
Portadores orofaríngeos de *Haemophilus influenzae* en niños venezolanos cuidados en guardería o en el hogar vacunados o no con vacuna poliribofosfato capsular de Hib conjugada al toxoide tetánico (PRP-T).

Olga Castillo-Febres¹, Giomaris López¹, Federico Ortega¹, Milagros Estopiñan¹, Laddy Casanova-Escalona¹, Miriam Sánchez-Naveda¹, Michael Decker² y Kathryn M. Edwards².

¹Unidad de Infectología Pediátrica, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela y

²Dept. Emergency Medicine, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, USA.

Palabras clave: *Haemophilus influenzae*, portador orofaríngeo, vacuna PRP-T.

Resumen. El objetivo del estudio fue determinar el porcentaje de colonización orofaríngea de *Haemophilus influenzae* tipo b (*Hib*) y no tipificable (*HiNT*) en niños, cuidados en guardería y en hogar vacunados o no con PRP/T. Se incluyeron niños sanos, menores de 7 años, excluyendo aquellos con antibióticoterapia el mes previo a la inclusión, divididos en: Grupo I vacunados y Grupo II no vacunados, subdivididos según cuidados en hogar o guardería. Se obtuvieron hisopados orofaríngeos para cultivo, identificación y serotipificación de *Hi* (Phadebact Test); como medidas estadísticas se utilizaron Chi cuadrado, test de Fisher's y Z y el "odds ratio". Se incluyeron 320 niños, 99 del Grupo I (49 en hogar y 50 en guarderías) y 221 en Grupo II (94 y 127, respectivamente). El porcentaje de portadores fue 22,8 (17,8% *HiNT* y 5% *Hib*). En el grupo I sólo se identificó *HiNT* y en el grupo II, de 56 cepas, 16 fueron *Hib* ($p = 0,016$). Predominó el *Hib* en guarderías (odds ratio = 13,5). La colonización por *HiNT* fue similar en ambos grupos, cuidados en el hogar (18 vs 19%) y en guarderías (16 vs 17%). En el grupo II la colonización por *Hib* fue mayor en guarderías (12%) que en el hogar (1%) ($p = 0,002$). En conclusión, el porcentaje de colonización por *Hib* en la muestra total y en no vacunados del hogar fue semejante a países desarrollados en la era prevacuna. La ausencia de la vacuna PRP-T y la asistencia a guarderías son factores de riesgo para colonización por *Hib*.

Oropharyngeal carriers in Venezuelan children in two child care settings, vaccinated or not with *Haemophilus influenzae* type b tetanus toxoid conjugate vaccine (PRP-T).

Invest Clin 2005; 46(1): 15 - 24

Key words: *Haemophilus influenzae*, oropharyngeal carriage, PRP-T vaccine.

Abstract. The objective was to estimate the oropharyngeal carrier rate of *Haemophilus influenzae* type b (*Hib*) and non typeable (*NTHi*) in unvaccinated and vaccinated children, with PRP/T vaccine, both cared at home and attending day care centers. Healthy children of either sex, younger of 7 years, excluding those that received antibiotics one month prior to the inclusion, were recruited from control clinics for healthy babies, and assigned to Group I fully immunized and Group II unimmunized. Both, children cared at home and attending day care centers were included. Parents provided an informed consent. Specimens were obtained from the oropharynx for culture, identification and serotyped by slide agglutination (Phadebact *Haemophilus* test). P values were obtained with Chi-square, Fisher's and Z test. Odds ratio was obtained when appropriated. Results were as following: a total of 320 children were enrolled, 99 in group I (49 cared at home, 50 attending day care) and 221 in group II (94 cared at home, 127 attending day care) the percentage of carriers was 22.8% (17.8% *NTHi* and 5% *Hib*). The carriage rate of *NTHi* was similar in groups I and II cared at home (18%vs 19%), and for those attending day care were 16% vs 17%. Carriage rate of *Hib* in children attending day care of group II was 12% vs 1% of those cared at home (p=0.002). None of the children in group I was colonized by *Hib*. The *Hib* carrier rate was more similar to that of industrialized countries in the pre vaccine era in children cared at home, however, attendance to a day care center significantly increases its risk. The PRP/T vaccine appears to prevent the carrier state in both care settings.

Recibido: 18-03-2003. Aceptado: 15-07-2004.

INTRODUCCIÓN

El *Haemophilus influenzae* (*Hi*) es uno de los patógenos más importantes en la población pediátrica, como agente productor de enfermedad invasiva (meningitis, sepsis, artritis) patologías producidas principalmente por el tipo b (*Hib*) o como causante de infecciones menos severas como otitis, conjuntivitis y sinusitis, producidas principalmente por cepas no tipificables (*HiNT*) (1).

Los humanos constituyen los únicos reservorios de *Hi* y su transmisión ocurre por vía respiratoria de personas infectadas a susceptibles (2). Las cepas *HiNT* son parte de la flora normal del tracto respiratorio de niños; de ellos 10 a 80% son colonizados en algún momento de su vida. En países desarrollados se estima que los niños de cinco años de edad han sido colonizados por al menos una cepa, mientras en los subdesarrollados, como Nueva Guinea, la colonización ocurre en edades mucho más temprana.

nas alrededor de los seis 6 meses (2,3). El *Hib* también puede colonizar la faringe; su prevalencia depende de factores tales como país, edad, uso rutinario de vacunas, etc.; pudiendo ser tan alto como 33% en Gambia o entre 1% a 4% observados en la era prevacuna en países industrializados (2,4,5). La situación es diferente en guarderías donde la transmisión de *Hi* es altamente probable en niños no vacunados, especialmente aquellos menores de 24 meses donde la tasa de portadores de *Hib* puede alcanzar un 56% (4, 6).

En los países industrializados, el amplio uso de las vacunas prácticamente eliminó las meningitis y otras formas invasivas de enfermedades causadas por *Hib*; en los Estados Unidos la incidencia declinó de 34 a 0,4/100.000, de 1987 a 1997 en menores de cinco años (7). En los niños nativos de Alaska, una población considerada de alto riesgo, la enfermedad invasiva por *Hib* disminuyó de 332 a 17 casos por 100.000 niños, posterior a la vacunación universal contra *Hib* (8); sin embargo, en países donde la vacuna no es de uso rutinario, la incidencia de meningitis es de 35/100.000 (9). En Venezuela la enfermedad ocurre con una incidencia de 60/100.000 en menores de 24 meses (10). Se ha demostrado que la vacuna conjugada reduce el portador faríngeo de *Hib*, lo que disminuye su transmisión a niños susceptibles contribuyendo a la llamada inmunidad de rebaño (11-13).

El objetivo de este estudio fue determinar el porcentaje de colonización orofaríngea por *Hi* y sus tipos en niños asistentes a guarderías y cuidados en el hogar, vacunados o no con la vacuna contentiva del polirribosilribitol fosfato capsular del *Hib* conjugada al toxoide tetánico (PRP-T).

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio prospectivo, descriptivo y comparativo fue realizado en Valencia, Ve-

nezuela, país tropical, con dos estaciones climáticas al año, verano e invierno (mayo a octubre), caracterizado por presencia de lluvias mas no por descenso de la temperatura.

Sujetos

Fueron escogidos en la consulta de niños sanos de centros privados, donde acuden padres de nivel socio económico medio, durante el lapso de un año y medio (julio 98-diciembre 1999). En la primera visita se les realizó examen físico, historia médica personal y familiar, orientada a recoger datos relativos a los factores de riesgo tales como: antecedentes de otitis, meningitis, neumonías, número de horas semanales en guarderías, número de niños en el hogar menores de 7 años y su estado de salud. A todo niño colonizado por *Hib* se le hizo un seguimiento por 6 meses para descartar desarrollo de enfermedad invasiva en él o en otros menores de su entorno familiar.

Criterios de inclusión

Niños sanos, eutróficos, menores de 7 años, ambos sexos, con consentimiento informado, escrito por parte de los padres acorde con las prácticas de ética de investigación clínica.

Criterios de exclusión

Enfermedades agudas o crónicas, asplénicos, administración de antimicrobianos el mes previo al estudio.

Se distribuyeron en dos grupos: Grupo I vacunados (esquema de vacunación completa contra el *Hib*). Grupo II no vacunados contra dicho germen (ninguna dosis). Ambos se clasificaron a su vez, según su origen: hogar o guarderías, estos últimos permanecían 8 horas diarias, 5 días a la semana, por un período no inferior a 4 meses. Dado que para el momento de la realización del estudio, la vacuna *Hib* no era de uso rutinario en Venezuela, el grupo I fue escogi-

do después de haber concluido un estudio de inmunogenicidad con vacuna PRP-T, realizado por los autores.

Vacuna

Se utilizó la vacuna poliribosilribitol fosfato capsular (PRP) conjugada al toxoide tetánico (PRP-T) de *AVENTIS PASTEUR* (ACTHib)[®], fabricada en Lyon Francia. Para los fines de este estudio se consideró esquema de vacunación completo, a la administración de tres dosis; bien sea administradas todas durante el primer año de vida o dos dosis en el primer año de vida, más una tercera a los 15 meses de edad.

Técnica

Las muestras fueron obtenidas de la orofaringe de cada niño, previo al desayuno, e inmediatamente fueron colocadas en el medio de transporte de Stuart y sembradas dentro de un lapso menor a dos horas en agar chocolate enriquecido (preparado con agar GC hemoglobina, suplemento nutritivo poli enriquecido *OXOID*) suplementado con 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de bacitracina como inhibidor de crecimiento de especies no *Hi*. Una vez inoculadas las placas, se incubaron durante 24 horas a 35°C, en una atmósfera de CO₂ (vela). Los criterios para la identificación de *Hi* se basaron en la morfología típica de las colonias, por la demostración de cocobacilos gram negativos mediante la tinción de Gram y la determinación de factores de crecimiento, usando las tiras de papel de filtro impregnadas de los factores X hemina y Y nicotinamida adenina dinucleótido (Becton Dickinson Microbiology Systems) en agar de Mueller Hinton (14). La tipificación de las cepas capsuladas se realizó mediante la reacción de aglutinación con antiseros anticapsulares monoespecífico (*Phadebact*). Esta prueba identificó las cepas como: *Hib* (tipo b), *Hia* (tipo a) *Hi* tipificable pero no *Hib*, ni *Hia*, y al no aglutinar, se consideraron no tipificables (*HiNT*).

Análisis estadístico

Se emplearon estadísticas descriptivas (frecuencias absolutas y proporciones). Para establecer la relación entre las variables, se utilizó la prueba de Chi cuadrado y la prueba exacta de Fisher's, considerándose como significativo un valor de $p < 0,05$. La prueba de Z, se aplicó para la comparación de la proporción del Hib en niños cuidados en guarderías y en el hogar, pertenecientes al grupo II. Se utilizó el Ajuste Residual Estandarizado (REA), para establecer las tendencias de la asociación que determina la significación. El riesgo o probabilidad de ocurrencia de los resultados observados fue determinado aplicando el "odds ratio".

RESULTADOS

Se estudiaron un total de 320 niños, 99 vacunados (grupo I) y 221 no vacunados (grupo II). En el grupo I, 50 niños asistieron a guardería y 49 eran cuidados en el hogar, de los cuales 66 (66%) eran menores de 2 años, con una relación M/F de 1. En el grupo II, 127 niños asistían a guardería y 94 eran cuidados en el hogar, de los cuales 131 (59%) tenían de 2 a 6 años de edad, con una relación M/F de 0,75. El total de niños estudiados que asistían a guardería fue de 177 y 143 cuidados en el hogar; al aplicarle la prueba de Chi cuadrado ($p = 0,247$) no se encontró relación significativa entre el origen y el grupo al cual pertenecen (Tabla I). Del total de 320 niños, a 73 (22,8%) se aislaron cepas de *Hi* (17,8% *HiNT* y 5% *Hib*): 17 en el grupo I y 56 en el grupo II; al tipificarlos, en el grupo I, todos correspondieron a cepas no tipificables (17), mientras en el grupo II se identificaron 16 cepas del tipo b y el resto a *HiNT*; siendo esta diferencia estadísticamente significativa $p = 0,016$, REA: $C11 = 25 > 1,96$ (Tabla II). La tasa de colonización de cepas no tipificables de *Haemophilus influenzae* fue similar en ambos grupos, fueran cuidados en guardería (16% vs

TABLA I
DISTRIBUCIÓN NUMÉRICA Y PORCENTUAL DE LOS 320 NIÑOS ESTUDIADOS VACUNADOS O NO, SEGÚN SU ORIGEN. VALENCIA, VENEZUELA

Grupos	Origen		Total
	Guardería	Hogar	
I (Vacunados)	50 (50,5%)	49 (49,5%)	99 (100%)
REA	-1,2	1,2	
II (No Vacunados)	127 (57,5%)	94 (42,5%)	221 (100%)
REA	1,2	-1,2	
Total	177 (55,3%)	143 (44,7%)	320 (100%)

Chi Cuadrado P = 0,247.

TABLA II
DISTRIBUCIÓN NUMÉRICA Y PORCENTUAL DE LOS 73 NIÑOS COLONIZADOS, VACUNADOS O NO, SEGÚN TIPOS DE *Haemophilus influenzae*. VALENCIA, VENEZUELA

Tipos	Vacunados		Total
	Sí	No	
HiNT	17 (29,8%)	40 (70,2%)	57 (100%)
REA	2,5	-2,5	
Hib	0 (0%)	16 (100%)	16 (100%)
REA	-2,5	2,5	
Total	17 (23,3%)	56 (76,7%)	73 (100%)

Prueba exacta de Fisher = 0,01. REA: C 11 = 2,5 > 1.

17%) o en el hogar (18% vs 19%), no existiendo diferencias estadísticamente significativa (Tabla III). En el grupo II la colonización por *Hib* se distribuyó en la siguiente forma: 12% en guarderías y 1% en el hogar, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,002$). Ningún infante del grupo I (vacunados) fue colonizado por *Hib* independiente del sitio de cuidado. No se presentó enfermedad invasiva durante el período de seguimiento en niños colonizados con *Hib*. Según su origen, las 73 cepas se distribuyeron: 45 asistentes a guarderías y 28 cuidados en el hogar. Al tipificarlos hubo un predominio del tipo b (15) en los asistentes a guardería, mientras que en los cuidados en el hogar, fueron 27 no tipificables, con una $p = 0,003$ y un "odds ratio" = 13,5 (Tabla IV).

Al estratificar el tipo de *Hi* según edad, se encontró que de 16 cepas tipo b, 13 se aislaron en el grupo etario de 2 a 6 años. En los menores de 2 años la mayoría de las cepas aisladas (27) fueron no tipificables $p = 0,040$. REA: 11 = 2,1 > 1,96 (Tabla V).

DISCUSIÓN

Existen pocos datos de los aspectos cuantitativos del estado de portador faríngeo con cepas encapsuladas o no de *Hi* en Venezuela. Aun no se ha esclarecido totalmente el método ideal para detectar el estado de portador faríngeo por *Hib*; algunos estudios revelan mejor aislamiento de orofaringe, otros de nasofaringe y algunos señalan que ambos son equivalentes (12). Este estudio, con muestras de orofaringe, reveló

TABLA III
RATA DE COLONIZACIÓN POR *Haemophilus influenzae*, DE ACUERDO CON SUS ESPECIES EN NIÑOS VACUNADOS O NO

Grupos	Tipos		Total
	HiNT	Hib	
I (Vacunados)			
Hogar (N = 49)	9 (18%)	0 (0%)	17
Guardería (N =50)	8 (16%)	0 (0%)	
II (No Vacunados)			
Hogar (N = 94)	18 (19%)	1 (1%)*	56
Guardería (N =127)	22 (17%)	15(12%)*	

Porcentaje calculado en base al número por hogar y guardería. *Hogar vs Guardería P = 0,002.

TABLA IV
DISTRIBUCIÓN NUMÉRICA Y PORCENTUAL DE LOS 73 NIÑOS COLONIZADOS, CUIDADOS O NO EN GUARDERÍAS, SEGÚN TIPOS DE *Haemophilus influenzae*. VALENCIA, VENEZUELA

Tipos	Origen		Total
	Guardería	Hogar	
<i>HiNT</i>	30 (52,6%)	27 (47,4%)	57 (100%)
REA	-3	3	
<i>Hib</i>	15 (93,8%)	1 (6,3%)	16 (100%)
REA	3	-3	
Total	45 (61,6%)	28 (38,4%)	73 (100%)

Chi cuadrado P =0,003. Odds ratio = 13,5.

TABLA V
DISTRIBUCIÓN NUMÉRICA Y PORCENTUAL DE LOS 73 NIÑOS COLONIZADOS, DE ACUERDO AL TIPO DE *Haemophilus influenzae* Y GRUPO ETARIO. VALENCIA, VENEZUELA

Edad	Tipos		Total
	HiNT	Hib	
< 2 Años	27 (90%)	3 (10%)	30 (100%)
REA	2,1	-2,1	
2 a 6 años	30 (69,8%)	13 (30,2%)	43 (100%)
REA	-2.1	2.1	
Total	57 (78,1%)	16 (21,9%)	73 (100%)

Chi cuadrado P =0,040. REA: C 11 =2,1>1,96.

un porcentaje de colonización por *Hi* de 22,8%, de ellos 17,8% correspondieron a *HiNT*. Se debe señalar que la colonización por este tipo de *Haemophilus*, varía según el desarrollo de los países; en los subdesarrollados, como Etiopía y Vietnam, se en-

cuentran cifras elevadas de 65% a 90%; a diferencia de los desarrollados como Suiza, Hong Kong y USA donde no sobrepasan un 13% (1, 3, 15-17). En México existe una prevalencia de *Hi* de 21% en niños menores de 15 años, correspondiendo un 92% de

ellas a cepas *HiNT* (18). Las cepas *Hib* también pueden colonizar el tracto respiratorio superior de niños sanos, con porcentajes frecuentemente más altos en los habitantes de países subdesarrollados que en los desarrollados. Gales, Turquía y Japón reportan cifras de 0,84 a 1,3% muy semejantes a los niños no vacunados y cuidados en el hogar de este estudio (19-22). En USA, durante la era prevacuna, podían alcanzar un 4% en la población de Indios Navajos; en Indonesia en menores de dos años, es de 4,6% (5, 23, 24). Si se toma en consideración los datos obtenidos en algunos países Latinoamericanos y del Caribe, a pesar de provenir de estudios con diseños diferentes, se observan porcentajes semejantes: 4% en México, 7% en República Dominicana y 5% en este estudio, probablemente por corresponder a grupos poblacionales con algunas características comunes tales como clima (Venezuela y Santo Domingo, países del Caribe) y el uso o no de vacunas; los tres estudios se realizaron en un momento en el cual en dichos países no se disponía en forma rutinaria de vacunas anti *Hib* (18, 25).

La protección inducida por la inmunización con la vacuna conjugada utilizada se evidencia en la ausencia de aislamiento de *Hib* en el grupo I (2, 7, 9, 13, 26).

Existe una relación entre una alta prevalencia de anticuerpos anti PRP y bajos porcentajes de colonización por *Hib* (12). Se ha sugerido que las altas concentraciones séricas podrían conducir a una trasudación de inmunoglobulinas a las superficies mucosas y aun cuando no es el objetivo de este estudio, es interesante señalar que el promedio de niveles de anticuerpos anti PRP en aproximadamente el 50% de los niños del grupo I fue de 37 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (27, 28).

El primer reporte del efecto protector inducido por la vacuna conjugada anti *Haemophilus influenzae* tipo b, en la reducción de la colonización faríngea en niños fue realizado por Tácala y col. en Finlandia, en

1991 (26); posteriormente han corroborado este hallazgo otros autores. Así Barbour y col. (12) encontraron un porcentaje de colonización de 1,5% en niños vacunados vs 6,3% en los controles; Adegbola y col. (13) reportaron un efecto protector de 60% en niños con esquemas de vacunación completa, incluso en aquellos cuidados en guarderías, similar a los de esta investigación donde ningún niño vacunado, independiente de su asistencia o no a guardería, fue colonizado por *Hib*. En USA, en una población altamente susceptible de contraer infección por *Hib* como son los indios Navajos y Apaches, la vacunación rutinaria redujo la colonización por dicho germen a 0,3% (23); en una población de Brasil con un 99% de cobertura de vacunación, la tasa de portador fue de 1% en comparación a 4,8% observada en una población con baja cobertura (29). El mecanismo protector de la vacuna parece ser inducido por la presencia de anticuerpos séricos tipo IgM o IgA, o a nivel de las mucosas por la presencia de IgA secretoria. Se presume que la reducción en la colonización es debido a un efecto directo en el crecimiento bacteriano o por su interferencia sobre su adherencia a las superficies mucosas (2, 29-31).

La infección por *Hib*, puede ser adquirida por un contacto cercano con una persona portador asintomático o con enfermedad invasiva, por ello todos los niños positivos para dicho germen fueron seguidos por seis meses, no detectándose enfermedad en ellos, ni en sus contactos familiares. La relación entre estado de portador y el riesgo de enfermedad no es simple; la alta frecuencia de portador de *Hib* en hogares y en guarderías de pacientes que han tenido enfermedad invasiva sugiere o bien que una alta concentración de portadores precede y aumenta la probabilidad de casos o que los niños afectados son una potente fuente de infección a otros. Por otra parte, se acepta que la faringe es la puerta de entrada al desarrollo de la enfermedad invasiva (27).

Diversos factores se consideran de riesgo para ser portador de *Hib*, entre ellos se señalan las condiciones de hacinamiento, un número importante de niños dentro del núcleo familiar, contactos con pacientes que desarrollan enfermedad invasiva y la asistencia a guarderías; éste último factor se demostró en esta investigación, donde el riesgo de colonización por *Hib* de los asistentes a guarderías se incrementó en 13,5 veces sobre los cuidados en el hogar, independiente del grupo al cual pertenecían; más aún, el porcentaje de portador faríngeo de *Hib* en niños no vacunados que asistían a guarderías fue de un 12% vs. 1% en el hogar, ubicándose dentro del rango señalado en países industrializados durante la era prevacuna, donde la variación estaba entre 3% a 15% (15, 32, 33). Sin embargo, en Gambia, país subdesarrollado, el porcentaje de portadores en niños que asisten a guarderías fue sólo de un 2% (4). Dentro de las guarderías, factores como ocurrencia de un caso de enfermedad invasiva, pueden incrementar la colonización, con cifras que oscilan entre 6 a 58% (22, 24, 32, 33); igualmente la permanencia en meses en esas instituciones, puede también aumentar el riesgo de colonización; por ejemplo Akeakaya y col. (34), en Turquía señalan un porcentaje de 47,5% en niños que han asistido durante un período superior a seis meses a dicha institución; en el presente estudio todos los niños asistieron a la guardería al menos cuatro meses, periodo en el cual no se detectó ningún caso de enfermedad invasiva.

El *Hib* coloniza más frecuente la orofaringe de los niños que la de los adultos y en los primeros, la tasa de colonización puede variar no sólo con la edad, sino también con la población estudiada. Un estudio realizado en Gambia reportó una prevalencia de 19% en los menores de cuatro años y 12% en el grupo de 5 a 9 años de edad, con una disminución drástica a 3% por encima de

los 14 años (4). En Japón, aun cuando los porcentajes varían con la edad, son muy inferiores a los antes señalados: 0,62 en menores de 12 meses y 1,32% en niños de 13 a 48 meses (21). En República Dominicana (25), el pico máximo de colonización ocurre en niños de 6 a 11 meses (12,5%), con porcentajes de 7,9 y 9,8 a los 2 y 3 años de edad. Villaseñor y Herrera (18), en México encontraron una prevalencia de 39% en niños de uno a cinco años y de 17% en los de once a quince años, para todas las cepas de *Haemophilus* tipificables o no; todos estos resultados ilustran la variedad de información sobre colonización para diferentes grupos etarios y tipos de *Hi*. En este estudio, el 41% de las cepas se aislaron en menores de 2 años y 59% en los mayores a esa edad; sin embargo, predominaron las cepas no tipificables en los primeros y las de tipo b en el grupo de 2 a 6 años de edad.

En conclusión, se demostró que el porcentaje de portador faríngeo de *Hib* en los niños no vacunados y cuidados en el hogar, es semejante al observado en los países industrializados en la era prevacuna; sin embargo, la asistencia a guardería aumenta el riesgo significativamente. Para ambos grupos y formas de cuidados, el porcentaje de portador de cepas no tipificables fue similar. Los niños no vacunados tienen mayor probabilidad de ser colonizados por cepas de *Hib*.

REFERENCIAS

1. Funkhouser A, Steinhoff MC, Ward J. *Haemophilus influenzae* disease in developing countries. Rev Infect Dis 1991; 13: S542-54.
2. Levine O, Schwartz B, Pierce N, Kane M. Development, evaluation and implementation of *Haemophilus influenzae* type b vaccines for young children in developing countries: current status and priority actions. Pediatr Infect Dis J 1998; 17: 95-113.

3. **Faden H, Duffy L, Willisms A, Krystofik D, Wolf J.** Epidemiology of nasopharyngeal colonization with nontypeable *Haemophilus influenzae* in the first two years of life. *Acta Otolaryngol* 1996; S523: 128-129.
4. **Bijlmer H.** World wide epidemiology of *Haemophilus influenzae* meningitis; industrialized versus non-industrialized countries. *Vaccine* 1991; 9:S5-9.
5. **American Academy of Pediatrics.** Red Book 2003:293-300.
6. **Kristensen K.** Carriage and antibiotic susceptibility of *Haemophilus influenzae* type b and non b in Danish day care attendees. *Apmis* 1990; 98:50-52.
7. **CDC Progress toward eliminating *Haemophilus influenzae* type b diseases among infants and children United States, 1987-1997.** *MMWR* 1998; 47: 993-998.
8. **Singleton R, Bulkow L, Levine OS, Butler JC, Hennesy TW, Parkinson A.** Experience with the prevention of invasive *Haemophilus* type disease by vaccination in Alaska: the impact of persistent oropharyngeal carriage. *Pediatr* 2000; 137(3): 313-320.
9. **Peltola H.** *Haemophilus influenzae* type b disease and vaccination in Latin America and the Caribbean. *Pediatr Infect Dis J* 1997; 16:780-787.
10. **Castillo de Febres O, Escalona L, Naveda O, Foj N, Sánchez M.** Meningitis aguda análisis de 178 casos en el quinquenio 1986-1990. Hospital de niños de Valencia. *Arch Ven Puer Ped* 1991; 54:22.
11. **Lubani KM, Eskola J, Kathy H** Anticapsular polysaccharide antibody concentrations in saliva after immunization with *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 1995; 14: 286-294.
12. **Barbour ML, Mayon-White RT, Coles C, Crook DW, Moxon E.** The impact of conjugate vaccine on carriage of *Haemophilus influenzae* type b. *J Infect Dis* 1995; 171:93-98.
13. **Adegbola R, Mulholland EK, Seeka O, Jaffar S, Greenwood BM.** Vaccination with *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine reduces oropharyngeal carriage of *H. influenzae* type b among Gambian children. *J Infect Dis* 1998; 177:1758-1761.
14. **Organización Panamericana de la Salud. División de Vacunas E Inmunizaciones (HVP). Sistema Regional de Vacunas (SIREVA). Instituto nacional de higiene Rafael Rangel: Manual sobre la identificación bioquímica y serológica *Haemophilus influenzae* y *estreptococo pneumoniae*.** Caracas, Venezuela 1999.
15. **Gunnarson RK, Holm SE, Soderstrom M.** The prevalence of potential pathogenic bacteria in nasopharyngeal samples from healthy children and adults. *Scandinavian J Primary Health Care* 1998; 16; 13-17.
16. **Ringertz S, Muhe L Krantz I, Hathaway A, Shamebo D, Freij L, Wall S, Kronvall G.** Prevalence of potential respiratory disease bacteria in children in Ethiopia antimicrobial susceptibility of the pathogens and use of antibiotics among the children. *Acta Paediatrica* 1993; 82:843-848.
17. **Sung RY, Ling JM, Fung SM, Oppenheimer SJ, Crook DW, Lau JT, Cheng AF.** Carriage of *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* in healthy Chinese and Vietnamese children in Hong Kong. *Acta Paediatrica* 1995; 84 1262-1267.
18. **Villasenor S, Herrera B.** Prevalencia de estado de portador de *Haemophilus influenzae* en niños de ciudad Nezahualcoyotl, estado de Mexico. *Salud Pública Mex* 1996; 38:87-93.
19. **Berkman E.** Incidence of *Haemophilus influenzae* in throat cultures. *Mikrobiyoloji Bulteni* 1986; 20:76-838.
20. **Howard AJ, Dukin KT, Millar GW.** Nasopharyngeal carriage and antibiotic resistance of *Haemophilus influenzae* in healthy children. *Epidem Infect* 1988; 100: 193-203.
21. **Kuroki H, Ishikawa N, Uehara S, Himi K, Sonobe T, Niimi H.** Nasopharyngeal colonization with *Haemophilus influenzae* type b among infants and children in Japan. *Acta Paediatrica Japonica* 1997; 39: 541-545.
22. **Bakir M, Yağci A, Ulger N, Akbenlioglu C, Ilki A, Soyletir G, Basaran M.** Pharyngeal colonization with *Haemophilus*

- influenzae* type b among healthy Turkish infants and children. *Pediatr Int* 2002; 44(4):381-386.
23. **Millar EV, O'Brien KL, Levine OS, Kvamme S, Reid R, Santosham M.** Toward elimination of *Haemophilus influenzae* type b carriage and disease among high-risk American Indian Children. *Am J Public Health* 2000; 90(10):1550-1554.
 24. **Gessner BD, Sutanto A, Steinhoff M, Soewignjo S, Widjaya A, Nelson C, Arjoso S.** A population based survey of *Haemophilus influenzae* type b nasopharyngeal carriage prevalence in Lombok island Indonesia. *Pediatr Infect Dis J* 1998; 17 S`179-182.
 25. **Gomez E, Moore A, Sanchez J, Kool J, Castellanos P, Feris J, Koleczak M, Levin O.** The epidemiology of *Haemophilus influenzae* type b carriage among infants and young children in Santo Domingo, Dominican Republic. *Pediatr Infect Dis J* 1998; 17:782-786.
 26. **Takala AK, Escola J, Leinohem M, Kayhty H, Nissinen A, Pekkanen E, Makela PH.** Reduction of oropharyngeal carriage of *Haemophilus* type b in children immunized with a Hib vaccine. *J Infect Dis* 1991; 164: 982-986.
 27. **Barbour M.** Conjugate vaccines and the carriage of *Haemophilus influenzae* type b. *Emerg Infect Dis* 1996; 2:176-182.
 28. **Castillo-Febres O, Decker M, Estopiñan M, Bordonos G, Edwards K.** Enhanced antibody response in Venezuelan infants immunized with *Haemophilus influenzae* type b.tetanus toxoid conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 1994; 13:635-639.
 29. **Forleo-Neto E, De Oliveira CF, Maluf EM.** Decreased prevalence of *Haemophilus influenzae* Type b Oropharyngeal Colonization by Mass Immunization of Brazilian Children less than 5 years old with Hib Poly ribosylribitol phosphate Polysaccharide Tetanus Toxoid Conjugate Vaccine in combination with Diphtheria tetanus Toxoid Pertussis. *Vaccine. Infect Dis J* 1999; 180:1153-1158.
 30. **Kauppi M, Saarinen L, Kayhty H.** Anticapsular polysaccharide antibodies reduce nasopharyngeal colonization by *Haemophilus influenzae* type b in infants rats. *J Infect Dis* 1993; 167:365-371.
 31. **Kauppi M, Van Alphen L, Madore D, Saarinen L, Kayhty H.** Mechanism of antibody mediated reduction of nasopharyngeal colonization by *Haemophilus influenzae* type b studied in an infant rat model. *J Infect Dis* 1996; 174:1337-1340.
 32. **Stephenson WP, Doern G, Gantz N.** Pharyngeal carriage rates of *Haemophilus influenzae* type b and non b and prevalence of ampicillin resistant Hi among healthy day care children in central Massachusetts. *Amer J Epidemiol* 1985; 122:868-875.
 33. **Murphy TV, Granoff D, Chrane D, Olsen K D, Barenkamp S J, Dowell S F, Mccracken GH.** Pharyngeal colonization with *Haemophilus influenzae* type b in children in a day care center without invasive disease. *J Pediatr* 1985; 106:712-716.
 34. **Akcakaya N, Camcioglu Y, Belbek S, Eskazan G, Cokugras H.** *Haemophilus influenzae* type b colonization in children in a hospital based day care center. *Eur J. Epidemiol* 2001; 17 (4): 313-316.