

Anticuerpos séricos contra *Haemophilus influenzae* en niños de la provincia de Valladolid

A. Blanco Quirós, P. Bachiller Luque, J.J. Tellería Orriols, A. Nieto Nuez

Resumen. *Fundamento.* Las infecciones invasivas por *Haemophilus influenzae* de tipo b (Hib) en el niño están aumentando en España. Además, cada vez son más resistentes a los antibióticos. Actualmente se dispone de vacunas eficaces frente a Hib y se discute su inclusión en el calendario vacunal. El conocimiento de la serología infantil puede ser útil para tomar una decisión.

Métodos. Se estudiaron 235 niños normales, de 1 mes a 15 años de edad. También se incluyeron 35 sueros de adultos. Se conjugó polisacárido de Hib con tiramina, fijándola a placas microtiter de poliestireno. La determinación de los anticuerpos se hizo mediante ELISA y se expresó en unidades de densidad óptica. Se consideró como límite de protección el título medio de anticuerpos presentado por 6 sueros de un enfermo de síndrome de Bruton (17 uu), tomados justo antes de la gammaglobulinoterapia.

Resultados. La tasa de anticuerpos se correlacionó con la edad ($p < 0,001$). Los niveles en los niños menores de 3 años ($25,7 \pm 32,5$) fueron inferiores a los de mayor edad ($p < 0,001$). El 53,0% de niños menores de 3 años no alcanzó el límite de anticuerpos, comparado al 15,2% entre 3-6 años y el 22,7% entre 6-14 años. Mientras que las tasas de anticuerpos en los sueros positivos aumentan con la edad, a partir de los 3 años disminuye el porcentaje de niños seropositivos.

Conclusiones. El número de niños espontáneamente protegido contra Hib es bajo (47%), hasta los 3 años, para luego aumentar rápidamente. La vacunación debe dirigirse preferentemente a ese grupo de edad.

An Esp Pediatr 1996;45:487-492.

Palabras clave: *Haemophilus influenzae*; Vacunas; Anticuerpos séricos.

SERUM ANTIBODIES AGAINST HAEMOPHILUS INFLUENZAE IN CHILDREN FROM THE PROVINCE OF VALLADOLID (SPAIN)

Abstract. *Objective:* Invasive infections by *Haemophilus influenzae* type b (Hib) in children are increasing in Spain. Moreover, they are becoming more resistant to antibiotics. Currently, effective vaccines against Hib are available and their inclusion in the routine schedule of immunizations is discussed. Knowledge of the childhood serology appears to be useful in decision making.

Patients and methods: Two hundred and thirty-five normal children, between 1 month and 15 years of age, were studied. Thirty-six adults sera were also included as controls. Polysaccharide of Hib was conjugated with tyramine and used to coat polystyrene microtitration

plates. The determination of antibodies was performed by ELISA and the results are expressed in optical density units. The mean level of antibodies present in 6 sera from a patient with Bruton syndrome (17 uu), just before degammaglobulinotherapy, was considered as the limit of protection.

Results: The antibody titer correlated with age ($p < 0.001$). The levels in children younger than 3 years (25.7 ± 32.5) were lower than in older children ($p < 0.001$). Of the children younger than 3 years of age, 53% did not reach the protective level of antibodies, compared to 15.2% of those between 3-6 years and 22.7% of children between 6 and 14 years. Whereas the mean antibody level increased with age in positive sera, the percentage of seropositive children decreased after 3 years of age.

Conclusions: The number of children spontaneously protected against Hib is low (47%) until 3 years of age. Nevertheless, this number increases rapidly after this age. Immunization must be restricted to this age group.

Key words: *Haemophilus influenzae*; Immunization; Serum antibodies.

Introducción

Las infecciones por *Haemophilus influenzae* de tipo b (Hib) llamadas invasivas son cada vez más frecuentes y más resistentes a los antibióticos⁽¹⁾. Superan los 100 casos/100.000 niños menores de 5 años en países en desarrollo y oscilan de 20 a 100 en los desarrollados^(2,3). La mayor incidencia ocurre en menores de 7 meses⁽⁴⁾. La meningitis es la forma más común, mientras que la epiglotitis es particularmente frecuente en algún país, como Finlandia, y rara en grupos étnicos, como los esquimales^(5,6). En el Hospital «Miguel Servet» de Zaragoza se recogieron 58 casos de infección invasiva entre 1981-90, de los que el 63% fueron meningitis, el 10% artritis, el 10% epiglotitis, 8,6% celulitis y el 6,9% neumonías⁽⁷⁾. En España la patología infantil por Hib no alcanza la importancia de otros países aunque está en aumento; de un total de 279 meningitis bacterianas recogidas desde 1986 a 1990 en el Hospital «del Niño Jesús» de Madrid, el Hib causó el 16%, comparado al 70% de la *Neisseria meningitidis*⁽⁸⁻¹⁰⁾. En España, los recién nacidos infectados por Hib son raros y los casos se comunican aisladamente^(11,12); sin embargo, en otros países ya superan el 6-7% de sepsis y meningitis. Se relaciona este incremento con la escasa inmunización de las gestantes, lo que podría corregirse mediante vacunación.

Actualmente se dispone de vacunas conjugadas a proteínas cuya eficacia está bien comprobada, pero se discute la pertinencia de su inclusión en el calendario vacunal infantil⁽¹³⁻¹⁶⁾, como ya

Area de Pediatría. Facultad de Medicina. Universidad de Valladolid.

Correspondencia: Prof. Alfredo Blanco Quirós. Pediatría, Facultad de Medicina. C/. Ramón y Cajal, 5. 47005 Valladolid.

Recibido: Julio 1995

Aceptado: Abril 1996

se hizo en Estados Unidos y en Finlandia. El conocimiento de las cifras de seroprevalencia de la propia población es una información útil para la organización y el seguimiento de un programa preventivo de cualquier enfermedad infecciosa. Comunicamos los datos serológicos contra polisacárido de Hib en la población infantil de nuestra área.

Métodos

Antígeno

La determinación de anticuerpos anti-Hib se realizó mediante ELISA. El antígeno que utilizamos fue polisacárido capsular proporcionado por la Dra. R. Schneerson del National Institute of Child Health and Human Development de Bethesda (EE.UU.) en donde se aisló mediante la técnica común de precipitación con cetavón y etanol, a partir de la cepa Madigan^(17,18). En nuestro laboratorio conjugamos luego el antígeno con tiramina siguiendo el método de Anthoy publicado más recientemente por Barra y cols.⁽¹⁹⁾. Para ello activamos 500 µg del polisacárido diluido en 1 ml de NaOH 0,01N, con bromuro de cianógeno (6,5 mg) a 1 g/ml en acetonitrilo. Se colocó la mezcla a temperatura ambiente durante 10 minutos, manteniendo el pH a 10,8 con NaOH 0,1N. La tiramina se preparó diluyendo 5 mg en CO₃HNa 0,5M, a la concentración de 50 mg/ml y a pH 8,5 mantenido con ClH 0,1N. Se mezclaron ambas soluciones y se dializaron frente a agua destilada y luego contra tampón fosfato pH 7,4, durante 24 horas cada una a 4°C. El polisacárido conjugado se ajustó a la concentración final de 2 µg/ml para su posterior utilización en las placas ELISA.

Técnica de ELISA

Se colocaron 100 µl de polisacárido conjugado en cada pocillo de placas de poliestireno de 96 pocillos. Tras una incubación de 24 horas a temperatura ambiente se lavó tres veces con tampón fosfato salino pH 7,4 y tween (PBS-Tween 20). Los espacios libres de la placa se saturaron con 150 µl de seroalbúmina bovina (BSA) al 1% durante 60 minutos a 37 °C. Los sueros fueron diluidos a 1/160 en BSA al 0,1% y se incubaron 100 µl/pocillo durante 24 horas a temperatura ambiente. Hicimos los correspondientes lavados en un sistema automático y los repetimos al menos tres veces. Posteriormente se añadieron 100 µl de anticuerpos por anti-IgG humana marcado con peroxidasa y diluido a 1/4.000 en PBS-Tween 20, y se incubó a 37 °C durante 60 minutos. Después de esta reacción los lavados se repitieron seis veces. Se reveló con 100 µl de ortofenil-diamina (OPD) diluida en buffer citrato fosfato, pH 5,0. La reacción final se frenó con ácido sulfúrico 4N. La lectura de la densidad óptica (DO) se hizo mediante un fotómetro multiscan (EAR 400. SLT. Austria) a 492 nm.

Ensayos técnicos

Hasta decidir las condiciones óptimas de trabajo se realizaron numerosos ensayos con cada una de las reacciones. Para fijar el antígeno de polisacárido se probaron concentraciones de 2,5 y 10 µg/ml, a su vez diluido en buffer carbónico/bicarbonato

pH 9,6, en PGS pH 7,4 y en PBS-Tween 20 a pH 7,4. Los mejores resultados se obtuvieron con 2 µg/ml de antígeno diluido en PBS-Tween 20. Respecto a los sueros, las diluciones estudiadas fueron 1/20; 1/40; 1/80; 1/160; 1/320 y 1/640 en BSA concentrada al 0,1%; al 1% y al 2%. Los resultados más discriminativos se consiguieron con suero diluido al 1/160 en BSA al 0,1%. También se probaron tres diluciones de BSA para bloquear los pocillos, obteniendo el mejor resultado con BSA al 1%. Durante las pruebas se observó que utilizando anticuerpo anti-IgG diluido al 1/3.000 el revelado era demasiado rápido, por lo que luego se diluyó al 1/4.000. La concentración habitual de OPD (40 mg/dl) en buffer citrato fosfato pH 5,0 también produjo revelados muy rápidos, por lo que se utilizó a 20 mg/dl. La concentración final del H₂O₂ presentado al 10 vol% (v/v) fue de 120 µl/dl de solución de revelado. El tipo de placa fue también motivo de varios ensayos por la pobre fijación del polisacárido al plástico. Se probaron diferentes placas de Nunc y luego tres tipos de placas activadas de la marca Costar: «high binding», «covalent binding surface» y «medium binding»; la primera fue la que ofreció resultados más discriminatorios y la que utilizamos rutinariamente.

Valoración de los resultados

En la mitad de la plaza se fijó antígeno capsular y en la otra mitad sólo diluyente. Cada suero se incubó por cuadruplicado, colocando dos muestras en pocillos que tenían antígeno de Hib y otras dos en pocillos sin antígenos. El resultado es el correspondiente a la DO de los pocillos con antígeno, una vez restado el valor de los correspondientes pocillos sin antígeno. Previamente, la DO de los pocillos blancos (sin antígeno ni suero) se había restado a todos los valores. Este valor de DO resultante fue denominado unidad aleatoria (uu). El coeficiente de variación intraensayo de los valores de DO se calculó repitiendo un mismo suero 17 veces por duplicado y fue de 10,63%. Dos sueros fueron incluidos de forma repetida en todas las placas y su resultado se utilizó para homologar los datos conseguidos en diferentes placas. Cuando se observó una diferencia excesiva se repitió la placa entera.

Límite de protección

Para calcular el límite de protección se estudió un enfermo afecto de enfermedad de Bruton que recibía periódicamente gammaglobulina y que mantenía una buena situación clínica. Se utilizaron los sueros extraídos como control, justo antes del tratamiento. En todos se determinó la cifra total de IgG y en el presente estudio se emplearon 6 sueros que tenían niveles de IgG inferiores a 200 mg/dl.

Métodos estadísticos

Debido a las características de los datos sólo se utilizaron pruebas para muestras con distribución no paramétricas. La diferencia de los valores medios de tasas de anticuerpos se valoró con la prueba de Mann-Whitney. La correlación entre los niveles y los meses de edad se hizo mediante la prueba de

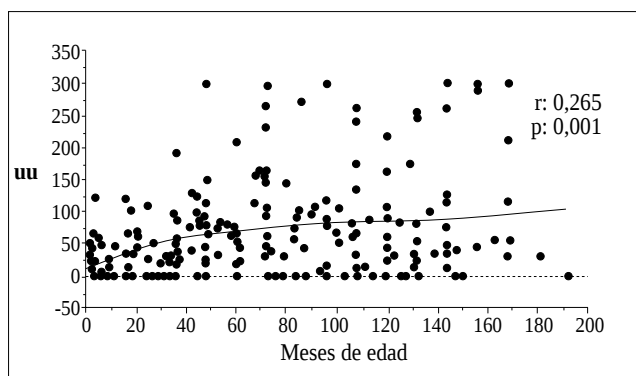


Figura 1. Niveles de anticuerpos anti-*Haemophilus influenzae* detectados en los niños, según edad (Test de Spearman, $p < 0,001$).

Spearman. La diferencia del número de casos negativos de cada grupo se estudió con la prueba de chi cuadrado.

Material

Los sueros se obtuvieron de 235 niños a los que se hicieron análisis de sangre como control de algún proceso patológico ya superado o que fueron analizados con motivo de un estudio preoperatorio. La mayoría de los niños procedía de la consulta ambulatoria del Hospital Clínico de Valladolid. Se descartaron aquellos pacientes en los que el motivo del análisis sugería alguna infección reciente o de antecedente de infecciones frecuentes. En ningún caso padecían procesos infecciosos agudos. Debido a las lógicas limitaciones de carácter ético no se puede afirmar que fueran estrictamente normales, pero creemos que la muestra es suficientemente representativa de la población infantil de nuestro medio. Los 50 adultos fueron jóvenes voluntarios, la mayoría menores de 30 años de edad.

Resultados

Valores medios

Los datos obtenidos en los niños se agruparon según la edad en tres grupos: de 0 a 3 años, de 3 a 6 años y de 6 a 14 años. Los valores de densidad óptica ofrecieron en todos los grupos de edad una amplia variación, oscilando entre 0 y 360. Las cifras más bajas fueron las del grupo de 0-3 años de edad ($25,7 \pm 32,5$) y las más altas se hallaron entre los de 6 a 14 años ($80,3 \pm 85,0$), que incluso fueron más elevadas que las de los adultos ($74,5 \pm 73,2$). Hubo una alta correlación entre la edad y los niveles de anticuerpos ($p < 0,001$) (Figs. 1 y 2). La diferencia de tasas entre los niños pequeños y los demás grupos fueron altamente significativas (Man Whitney, $p < 0,001$). Sin embargo, el número de casos negativos fue sólo ligeramente mayor que el de los adultos (Chi cuadrado, $p < 0,05$) (Tabla I).

Límite de protección

Dos sueros del enfermo agammaglobulinémico fueron negativos, pero las tasas de los otros cuatro oscilaron de 3,6 a 53. Consideramos como límite protector de anticuerpos la cifra me-

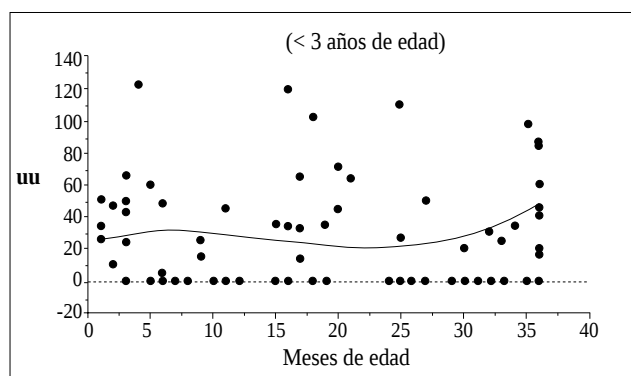


Figura 2. Gráfica detallada de los niños menores de 3 años. Hasta los 5 meses, la mayoría de los sueros fueron positivos, probablemente por procedencia materna. Posteriormente los valores disminuyeron hasta los 20-25 meses para ir luego elevándose.

Tabla I Anticuerpos séricos anti-Hib

Grupo	Nº	Niveles medios (uu)*	Casos negativos**
0-3 años	66	$25,7 \pm 32,5$	35 (53,0%)
3-6 años	59	$74,0 \pm 65,4$ ($p < 0,001$)	9 (15,2%) ($p < 0,0001$)
6-14 años	110	$80,3 \pm 85,0$ ($p < 0,001$)	25 (22,7%) ($p < 0,0001$)
Adultos	50	$71,7 \pm 82,6$ ($p < 0,001$)	15 (30%) ($p: 0,02$).

Las comparaciones estadísticas están calculadas respecto al grupo de niños de 0-3 años.

* Mann-Whitney; ** Chi cuadrado.

dia de los 6 sueros de este enfermo, que fue de 17. En total hallamos 80 sueros con tasas inferiores a esta cifra. El porcentaje más alto correspondió al grupo de niños menores de 3 años (53,0%) y el más bajo al de 3 a 6 años (15,2%). Aunque el grupo de 6-14 años mostró cifras medias superiores, incluía mayor número de niños no protegidos (22,7%). Mientras que la tasa media de anticuerpos aumenta con la edad, el número de niños aparentemente protegidos disminuye, a partir de los 3 años de edad (Fig. 3).

Discusión

El carácter protector de los anticuerpos dirigidos contra los polisacáridos de la cápsula del Hib está aceptado desde hace años. Las primeras pruebas proceden de animales protegidos con anticuerpos previamente a la inoculación bacteriana⁽²⁰⁾. Más tarde se confirmó en humanos tratados con gammaglobulina específica⁽²¹⁾. En los años siguientes se observó que los anticuerpos producidos con vacuna protegían a los niños de infecciones invasivas y que estos anticuerpos tenían capacidad bactericida⁽²²⁾. Sin embargo, definir el nivel mínimo de anticuerpos que protege contra la infección es complejo. Desde 1973 se acepta 0,1 µg/ml de anticuerpos específicos como umbral protector. El cálculo se basó de forma apriorística en administrar gamma-

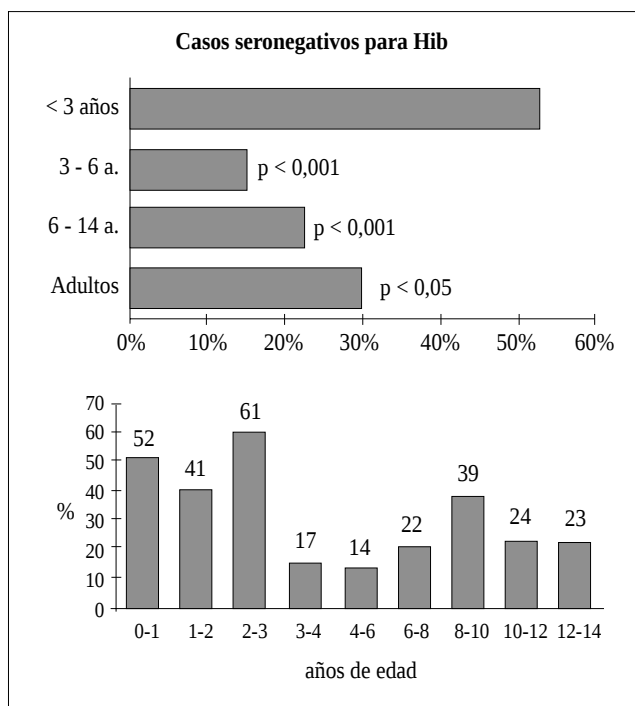


Figura 3. El porcentaje de niños no protegidos hasta los 3 años superó el 50%. Disminuyó bruscamente entre los 3-6 años y a continuación sufrió un progresivo aumento (arriba). En la parte de abajo se muestran los mismos datos, desglosados por años.

globulina a enfermos con síndrome de Bruton y observar la disminución progresiva de los anticuerpos anti-Hib en su suero⁽²³⁾. Más adelante también se investigó de forma prospectiva la incidencia de infecciones invasivas en niños con niveles superiores o inferiores a 0,1 µg/ml, concluyendo que este límite era aproximadamente correcto.

Cuando realizamos este trabajo no disponíamos todavía de suero control homologado, por lo que intentamos conocer el umbral de protección serológica válido para nuestra propia sistemática. Nos basamos en los datos aportados por un enfermo adolescente afecto de agammaglobulinemia tipo Bruton tratado con gammaglobulina, utilizando los controles sanguíneos previos a la administración de IgG y teniendo en cuenta que llevaba años bien controlado clínicamente y con una infectibilidad normal, por lo que parecía adecuadamente protegido. En contra de lo que esperábamos, 4/6 sueros mostraron cifras detectables de anticuerpos, aun cuando los niveles de IgG total en ellos eran muy bajos, inferiores a 200 mg/dl. Edwards y cols.⁽²⁴⁾, comparando diferentes técnicas concluyen que cada investigador debe establecer su propio límite de protección. Aunque se use el mismo suero patrón, los resultados no son homologables cuando la técnica es diferente. Incluso, con el mismo test, los resultados no son iguales si la determinación final de los niveles se calcula por el sistema de «líneas paralelas» o de «punto final»⁽²⁵⁾.

Al introducirse las vacunas, algunos autores afirmaron que el umbral de protección con anticuerpos inducidos por vacuna-

ción no equivale al logrado por infección natural y que después de la vacunación el límite se debería establecer en 1 mg/ml, a las 3 semanas de la inmunización, en lugar de 0,1 µg/ml⁽²⁶⁾. Sin embargo, alguna vacuna como la PRP-D, que protege eficazmente produce niveles < 1 µg/ml en bastantes niños⁽²⁷⁾. Estos datos parecen contradecir que el límite de 1 µg/ml para vacunados sea incuestionable en todas las situaciones, más bien es un tema que se mantiene abierto⁽²⁸⁾.

Nuestros resultados muestran que antes de los 3 años de edad hay una elevada proporción de niños sin tasas protectoras de anticuerpos contra polisacárido de Hib y quienes los presentan tienen tasas inferiores a las de niños mayores. Con la edad aumentan progresivamente los niveles de anticuerpos. Sin embargo, el porcentaje de niños protegidos no sigue el mismo curso. Aumenta bruscamente a partir de los 3 años y luego, en líneas generales disminuye. Suponemos que esta evolución está en relación con una mayor frecuencia en la edad infantil de infecciones de vías respiratorias altas, no invasivas por Hib, que en más del 25% de los casos se deben a Hib⁽²⁹⁾.

Es bien conocido que la presencia de anticuerpos específicos protege frente a infecciones invasivas por Hib, pero resulta difícil explicar el significado de la serología negativa. En los niños menores de 3 años coincide la mayor frecuencia de infecciones invasivas y también de serología negativa. Al contrario, en niños mayores y adultos hallamos un alto índice de seronegatividad, mientras que las infecciones invasivas son excepcionales⁽⁷⁾. A pesar de carecer de anticuerpos es muy probable que estén protegidos gracias a su facilidad para responder inmediatamente en caso de infección, probablemente a causa de una memoria inmunitaria. En un estudio de Scolea y cols.⁽³⁰⁾ los niños con epiglotitis tenían bacteriemias menos intensas que los niños con meningitis y producían tasas mucho más altas de anticuerpos en la convalecencia; creen que esta respuesta permite que su enfermedad sea más leve.

La presencia de anticuerpos anti-Hib séricos no significa necesariamente que hubo una infección previa por Hib, porque algunas bacterias comparten los mismos antígenos capsulares⁽³¹⁾. Así, la inmunización con neumococo 6A también forma anticuerpos anti-Hib, aunque la reacción cruzada es unidireccional, pues, a la inversa, la vacuna Hib apenas forma anticuerpos anti-neumococo 6A⁽¹⁷⁾.

Parece improbable que la determinación serológica anti-Hib llegue a tener utilidad diagnóstica, como en otras infecciones, aunque se mejore la técnica. El motivo principal es que tras una infección invasiva por Hib, el incremento de anticuerpos específicos es muy inconstante⁽³²⁾ aunque la evolución sea favorable⁽³³⁾, especialmente en los lactantes⁽³⁴⁾. No obstante, también hay autores que los encuentran rutinariamente elevados⁽³¹⁾. Nosotros tampoco hallamos respuesta en tres infecciones agudas por Hib que estudiamos. Es claro que la falta de anticuerpos no significa necesariamente que no haya habido infección porque hay circunstancias en las que la respuesta serológica frente al Hib fracasa. Ocurre en inmunodeficiencias congénitas, pero también más específicamente en situaciones de asplenia, es-

plenectomía o hipoesplenía funcional, como en la drepanocitosis o en la celíaca. Asimismo, hay una base genética de carácter racial, que se reconoció en esquimales de Alaska, indios apaches y negros americanos^(6,21). El mecanismo exacto de la falta de respuesta no lo conocemos y se podría pensar que fuera la causa favorecedora de la infección, pero no es así ya que otros individuos con similares infecciones y evoluciones producen normalmente anticuerpos anti-Hib. En general, la respuesta es más alta en niños mayores con epiglotitis, que en pequeños con meningitis⁽³⁰⁾.

Se comunicaron individuos que no respondieron frente a la infección natural, y que luego lo hicieron tras la vacuna conjugada^(35,36). Las circunstancias comentadas indican que la respuesta de anticuerpos ante la inmunización con polisacárido conjugado a proteínas es diferente y más potente que la propia infección natural⁽³³⁾, por lo que estaría indicada incluso en niños con antecedentes de mala respuesta al Hib.

La formación de anticuerpos es diferente tras infección natural o tras vacuna conjugada, y la diferencia no es sólo cuantitativa. El polisacárido de Hib produce anticuerpos por una activación de linfocitos B que es independiente de los T. Son de clase IgM e IgG, pero sin memoria inmunológica y fenómeno «booster»; tras una reinfección suben igual que tras la primoinfección. La respuesta T-independiente es común frente a polisacáridos, mientras que las proteínas provocan una reacción T-dependiente con memoria inmunológica. La respuesta T-independiente es muy inmadura en lactantes, motivo de las frecuentes infecciones Hib en esa edad. Esta peculiar respuesta frente a Hib explica que hayamos encontrado tasas de anticuerpos tan bajas en nuestros niños. Probablemente indiquen una infección relativamente reciente y luego desaparezcan.

Las antiguas vacunas no conjugadas funcionan de forma T-independiente, como la infección natural, pero con las nuevas, conjugadas a proteínas, la síntesis de anticuerpos es T-dependiente y con reacción «booster». Esta reacción que habría que atribuir a la molécula portadora (carrier), también se desencadena contra el polisacárido^(37,38), pues al inyectar polisacárido puro a niños inmunizados con vacuna conjugada también hay reacción tipo «booster»⁽³⁸⁾, indicando que estas vacunas inducen también memoria en las células B⁽³³⁾. Llamativamente, algún autor no comprobó efecto «booster» con vacunas conjugadas. Fueron experiencias en adultos y se cree que estarían ya sensibilizados frente al «carrier» (toxóide de tétanos, difteria, etc.), con lo que la primera inyección ya sería realmente una reacción secundaria, y entre ellas y las siguientes habría escasa diferencia^(17,39).

En resumen, presentamos datos serológicos de niños procedentes de nuestro medio que indican la escasa protección hasta los 3 años; sin embargo, a partir de esa edad están mayoritariamente protegidos frente a Hib, por lo que la profilaxis debe limitarse a los menores.

Bibliografía

- 1 Perea EJ, García MC, Clavijo MJ y cols. Resistencias a *Haemophilus influenzae* en España. Segundo estudio (1990). *Enf Infecc Microbiol*

- Clin* 1993; **11**:19-28.
- 2 Weinberg GA, Granoff DM. Polysaccharide-protein conjugate vaccines for the prevention of *Haemophilus influenzae* type b disease. *J Pediatr* 1988; **113**:621-631.
- 3 Takala AK, Eskola J, Palmgren J, Ronnberg PR, Kela E, Rekola P, Makela PH. Risk factor of invasive *Haemophilus influenzae* type b disease among children in Finland. *J Pediatr* 1989; **115**:694-701.
- 4 Alphen L van, Bijlmer H. Molecular epidemiology of *Haemophilus influenzae* type b. *Pediatrics* 1990; Suppl **85**:S636.
- 5 Takala AK, Eskola J, Peltola H, Makela PH. Epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* type b disease among children in Finland before vaccination with *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis* 1989; **8**:297-302.
- 6 Ward J, Brenneman G, Letson GW, Heyward WL y the Alaska Hib Vaccine Study Group. Limited efficacy of a *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine in Alaska native infants. *N Engl J Med* 1990; **323**:1393-1401.
- 7 Juan de F, Campos C, Bustillo M, Baldovin I, Bello E, Elviro L. Infecciones invasivas por *Haemophilus influenzae* tipo b en la infancia (1981-1990). *An Esp Pediatr* 1993; **39**:111-115.
- 8 Miguel MV, Menéndez-Rivas M, Vila S, Vázquez JA. Cambios en meningitis purulentas pediátricas. *An Esp Pediatr* 1994; **41**:329-332.
- 9 Soult JA, Macías MC, Martín F, Ponce F, Muñoz M, Menéndez M, Tovaruela A, Navarro J. Meningitis por *Haemophilus influenzae* tipo b. Estudio de 99 casos. *An Esp Pediatr* 1994; **40**:443-448.
- 10 Vázquez C, Municio M, Salazar M, Fidalgo I, Gutiérrez MC. Meningitis por *Haemophilus influenzae*. Revisión de 21 casos. *An Esp Pediatr* 1982; **17**:435-444.
- 11 Salado C, Ruiz C, González E, Martínez M, Nieves A, Abasolo N, Barez F. Sepsis por *Haemophilus influenzae* tipo b en el recién nacido. *An Esp Pediatr* 1993; **39**:458-460.
- 12 Molina J, Moreno A, Roque JM, Arcas R, Figueras J. Sepsis y meningitis neonatal por *Haemophilus influenzae*. *An Esp Pediatr* 1992; **36**: 397-398.
- 13 Booy R, Moxon ER. Immunization of infants against *Haemophilus influenzae* type b in the UK. *Arch Dis Child* 1991; **66**:1251-1254.
- 14 Asociación Española de Pediatría. Calendario de Vacunaciones España 1995. *An Esp Pediatr* 1995; **45**:81.
- 15 Cochi SL, Broome CV. Vaccine prevention of *Haemophilus influenzae* type b disease: past, present and future. *Pediatr Infect Dis* 1986; **5**:12-19.
- 16 Committee on Infectious Diseases. Puesta al día de las vacunas conjugadas frente al *Haemophilus influenzae* tipo b. *Pediatrics* (ed esp) 1989; **28**:13.
- 17 Schneerson R, Robbins JB, Parke JC, Bell C, Schlesselman JJ, Sutton A, Wang Z, Schiffman G, Karpas A, Shiloach J. Qualitative and qualitative analyses of serum antibodies elicited in adults by *Haemophilus influenzae* type b and *Pneumococcus* type 6A capsular polysaccharide-tetanus toxoid conjugates. *Infect Immun* 1986; **52**:519-528.
- 18 Sutton A, Vann WF, Karpas AB, Stein KE, Schneerson R. An avidin-biotin based ELISA for quantitation of antibody to bacterial polysaccharide. *J Immunol Methods* 1985; **82**:215-224.
- 19 Barra A, Schulz D, Aucoeur P, Preud'homme JL. Measurement of anti-*Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide antibodies by ELISA. *J Immunol Methods* 1988; **115**:111-117.
- 20 Ambrosio D, Schreiber JR, Daum RS, Siber GR. Efficacy of human hyperimmune globulin in prevention of *Haemophilus influenzae* type b disease in infants rats. *Infect Immun* 1993; **39**:709-714.
- 21 Santosham M, Reid R, Ambrosino D, Wollff MC, Almeida-Hill J,

- Priebs C, Aspery KM, Croll L, Foster S, Burge G, Page B. Prevention of *Haemophilus influenzae* type b infections in high-risk infants treated with bacterial polysaccharide immunoglobulin. *N Engl J Med* 1987; **317**:923-929.
- 22 Peltola H, Kayhty H, Virtanen M, Makela PH. Prevention of *Haemophilus influenzae* type b bacteriemic infections with capsular polysaccharide vaccine. *N Engl J Med* 1984; **310**:1561-1566.
 - 23 Robbins JB, Parke JC, Schneerson R, Whisnant JK. Quantitative measurement of natural and immunization-induced *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide antibodies. *Pediatr Res* 1973; **7**:103-110.
 - 24 Edwards KM, Decker MD, Palmer D, Porch CR, Sell SH, Wright PF. Lack of comparability between commonly used serological assays of immune response to *Haemophilus influenzae* vaccine. *J Infect Dis* 1987; **155**:283-291.
 - 25 Lagergard T, Trollfors B, Claesson BA, Schneerson R, Robbins JB. Comparison between radioimmunoassay and direct and indirect enzyme-linked immunosorbent assays for determination of antibodies against *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide. *J Clin Microbiol* 1988; **26**:2554-2557.
 - 26 Kayhty H, Peltola H, Karanko V, Makela PH. The protective level of serum antibodies to the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b. *J Infect Dis* 1983; **147**:1100.
 - 27 Eskola J, Peltola H, Takala AK. Efficacy of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide diptheria toxoid conjugate vaccine in infancy. *N Engl J Med* 1987; **317**:717-722.
 - 28 Daum RS, Granoff DM. Lessons from the evaluation of immunogenicity. En: Ellis y Granoff. Development and clinical uses of *Haemophilus* type b conjugate vaccines. Nueva York: M. Dekker, 1994; 291-312.
 - 29 Del Castillo F, Barrio MI, García Perea A. Otitis media aguda en la infancia. Estudio clínico y microbiológico de 50 casos. *An Esp Pediatr* 1992; **37**:126-129.
 - 30 Scolea L, Rosales S, Welliver R, Ogra P. Mechanisms underlying the development of meningitis or epiglottitis in children often *Haemophilus influenzae* type b bacteriemia. *J Infect Dis* 1985; **151**:1162-1165.
 - 31 Dahlberg T. Quantitation of antibodies to *Haemophilus influenzae* type b in humans by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1981; **13**:1080-1087.
 - 32 Claesson BA, Lagergard T, Trollfors B, Gothefors L, Jodal U. Serum antibody response to capsular polysaccharide, outer membrane and lyophilized polysaccharide in children with invasive *Haemophilus influenzae* type b infections. *J Clin Microbiol* 1987; **25**:2339-2343.
 - 33 Donnelly JJ, Liu MA. Immunobiology of proteins carriers. En: Ellis y Granoff. Development and clinical uses of *Haemophilus* type b conjugate vaccines. Nueva York: M. Dekker, 1994; 291-312.
 - 34 Claesson BA, Lagergard T, Trollfors B. Development of serum antibodies of the immunoglobulin G class and subclasses against the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b in children and adults with invasive infections. *J Clin Microbiol* 1988; **25**:2549-2553.
 - 35 Weinberg GA, Murphy TV, Granoff D. La vacuna conjugada a base de polisacáridos de *Haemophilus influenzae* tipo b y de toxoide diftérico es inmunogénica en niños que desarrollaron enfermedad por Hib a pesar de la vacunación previa. *Pediatrics* (ed esp) 1990; **30**:213-215.
 - 36 Kaplan SL, Duckett T, Mahoney DH, Kennedy LL, Dukes CM, Schaffer DM, Mason EO. Immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-tetanus protein conjugate vaccine in children with sickle hemoglobinopathy or malignancies and after systemic infection. *J Pediatr* 1992; **120**:367-370.
 - 37 Weinberg GA, Einhorn MS, Lenoir A, Granoff PD, Granoff DM. Immunologic priming to capsular polysaccharide in infants immunized with *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-*Neisseria meningitidis* outer membrane protein conjugate vaccine. *J Pediatr* 1987; **111**:22-27.
 - 38 Anderson P, Pichichero M, Edwards K, Porch CR, Insel R. Priming and induction of *Haemophilus influenzae* type b capsular antibodies by Dpo20 and oligosaccharide-protein conjugate vaccine. *J Pediatr* 1987; **111**:644-650.
 - 39 Granoff DM, Boies EG, Munson RS. Immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-diptheria toxoid conjugate vaccine in adults. *J Pediatr* 1984; **105**:22-27.