

**„Österreichische Richtlinie für das
Toxoplasmose-Screening in der
Schwangerschaft und frühen Kindheit“**

Screening, Therapie und kindliches Follow-up

Diese Richtlinie wurde unter der Koordination von Andrea-Romana Prusa unter Mitarbeit der „Arbeitsgruppe Toxoplasmose“ im Rahmen der Arbeitsgruppe Infektiologie der Österreichischen Gesellschaft für Kinderheilkunde erstellt. Die Arbeitsgruppe besteht aus folgenden Mitgliedern (alphabetisch gelistet):

Univ. Prof. Dr. F. Allerberger	Österreichische Gesellschaft für Hygiene, Mikrobiologie und Präventivmedizin
Priv. Doz. Dr. W. Arzt	Pränatalmedizin, Landes-Frauen- und Kinderklinik Linz, Linz
Prim. Dr. Ch. Aspöck	Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Landeskrankenhaus St. Pölten
Univ. Prof. Dr. H. Auer	Institut für Spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin, Medizinische Universität Wien, Wien
Univ. Prof. Dr. T. Barisani-Asenbauer	Institut für Spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin, AG okuläre Entzündungen und Infektionen Medizinische Univ. Wien
Univ. Prof. Dr. D. Bettelheim	Universitätsklinik für Frauenheilkunde, Medizinische Universität Wien, Wien
Univ. Prof. Dr. E. Förster-Waldl	Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde, Medizinische Universität Wien, Wien
Dr. R. Hartl	Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Tropenmedizin, Krankenhaus der Elisabethinen, Linz analyse BioLab GmbH, Linz
Univ. Prof. Dr. M. Hayde	Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde, Medizinische Universität Wien, Wien
Univ. Prof. Dr. M. Häusler	Klinische Abteilung für Geburtshilfe, Medizinische Universität Graz
Univ. Prof. Dr. P. Husslein	Universitätsklinik für Frauenheilkunde, Medizinische Universität Wien, Wien
Dr. Heidi Jakse	Ambulatorium der Steiermärkischen Gebietskrankenkasse, Mutter-Kind-Pass Stelle, Graz
Univ. Prof. DI DDr. D. Kasper	Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde, Medizinische Universität Wien, Wien

Univ. Prof. Dr. Reinhold Kerbl	Abteilung für Kinder und Jugendliche, Landeskrankenhaus Leoben
Univ. Prof. Dr. C. Marth	Universitätsklinik für Frauenheilkunde Innsbruck, Medizinische Universität Innsbruck
Univ. Prof. DDr. E. Marth	Hygieneinstitut, Medizinische Universität Graz
Dr. G. Mustafa	Österreichische Gesellschaft für Laboratoriums- medizin und Klinische Chemie, Labor Dr. Mustafa, Salzburg
BMA B. Panzenböck	Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde, Medizinische Universität Wien, Wien
o. Univ. Prof. Dr. A. Pollak	Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde, Medizinische Universität Wien, Wien
Ass. Prof. Dr. AR Prusa	Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde, Medizinische Universität Wien, Wien
OA. Dr. A. Ramoni	Universitätsklinik für Frauenheilkunde Innsbruck, Medizinische Universität Innsbruck
Univ. Prof. Dr. B. Resch	Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde, Medizinische Universität Graz
OA. Dr. C. Rotky-Fast	Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde, Medizinische Universität Graz
Doris Ruthensteiner, Hebamme	Österreichisches Hebammengremium
OA. Dr. U. Sagel	Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Landeskrankenhaus St. Pölten
Prim. Dr. P. Schwärzler	Landeskrankenhaus Feldkirch, Abteilung Gynäkologie und Geburtshilfe
Univ. Prof. Dr. E. Stifter	Univ. Klinik für Augenheilkunde und Optometrie, Medizinische Universität Wien, Wien
Priv.-Doz. Dr. V. Strenger	Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde, Medizinische Universität Graz
Univ. Prof. Dr. F. Thalhammer	Universitätsklinik für Innere Medizin I, Klinische Abteilung für Infektionen und Tropenmedizin, Medizinische Universität Wien
Univ. Prof. Dr. G. Weiss	Univ.-Klinik für Innere Medizin VI , Infektiologie und Immunologie/Tropenmedizin, Rheumatologie und

Univ. Prof. Dr. U. Wiedermann-Schmidt	Pneumologie, Medizinische Universität Innsbruck
OA. Dr. V. Witt	Institut für Spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin, Medizinische Universität Wien, Wien
Univ. Prof. Dr. W. Zenz	St. Anna Kinderspital, Leitung der Gewebekbank, Wien
	Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde, Medizinische Universität Graz

Beteiligte Fachgesellschaften

Die Arbeitsgruppe Toxoplasmose zur Erstellung dieser Richtlinie besteht aus Vertretern von verschiedenen Fachgesellschaften:

Österreichische Gesellschaft für Kinder- und Jugendheilkunde (ÖGKJ) federführend

Österreichische Gesellschaft für Prä- und Perinatalmedizin (ÖGfPPM)

Österreichische Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin und Klinische Chemie (ÖGLMKC)

Österreichische Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (OEGGG)

Österreichische Gesellschaft für Hygiene, Mikrobiologie und Präventivmedizin (ÖGHMP)

Österreichische Gesellschaft für Infektionskrankheiten und Tropenmedizin (OEGIT)

Österreichische Gesellschaft für Tropenmedizin, Parasitologie und Migrationsmedizin (ÖGTPM)

Österreichisches Hebammengremium

Ziel

Erstellung eines Konsensus zu Diagnostik, Therapie und Massnahmen bei akuter *Toxoplasma gondii* Infektion von Schwangeren und deren Kinder.

Zielgruppe

Frauenärzte, Kinderärzte, Hebammen, Allgemeinärzte, Infektiologen, Mikrobiologen, Laborärzte, Augenärzte, Internisten.

Patientenzielgruppe

Schwangere Frauen und deren Kinder

Konsensusfindung

Systematisierte Recherche der Literatur und Analyse der österreichischen Daten aus dem Toxoplasmoseregister zur Erfassung von Schwangeren mit Toxoplasma-Infektionen und deren Kinder mit konnatalen Infektionen. Eine repräsentative Expertengruppe hat im Konsens eine evidenzbasierte Richtlinie erarbeitet.

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Allgemeines	7
2. Toxoplasmose-Screening von Schwangeren im Rahmen des Mutter-Kind-Passes	7
3. Therapie während der Schwangerschaft	8
4. Amniozentese zur PCR-Analyse	9
5. Diagnose der konnatalen Infektion mit <i>T. gondii</i>	9
6. Therapie der Kinder	9
7. Follow-up der Kinder im ersten Lebensjahr	10
8. Österreichische Referenzlabors	11
9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	12
10. Literatur	13

Abkürzungsverzeichnis

<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
SSW	Schwangerschaftswoche
IgG	Toxoplasma-spezifische Antikörper der Klasse G
IgM	Toxoplasma-spezifische Antikörper der Klasse M
PCR	Polymerase Kettenreaktion aus Fruchtwasser zur Detektion Toxoplasma-spezifischer DNA

1. Allgemeines

Seit 1974 besteht in Österreich ein serologisches Toxoplasmose-Screening-Programm in der Schwangerschaft im Rahmen der Mutter-Kind-Pass-Untersuchungen. Dieses Screening soll alle Frauen mit einer akuten Erstinfektion in der Schwangerschaft und somit einem fetalen Risiko für eine konnatale Toxoplasma-Infektion identifizieren und einer medikamentösen Behandlung zuführen. Vor Einführung des Toxoplasmose-Screenings und einer standardisierten Therapie lag die Inzidenz der konnatalen Infektion mit *T. gondii* bei 78 pro 10.000 Lebendgeburten (1). Diese Zahl konnte durch das Screening und dessen Massnahmen effektiv reduziert werden: In den letzten 10 Jahren konnten in Österreich pro Jahr bis zu 96 akute Infektionen bei Schwangeren identifiziert und durch Einleiten einer adäquaten Therapie die Zahl der konnatalen Toxoplasma-Infektionen auf 1 pro 10.000 Geburten gesenkt werden. Diese infizierten Kinder zeigen ein weites Spektrum an klinischen Manifestationen, von intrauterinem Tod, Retinochorioiditis mit Erblindung, Hydrozephalus, zerebralen Verkalkungen, Krampfgeschehen, entwicklungsneurologischer Beeinträchtigung bis hin zu asymptomatischen Verläufen (2, 3).

Vor Einführung des Screenings waren die Hälfte der Frauen im gebärfähigen Alter bereits präkonzeptionell infiziert und ohne Gefahr für eine materno-fetale Übertragung (4). Aktuelle Untersuchungen über die Seroprävalenz bei Schwangeren zeigen, dass nur mehr ca. 1/3 der Frauen vor der Schwangerschaft Kontakt mit diesem Parasiten hatten (5). Mit der steigenden Anzahl von nichtinfizierten Schwangeren, steigt auch das Risiko einer akuten Infektion in der Schwangerschaft. Diese Gruppe muss serologisch kontrolliert werden. Ziel dieser Richtlinie ist es, ein standardisiertes Vorgehen in Diagnostik, Therapie und kindlichem Follow-up sicherzustellen.

2. Toxoplasmose-Screening von Schwangeren im Rahmen des Mutter-Kind-Passes

Da diese Infektion bei der immunkompetenten Schwangeren in der Regel klinisch unbemerkt verläuft, ist die Erkennung der akuten Infektion im Allgemeinen nur durch serologische Bestimmung von Toxoplasma-spezifischen Antikörpern möglich. Im Rahmen der Mutter-Kind-Pass-Untersuchungen ist die „Toxoplasmose-Untersuchung“ vom Facharzt für Frauenheilkunde und Geburtshilfe zu veranlassen. Die Analysen werden primär von den lokalen Labors durchgeführt (Anhang 1).

Hat eine immunkompetente Schwangere bereits vor der Schwangerschaft einen positiven Vorbefund, so sind keine weiteren Tests notwendig. Die Erstuntersuchung sollte möglichst früh in der Schwangerschaft, optimal bis SSW <9+0 erfolgen.

Ist das spezifische IgG bei der Erstuntersuchung negativ, so sind Kontrollen im Abstand von acht Wochen empfohlen, ideal wäre eine Abschlussuntersuchung zum Zeitpunkt der Geburt (entweder maternales Blut oder Nabelschnurblut) (6).

Zeigt die serologische Bestimmung positives IgG, so ist zusätzlich eine IgM Bestimmung notwendig. Ist sowohl IgG als auch IgM positiv, so sind weitere Tests wie die Avidität durchzuführen und gegebenenfalls Kontakt mit dem Referenzlabor aufzunehmen.

Die Diagnose einer akuten (postkonzeptionellen, rezenten) Infektion in der Schwangerschaft wird mittels IgG, IgM und Avidität vom Labor gestellt. Eine sofortige Therapie und die Durchführung einer Amniozentese zur PCR-Analyse sind in diesem Fall empfohlen.

Besteht aufgrund der serologischen Befunde der Verdacht auf eine akute Infektion, so ist umgehend eine Therapie einzuleiten und der Infektionsstatus der Schwangeren muss mittels Konfirmationstest (Serum-Probengewinnung nach 14 Tagen) geklärt werden. Kann die akute Infektion in der Schwangerschaft in der Toxoplasmose-Kontrolluntersuchung ausgeschlossen werden, ist die Therapie zu beenden.

Eine Toxoplasma-Infektion stellt keine Indikation zur Schwangerschaftsunterbrechung oder zu einer vorzeitigen Einleitung der Geburt dar und ist auch kein Grund für die Durchführung einer Sectio caesarea. Das Vorgehen zum Geburtszeitpunkt ist in Anhang 2 zusammengefasst.

3. Therapie während der Schwangerschaft

Nach Erkennen einer postkonzeptionellen Infektion im Rahmen des pränatalen Screenings muss die umgehende initiierte antiparasitäre Therapie durchgehend bis zur Geburt durchgeführt werden (7). Die Therapie kann das Risiko einer Übertragung auf den Feten reduzieren und den klinischen Verlauf einer konnatalen Infektion beeinflussen (8-16). Bei Verdacht auf akute Infektion sollte die medikamentöse Behandlung unverzüglich eingeleitet und kann nach serologischem Ausschluss des Infektionsverdachts beendet werden. Die Wahl der Medikamente ist abhängig vom Gestationsalter bei Diagnose und dem PCR-Ergebnis aus Fruchtwasser (Anhang 3). Nebenwirkungen der Therapie nach österreichischem Schema sind nach jahrzehntelanger Erfahrung äusserst selten (Toxoplasmoseregister).

4. Amniozentese zur PCR-Analyse

Die Amniozentese zur PCR-Diagnostik soll ab SSW 15+0 allen Schwangeren mit gesicherter akuter Toxoplasma-Infektion angeboten werden (17-20). Die Durchführung der Amniozentese ist optimal vor Therapiebeginn, eine bereits begonnene Therapie stellt aber keine Kontraindikation dar. Durch PCR aus dem Fruchtwasser kann der fetale Infektionsstatus bereits intrauterin bestimmt und die Empfehlung der medikamentösen Therapie der Schwangeren gegebenenfalls modifiziert werden (Anhang 3). Ebenso hat das PCR-Ergebnis Einfluss auf die spätere Therapie des geborenen Kindes. Bei positiver PCR aus Fruchtwasser wird das Kind von Geburt bis zum Ende des ersten Lebensjahres behandelt (Anhang 4). Im Falle eines negativen Ergebnisses unterbleibt die Behandlung.

5. Diagnose der konnatalen Infektion mit *T. gondii*

Der Endpunkt des Diagnosepfades einer konnatalen Infektion ist bei Persistenz von spezifischem IgG nach dem ersten Lebensjahr abgeschlossen. Hinweisend auf eine konnatale Infektion sind: ein positives PCR-Ergebnis aus Fruchtwasser und ein positiver IgM-Befund aus dem Nabelschnurblut bzw. peripheren Blut des Kindes. In seltenen Fällen, kann es zu falsch positiven PCR-Ergebnissen und falsch positivem Nachweis von spezifischem-IgM kommen. Deshalb ist das serologische Follow-up bis zum Ende des ersten Lebensjahres unverzichtbar. Wir unterscheiden klinisch zwischen der asymptomatischen „konnatalen Toxoplasma-Infektion“ und der symptomatischen „konnatalen Toxoplasmose“.

6. Therapie der Kinder

Kinder mit einer konnatalen Infektion sollen von Geburt an für 12 Monate kontinuierlich therapiert werden (Anhang 4). Im Einzelfall besteht ein hohes fetales Infektionsrisiko (Serokonversion im 3. Trimester und keine PCR zur fetalen Infektionsdiagnostik), hier ist zunächst eine Therapie empfohlen. Das Therapieschema ist dabei abhängig, ob das Kind klinische Zeichen einer Infektion hat (konnatale Toxoplasmose) oder „nur“ asymptomatisch infiziert ist (konnatale Toxoplasma-Infektion). Deshalb sollten die klinischen Untersuchungen nach der Geburt rasch durchgeführt werden. Die wesentlichste Spätkomplikation ist die Retinochorioiditis. Kommt es zu einer aktiven Form der Augenbeteiligung nach dem ersten Lebensjahr, so ist die Therapie mit dem/der Ophthalmolog/en/in abzustimmen.

7. Follow-up der Kinder im ersten Lebensjahr

Kinder von Frauen mit einer akuten Infektion in der Schwangerschaft werden im ersten Lebensjahr serologisch nachkontrolliert (Anhang 5). Endpunkt der serologischen Untersuchung ist beim nichtinfizierten Kind ein negativer IgG-Befund innerhalb des ersten Lebensjahres. Bei konnatal infizierten Kindern persistieren die spezifischen IgG lebenslang. Da bei konnataler Infektion die IgG-Konzentration am Ende des ersten Lebensjahres niedrig sein können, besteht die Möglichkeit, dass Testverfahren mit einer geringen Sensitivität falsch negative Ergebnisse liefern (21). Damit auch diese sehr kleine Gruppe von Kindern mit negativem IgG-Befund trotz konnataler Infektion entdeckt wird, empfiehlt sich bei Kindern nach akuter Infektion der Schwangeren, eine Abschluss-Kontrolle im Referenzlabor.

Zusätzlich zu den klinischen Untersuchungen im Rahmen des Mutter-Kind-Passes, inklusive entwicklungsdiagnostischer Untersuchungen bis zur Schulreife, sind nach akuter Infektion der Schwangeren noch weitere Untersuchungen beim Kind empfohlen. Diese sind im Anhang 5 aufgelistet. Die diagnostische Liquorpunktion bei Kindern kann unterbleiben, da das Untersuchungsergebnis auch bei infizierten Kindern keine therapeutische Konsequenz hat. Kinder mit konnataler Infektion sollen auch nach dem ersten Lebensjahr jährlich ophthalmologisch kontrolliert werden.

8. Österreichische Referenzlabors: Medizinische Universität Wien

8.1. Toxoplasmoselabor und –Nachsorgeambulanz

Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde Wien

Währinger Gürtel 18-20, 1090 Wien

Tel: 0043-1-40400-3279 oder 6649; Fax: 0043-1-40400-3458

E-mail: michael.hayde@meduniwien.ac.at oder andrea.prusa@meduniwien.ac.at

Ansprechpersonen:

Univ. Prof. Dr. Arnold Pollak: Vorstand der Univ. für Kinder- und Jugendheilkunde

Univ. Prof. Dr. Michael Hayde: Leitung des Toxoplasmoselabor und–

Nachsorgeambulanz, Ass. Prof. Dr. Andrea-Romana Prusa: Vertretung

8.2. Institut für Spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin

Kinderspitalgasse 15, 1090 Wien

Tel.: 0043-1-40160-38230; Fax.: 0043-1-40160-938293

E-Mail: ursula.wiedermann@meduniwien.ac.at und herbert.auer@meduniwien.ac.at

Ansprechpersonen:

Univ. Prof. Dr. Ursula Wiedermann-Schmidt: Institutsleiterin

Univ. Prof. Dr. Herbert Auer: Parasitologische, serologische und molekularbiologische Untersuchungen

9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Anhang 1: Österreichisches Toxoplasmose-Screening im Rahmen der Mutter-Kind-Pass-Untersuchung
- Anhang 2: Vorgehen zum Geburtszeitpunkt
- Anhang 3: Therapie der akuten *Toxoplasma gondii* Infektion während der Schwangerschaft
- Anhang 4: Therapie der konnatalen Infektion mit *Toxoplasma gondii* beim Kind
- Anhang 5: Zusätzliche Untersuchungen für Kinder nach akuter *Toxoplasma gondii* Infektion der Mutter in der Schwangerschaft

10. Literatur

1. Thalhammer O. [Congenital oligosymptomatic toxoplasmosis. Examination of 1332 congenitally brain-damaged children]. *Wien Klin Wochenschr.* 1961 Dec 8;73:885-9.
2. Moncada PA, Montoya JG. Toxoplasmosis in the fetus and newborn: an update on prevalence, diagnosis and treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012 Jul;10(7):815-28.
3. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet.* 2004 Jun 12;363(9425):1965-76.
4. Thalhammer O. [The diagnosis and therapy of a toxoplasmosis infection in pregnancy. Birth of a healthy child in sulfonamide-pyrimethamine-treated lymph node toxoplasmosis in the 4th and 5th month of pregnancy]. *Dtsch Med Wochenschr.* 1960 Jan 29;85:177-9.
5. Sagel U, Kramer A, Mikolajczyk RT. Incidence of maternal *Toxoplasma* infections in pregnancy in Upper Austria, 2000-2007. *BMC Infect Dis.* 2011;11:348.
6. Prusa AR, Kasper DC, Olischar M, Husslein P, Pollak A, Hayde M. Evaluation of Serological Prenatal Screening to Detect *Toxoplasma gondii* Infections in Austria. *Neonatology.* 2012;103(1):27-34.
7. Aspöck H, Husslein P, Janisch H, Mose JR, Pollak A, Vander-Mose A, et al. [Toxoplasmosis. Recommendations for treatment of primary toxoplasma infection in pregnancy and congenital toxoplasmosis]. *Gynakol Geburtshilfliche Rundsch.* 1994;34(1):50-1.
8. Hotop A, Hlobil H, Gross U. Efficacy of rapid treatment initiation following primary *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin Infect Dis.* 2012 Jun;54(11):1545-52.
9. Thalhammer O, Heller-Szollosy E. [Routine toxoplasmosis screening in pregnancy to prevent congenital infection: a prospective study (author's transl)]. *Wien Klin Wochenschr.* 1979 Jan 5;91(1):20-5.
10. Cortina-Borja M, Tan HK, Wallon M, Paul M, Prusa A, Buffolano W, et al. Prenatal treatment for serious neurological sequelae of congenital toxoplasmosis: an observational prospective cohort study. *PLoS Med.* 2010 Oct;7(10).
11. Foulon W, Naessens A, Ho-Yen D. Prevention of congenital toxoplasmosis. *J Perinat Med.* 2000;28(5):337-45.
12. Gras L, Wallon M, Pollak A, Cortina-Borja M, Evengard B, Hayde M, et al. Association between prenatal treatment and clinical manifestations of congenital toxoplasmosis in infancy: a cohort study in 13 European centres. *Acta Paediatr.* 2005 Dec;94(12):1721-31.
13. Montoya JG, Remington JS. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin Infect Dis.* 2008 Aug 15;47(4):554-66.
14. Campello Porto L, Duarte EC. Association between the risk of congenital toxoplasmosis and the classification of toxoplasmosis in pregnant women and prenatal treatment in Brazil, 1994-2009. *Int J Infect Dis.* 2012 Jul;16(7):e480-6.
15. Kieffer F, Wallon M, Garcia P, Thulliez P, Peyron F, Franck J. Risk factors for retinochoroiditis during the first 2 years of life in infants with treated congenital toxoplasmosis. *Pediatr Infect Dis J.* 2008 Jan;27(1):27-32.
16. Hengst P. Screening for toxoplasmosis in pregnant women: presentation of a screening programme in the former "East"-Germany, and the present status in Germany. *Scand J Infect Dis Suppl.* 1992;84:38-42.
17. Kasper DC, Sadeghi K, Prusa AR, Reischer GH, Kratochwill K, Forster-Waldl E, et al. Quantitative real-time polymerase chain reaction for the accurate detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009 Jan;63(1):10-5.
18. Knerer B, Hayde M, Gratzl R, Strobl W, Pollak A. [Direct detection of *Toxoplasma gondii* with polymerase chain reaction in diagnosis of fetal toxoplasma infection]. *Wien Klin Wochenschr.* 1995;107(4):137-40.

19. Gratzl R, Sodeck G, Platzer P, Jager W, Graf J, Pollak A, et al. Treatment of toxoplasmosis in pregnancy: concentrations of spiramycin and neospiramycin in maternal serum and amniotic fluid. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002 Jan;21(1):12-6.
20. Gratzl R, Hayde M, Kohlhauser C, Hermon M, Burda G, Strobl W, et al. Follow-up of infants with congenital toxoplasmosis detected by polymerase chain reaction analysis of amniotic fluid. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1998 Dec;17(12):853-8.
21. Prusa AR, Hayde M, Pollak A, Herkner KR, Kasper DC. Evaluation of the liaison automated testing system for diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2012 Nov;19(11):1859-63.