklet minta alkalikus foszfatáz enzimaktivitásának eliminálása: a széklet minták esetében a membránokat előkezelésnek vetettük alá,

melyben 100 °C -on végzett hőkezelést kombináltunk Tween 20 kezeléssel.

3.9. PCR: A fertőzött membránokat TSB -ben inkubáltuk, majd a tenyészet 1 ml –éből a DNS -t extraháltuk. A PCR -t a baktérium *ipaH* génjére specifikus primerekkel végeztük, Sethabutr módszere (1993) szerint. Az amplifikált fragmentet 1,2 % -os agaróz gélben futtatva vizsgáltuk.

3.10. DNS hibridizáció: A hibridizációt a Shigellák inváziós plazmidjának 11,5 kb méretű EcoRI fragmentjét (Boileau, 1984) P^{32} -vel jelzett próbaként használva végeztük (Milch, 1997).

3.11. Az enteroinvazív mikróbák növekedésének vizsgálata különböző szelektív táptalajokon: Szelektív táptalajokként a következőket vizsgáltuk: MAC, EMB, DC, SS, XLD, SB és GNB. A vizsgálandó törzsek szuszpenziójából 500-800 telepképző egységet szélesztettük (100-100 µl-ben) a különböző vizsgált szelektív táptalajokra. Éjszakai inkubáció után a telepek számát hasonlítottuk az ugyanebből a szuszpenzióból nem szelektív TSA lemezen kitenyészett telepek számához. Folyékony dúsítók hatását vizsgálva a törzsek 6 órás inkubáció alatti csíraszám változását vizsgáltuk.

3.12. Statisztikai módszerek: A különböző környezeti és folyadékmintákon végzett vizsgálatok érzékenységének összehasonlításához a McNemar próbát használtuk (Altman 1994). A szelektív táptalajok összehasonlításához a Wilcoxon próbát és a Spearman-féle korrelációs tesztet alkalmaztuk. A baktériumtörzsek különböző csoportjainak azonos körülmények közti növekedését a Mann-Whitney teszttel vizsgáltuk.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

4.1. A telep immunoblot módszer

A telep immunblot módszer kidolgozása során meghatároztuk az eljárás paramétereit és a szükséges táptalajokat. A kipróbált szelektív szilárd táptalajok közül a TSA lemezeken kapott eredmények bizonyultak a legjobbnak. A lemezekben az agar-agar koncentrációját 3 %-ra emelve sikeresen oldottuk meg az esetleg jelenlévő *Proteus* törzsek rajzásának gátlását az IpaC kifejeződésének megváltoztatása nélkül. A széklet primokultúra vizsgálatához kidolgoztunk egy olyan előkezelési eljárást, mely eliminálja a jelenlévő alkalikus foszfatáz aktivitást. Erre a célra legalkalmasabbnak a hő-, és Tween 20 kezelés kombinációját találtuk, mely nem befolyásolta az IpaC antigén kimutathatóságát. Ezzel az eljárással az egyes mintákban fellehető peroxidáz aktivitás is megszüntethető volt. Az immunblot módszer a székletminták esetén a shigellákat a hagyományos módszerekkel azonos érzékenységben mutatta ki. Emellett, ugyanilyen érzékenységgel mutathatók ki EIEC törzsek is szerocsoportjuktól függetlenül. Így - a sok helyütt nehezen hozzáférhető molekuláris módszerektől eltekintve - ez az első olyan eljárás, mely lehetővé teszi az EIEC telepek közvetlen, egyszerű azonosítását. Hasonló tapasztalattal jártak vizsgálataink a víz és tejmintákat illetően is. A vízminták esetében figyelemreméltó további eredmény volt az eljárás legalább egy nappal való rövidítése is.

4.2. Szelektív táptalajok

A szelektív táptalajok vizsgálatakor megállapítottuk, hogy egyrészt az EIEC törzsek teljesen azonos módon viselkednek a *Shigella* törzsekhez hasonlítva tenyészthetőségük tekintetében. Ez a megállapítás - noha nem meglepő

a két pathogén csoport hasonlóságának ismeretében - mégis új. Gyakorlati következménye, hogy az EIEC szelektív tenyésztésre a kevéssé szelektív differenciáló lemezek (EMB, MAC) mellett a nagy szelektivitású lemez (XLD) ajánlható, mely bár jobban gátolja az EIEC -et, mint a többi szelektív médium, a normál bélflóra tagjaival szemben az izolálást megkönnyítő előnyt biztosít az EIEC -nek. Bár mi is meg tudtuk erősíteni Silva korábbi megfigyelést, hogy az SS támogatja az EIEC növekedését, de az gyakorlatilag szelektív előnyt a normál *E. coli* -val szemben nem jelent, így a célra alkalmatlan. Tapasztalataink szerint szintén nem jelent előnyt a folyékony dúsítók használata sem.

4.3. Javasolható protokoll

A fent leírt eredményeink alapján az EIEC felismerésére a következő protokollt javasoljuk. A primokulturából TSA lemezen IpaC specifikus telep immunoblot végzése, mely lehetővé teszi a közvetlen tesztelést. Ezen kívül, vagy a telep immunoblot módszert kiegészítően, javasolt kis szelektivitású differenciáló, és emellett feltétlenül nagy szelektivitású XLD lemezről véletlenszerűen válogatott laktóz pozitív és negatív telepek vizsgálata. A vizsgálat a mikrobiológus rendelkezésre álló, EIEC -specifikus módszerekkel - mint például hibridizáció, ELISA, virulencia tesztek - történhet.

5. TÉZISEK

5.1. A MAIC-1 Ipa-C specifikus monoklonális ellenanyag segítségével kidolgoztunk egy, a bakteriális vérhas kórokozóira specifikus telep immunoblot módszert.

5.2. A módszer validálásával megállapítottuk, hogy az alkalmas a *Shigella* és EIEC törzsek specifikus és érzékeny kimutatására.

5.3. A módszert sikerrel adaptáltuk környezeti folyadék mintákra. A mesterségesen kontaminált vízminták szűrésekor akár 1 sejt kimutatható volt 10 liter vízmintából a telep-immunoblot elvégzése után. A módszer érzékenysége nem haladta meg a PCR-ét hasonló minták vizsgálatakor.

5.4. A módszert sikerrel adaptáltuk székletminták vizsgálatára. A széklet primokultúrák és mesterségesen kontaminált székletminták vizsgálata során eredményeink szerint a telep-immunoblot módszer felülmúlja a hagyományos diagnosztikai módszerek érzékenységet.

5.5. Kidolgoztunk egy, a székletminták flórájának belső, az immundetektálással interferáló alkalikus foszfatáz enzimaktivitásának eliminálásra szolgáló eljárást hő és Twin 20 kezelés kombinációjával.

5.6. Az élelmiszerminták vizsgálata kapcsán sikerrel alkalmaztuk a módszert mesterségesen kontaminált tejminták vizsgálatára.

5.7. Meghatároztuk az EIEC törzsek szelektív tenyésztésre alkalmas táptalajokat (XLD és MAC vagy EMB kombinációja).

5.8. Fenti eredmények alapján olyan diagnosztikus protokollra tettünk javaslatot, mely alkalmas az EIEC (és *Shigella*) törzsek felismerésére, és mely korlátozott lehetőségekkel rendelkező laboratóriumokban is megvalósítható.

6. REFERENCIA

Altman DG. Practical Statistics for Medical Research. Chapman & Hill 1994. p. 258

Boileau CR, d'Hauteville HM, Sansonetti PJ. DNA hybridization technique to detect Shigella species and enteroinvasive Escherichia coli. J Clin Microbiol 1984; 20:959-61

Kado CI, ST Liu. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J Bact 1981; 145:1365-1373

Milch H, I Gadó, I Drin, É Cirók, M Herpay. Detection of VTEC using specific DNA probes and complex typing of Escherichia coli O157. Acta Microbiol Immun Hung 1997; 44(3):257-269

Serény B. Experimental shigella keratokonjuctivitis: a preliminary report. Acta Microbiol Acad Sci Hung 1955; 2:293-296

Sethabutr O, Venkatesan M, Murphy GS, Eampokalap B, Hoge CW, Echeverria P. Detection of Shigellae and enteroinvasive Escherichia coli by amplification of the invasion plasmid antigen H DNA sequence in patients with dysentery. J Infect Dis 1993; 167:458-61

7. PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A PhD disszertáció alapját képező publikációk

Közlemények

I. Szakál D., I. Gadó, T. Pál. A colony blot immunoassay to detect enteroinvasive Escherichia coli and Shigella in water samples. Journal of Applied Microbiology 2001, 90 (2): 229-236

II. Szakál D., Gy. Schneider, T. Pál. A colony blot immune assay to identify enteroinvasive Escherichia coli and Shigella in stool samples. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 2003, 45(3): 165-71

III. Szakál D., T. Pál. Comparison of media for the selective culture of enteroinvasive Escherichia coli. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2003, 22: 235-241.

Idézhető kivonatok

1. Pál T, Dhar R, Szakál D. An IpaC - specific colony blot immune assay to detect Enteroinvasive Escherichia coli in contaminated fecal and water samples. 95th Annual Meeting of the American Society for Microbiology. Abtsr. 1995, Q-391:265

2. Szakál, D., T. Pál. Colony blot immunoassay to detect Shigella and enteroinvasive Escherichia coli strain in water samples. Acta Microbiol Immunol Hung. 1998, 44:406

3. Szakál D., Schneider Gy, Pál T. The aetiologic diagnosis of bacillary dysentery with a colony immunoblot technique. Acta Microbiol Immunol Hung 1999, 46: 26

4. Schneider Gy, Szakál D, Pál T. Detection of enterohaemorrhagic Escherichia coli serotype O157 with colony blot technique. Acta Microbiol Immunol Hung 2000, 47:213-214

5. Szakál D, Pál T. The effect of selective and selective-enrichment enrichment media on the growth of enteroinvasive Escherichia coli. Acta Microbiol Immunol Hung 2000, 47:206

6. Schneider, Gy., D. Szakál, T. Pál, L. Emődy. Detection of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157 from water samples with the help of a colony blot method. UNESCO-HUJ Institute of Virology, Abstracts, Science for Peace, ISMBM 1999, p. 8.

7. Szakál, D., K. Szőke, T. Pál. The colony immunoblot method adapted for detecting Shigella and EIEC from milk. Acta Microbiol Immunol Hung. 2001, 48(2): 273

Előadások, poszterek hazai és nemzetközi kongresszuson

1. Pál T, Dhar R, Szakál D. An IpaC - Specific Colony Blot Immune Assay to Detect Enteroinvasive Escherichia coli in Contaminated Fecal and Water Samples. 95th Annual Meeting of the American Society for Microbiology, Washington DC. 1995

2. Pál T, Dhar R, Szakál D. Antigen-specific assays in the diagnosis of bacillary dysentery. Kuwait University Posterday, Kuwait City 1996

3. Szakál D, Pál T. Telep-immunoblot eljárás Shigellák és enteroinvazív Escherichia coli törzsek kimutatására vízmintákból. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 11.–ik Nagygyűlése. Szekszárd, 1997

4. Szakál, D., T. Pál. Comparison of a colony blot immunoassay to PCR to detect Shigella in water samples. International Medical Conference for Students and Young Doctors, Lublin, Poland, 1998.

5. Szakál D., Schneider Gy, Pál T. A vérhas etiológiai diagnózisa telep immunoblot módszerrel. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 12.-ik Nagygyűlése. Miskolc, 1998.

6. Schneider Gy, Szakál D, Pál T. Detection of enterohaemorrhagic Escherichia coli serotype O157 with colony blot technique. 13th Annual Meeting of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest 1999

7. Szakál D, Pál T. The effect of selective enrichment media on the growth of enteroinvasive Escherichia coli 13th Annual Meeting of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest 1999

8. Schneider, Gy., D. Szakál, T. Pál, L. Emődy Detection of enterohaemorrhagic Escherichia coli serogroup O157 from water samples with the help of a colony blot method. International School for Molecular Biology, Microbiology and Science for Peace: Application of Molecular Biology in Microbiology, Medicine and Agriculture Smolenice (Bratislava), Slovakia, 1999.

9. Szakál D, Szőke K, Pál T. Telep immunoblot módszer adaptálása Shigella és EIEC kimutatására tejből. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 14.-ik Nagygyűlése. Keszthely, 2000

Egyéb, a PhD disszertációtól eltérő témájú publikációk

1. Vesikari, T., Karvonen A., Puustinen L., Szakal D., Zeng S.Q., Poliszcak A., Delem A., De Vos B. Efficacy of oral human rotavirus vaccine in infants against acute rotavirus gastroenteritis in the community determined with rotavirus antigen detection by EIA and rotavirus RT-PCR as end-points. 6th Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology (ESCV), Lyon, France. Abstract in Journal of Clinical Virology 2003. 27(Supplement 1):8.

2. Distefano, D.J., Mallette L., Maliga, M., Ruiz, W.; Kulnis G., Keller P.M., Puustinen L., Szakal D., Zeng S., Vesikari T., Shaw A.R. A comparison of a novel one-step sequence-based typing assay with nested RT-PCR assay for rotavirus VP7. 8th International Symposium on Double-Stranded RNA Viruses, Tuscany, Italy, 2003. Abstract W7.1, p.61.

3. Vesikari, T., Karvonen A., Puustinen L., Szakal D., Zeng S.Q., Delem A., De Vos B. Highlights of world-wide development: A European experience. The 3rd International Conference on Vaccines for Enteric Diseases, Montego Bay, Jamaica, 2004. Session 6 Special Symposium.

4. Vesikari, T., Karvonen A., Puustinen L., Szakal E.D., Zeng S.Q., Delem A., De Vos B. 2004. Efficacy of RIX4414 live attenuated human rotavirus vaccine in Finnish infants. The Pediatric Infectious Disease Journal Volume 23, Number 10, October 2004.