

92

Respuesta inmune humoral al polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo C en un ensayo de vacunación antimeningocócica BC en Antioquia, Colombia

Martha Ligia Echeverry Uribe,¹ José A. Malberty Agüero,²
Luis Armando Galeano Marín,³ Franklin T. Sotolongo Padrón,²
Manuel A. Galguera Domínguez,² Cecilia María Montoya Barrientos,³
Orfilia Martínez Ruiz,³ Mayte del C. Nerey,² María A. Camarasa,²
Jorge Bacallao Gallestey,⁴ Carlos Arturo Aguirre Muñoz,⁵
Luz Marina Alzate de Roldán,⁵ Victoriano G. Sierra González,²
Concepción Campa Huergo,² Inés Bernarda Loaiza Guerra,³
Nora Adriana Montealegre Hernández,³ Santiago Estrada Mesa,²
Martha L. Arroyave Cadavid,⁶ Estella Restrepo Gallego⁵
y Beatriz Elena Salazar Sánchez³

Como complemento del estudio de la respuesta inmune humoral a las proteínas de una vacuna antimeningocócica (VA-MENGOC-BC) para serogrupos B y C, se evaluó la respuesta inmune humoral al polisacárido C de la vacuna en 142 niños de 1 a 5 años de edad de una zona del Departamento de Antioquia, Colombia. Se analizaron en pares de sueros pre (T_0) y posvacunación (T_1), la respuesta de IgG por ELISA y la capacidad lítica sérica frente a una cepa del serogrupo C por prueba de anticuerpos bactericidas (PAB). La respuesta a la vacuna resultó estadísticamente significativa ($P < 0,01$) por las dos técnicas. Por la PAB se demostró seroconversión ($T_1/T_0 \geq 4$) en 88% (intervalo de confianza del 95%, IC95%: 80 a 95%) del total de seronegativos prevacunación. En los niños de 2, 3 y 4 años de edad la proporción de seroconversión fue de 86% o más. Del total de sueros evaluados por ELISA respondieron a la vacuna ($T_1/T_0 \geq 2$) 93% (IC95%: 89 a 97%) y se produjo seroconversión ($T_1/T_0 \geq 4$) en 98% de los casos con T_0 500 U/mL (IC95%: 94 a 100). En la muestra la vacuna estimuló una respuesta específica y protectora medida por ELISA y PAB, prueba esta última que se utiliza para evaluar el estado de protección.

Los brotes epidémicos de enfermedad meningocócica son causados principalmente por *Neisseria meningitidis* de los serogrupos A, B y C (1-3) por lo que la inmunoprofilaxis contra estos serogrupos prevendría más de 90% de los casos que actualmente se produ-

cen en el mundo. Hacia 1970 se comenzaron a emplear en grupos de riesgo y en momentos de epidemias las vacunas contra los serogrupos A, C, Y y W135, producidas a partir de polisacáridos capsulares purificados (4).

¹ Oficina de Epidemiología, Dirección Seccional de Salud, Gobernación de Antioquia, Centro Administrativo Departamental, 8° piso, A.A. 50946, Medellín, Colombia.

² Instituto Finlay, La Habana, Cuba.

³ Dirección Seccional de Salud de Antioquia, Medellín, Colombia.

⁴ Instituto Superior de Ciencias Médicas, La Habana.

⁵ Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

⁶ Hospital Universitario San Vicente de Paúl, Medellín, Colombia.

Estas vacunas han sido útiles en el control de epidemias (1), a pesar de las limitaciones debidas a su pobre inmunogenicidad y la corta duración de la respuesta en niños pequeños. La respuesta a las vacunas contra el meningococo C es escasa en los menores de 2 años y decae hasta niveles basales a los 12 meses de la aplicación de la vacuna a niños de un año de edad (2, 5, 6). La respuesta frente al polisacárido capsular del meningococo B es aun más pobre en todos los grupos de edad (1, 7, 8). Por la baja inmunogenicidad de las vacunas de polisacáridos en niños pequeños y la dificultad para lograr una vacuna antisero-grupo B, los organismos internacionales no recomiendan estas vacunas como inmunizaciones de rutina, a pesar de la gravedad de las enfermedades producidas por estos gérmenes. Su empleo masivo se reserva para el control de epidemias (9).

La vacuna antimeningocócica VA-MENGOC-BC producida y ensayada en Cuba desde fines de la década pasada, además de los componentes inmunogénicos obtenidos de meningococos del serogrupo B, contiene polisacárido C (10) que contribuye a mejorar la calidad del preparado (1, 11). El efecto protector del componente polisacárido ha sido poco evaluado por la baja incidencia de este serogrupo en Cuba en los últimos años, pero resultados preliminares de su aplicación en algunas regiones del Brasil (12) parecen indicar una mayor protectogenicidad de este preparado. De comprobarse esta y existiendo a su vez una vacuna eficaz contra ambos serogrupos, podría recomendarse la aplicación de VA-MENGOC-BC en programas amplios de vacunación, como se hace en Cuba desde finales de los años ochenta.

Este trabajo no fue diseñado inicialmente para el estudio de la respuesta al componente polisacárido de la vacuna. No obstante, la necesidad de información sobre la respuesta al polisacárido C, principalmente en niños, nos llevó a evaluar la respuesta a este inmunógeno en la muestra seleccionada para estudiar la aplicación de VA-MENGOC-BC en Antioquia, Colombia, en una región y momento de alta incidencia de enfermedad por *N. meningitidis* serogrupo B (13).

MATERIAL Y MÉTODOS

Sujetos y muestras

Se estudió la respuesta al polisacárido capsular del meningococo C de VA-MENGOC-BC mediante inmunosorción enzimática (ELISA) y prueba de anticuerpos bactericidas (PAB) en 142 pares de sueros de niños. Los 142 niños en los que se estudió la respuesta al polisacárido capsular fueron una muestra aleatoria de los 213 incluidos en el estudio de la respuesta a las proteínas vacunales (14).

Las muestras de suero se obtuvieron en 1991, inmediatamente antes de la vacunación (T_0) y 4 semanas después de administrada la segunda dosis (T_1).

Fuentes de antígenos

Para la PAB se empleó como célula diana una suspensión previamente ajustada de la cepa C-11 (ATCC) de *N. meningitidis* serogrupo C, OAc⁺, empleada en el proceso de obtención del polisacárido para la producción de la vacuna. En el recubrimiento de las placas para microELISA se utilizó una solución de polisacárido capsular de la cepa C-11 una vez satisfechos los controles de calidad requeridos (15).

Métodos de evaluación

ELISA. Se realizó un ELISA indirecto en placas cuyos pocillos se recubrieron con solución de polisacárido C, 2,5 µg/mL, previa fijación en las mismas de poli-L-lisina a una concentración de 3 µg/mL. Se incubaron las placas con el polisacárido a 4 °C durante 12-16 horas, lavándose finalmente para eliminar el material no fijado a la placa.

Se añadieron las muestras, controles de calidad y patrón de concentración correspondientes, siguiendo la metodología ya descrita para la cuantificación de IgG contra las proteínas de la vacuna (14).

CUADRO 1. Resultados de las pruebas de inmunosorción enzimática (ELISA) de IgG y de anticuerpos bactericidas (PAB), antes (T_0) y después de la vacunación (T_1), en una investigación de anticuerpos contra el polisacárido C de la vacuna VA-MENGOC-BC en niños vacunados en Antioquia, Colombia

	ELISA (U/mL)		Título PAB	
	T_0	T_1	T_0	T_1
<i>n</i>	142	142	142	142
Media de los log neperianos	6,07	8,57	0,93	3,52
Desviación estándar	0,91	0,8	1,35	1,53
Mediana	400	4456	1	32
Percentil 25	253	2971	1	16
Percentil 75	861	8964	4	128
Media geométrica	432	5271	2,53	33,7
Intervalo de confianza de 95%	372 a 503	4615 a 6019	2,03 a 3,16	26,6 a 43,4

CUADRO 2. Resultados (media geométrica e intervalo de confianza de 95%) de las pruebas de inmunosorción enzimática (ELISA) contra polisacárido C y de anticuerpos bactericidas (PAB) contra meningococo C en sueros de niños de Antioquia, Colombia, antes (T_0) y después (T_1) de la vacunación con VA-MENGOC-BC

Edad (<i>n</i>)	ELISA (IC95%)		PAB (IC95%)	
	T_0	T_1	T_0	T_1
1 año (6)	301 (113 a 805)	2980 (1160 a 7659)	1,9 (0,7 a 5,7)	12 (2,3 a 64,5)
2 años (20)	379 (232 a 621)	5431 (3802 a 7759)	1,6 (1,1 a 2,4)	30,6 (13,4 a 69,9)
3 años (44)	347 (270 a 445)	4852 (3593 a 5843)	2,3 (1,7 a 3,3)	40,0 (25,5 a 62,9)
4 años (59)	533 (410 a 693)	5541 (4545 a 6756)	3,2 (2,1 a 5,0)	33,8 (22,2 a 51,4)
5 años (13)	464 (277 a 776)	8690 (4488 a 16827)	2,8 (0,9 a 8,7)	28,5 (10,8 a 75,3)

Prueba de anticuerpos bactericidas. La PAB se realizó mediante un procedimiento semejante al descrito para las cepas de *N. meningitidis* serogrupo B, pero empleando como célula diana una cepa C-11 (ATCC) y como fuente de complemento suero de conejo.

RESULTADOS

La muestra estudiada quedó distribuida por edades de la siguiente forma: 142 niños en edades de 1 a 5 años en los siguientes subgrupos: 1 año, 6 niños; 2 años, 20; 3 años, 44; 4 años, 59; 5 años, 13. Los resultados correspondientes a ambas pruebas y grupos de estudio se muestran en los cuadros 1 y 2.

Mediante análisis de la varianza para observaciones repetidas se halló un efecto global significativo de la vacunación ($P < 0,001$; $F = 131,1$) en la muestra tomada en su

conjunto. La figura 1 muestra la distribución porcentual de los resultados de ELISA agrupados por intervalos de concentraciones, antes y después de la vacunación. Puede observarse la distribución inversa de las concentraciones antes y después de la vacunación. En la fase prevacunación predominan los valores bajos, con concentraciones de menos de 1000 U/mL en 81% de las muestras. Por el contrario, en la fase posvacunación las concentraciones excedieron ese nivel en 98% de los sueros.

La figura 2 muestra la distribución por intervalos de los títulos⁷ pre y posvacunales de actividad bactericida. La actividad bactericida estuvo ausente en 51% de los niños antes de la vacunación y 80% tuvieron títulos de

⁷ El título es la inversa de la dilución máxima a la que tuvo lugar el fenómeno. Si la dilución máxima fue 1:8, el título es 8.

FIGURA 1. Distribución pre y posvacunación de las concentraciones de antipolisacárido C medidas por inmunosorción enzimática (ELISA) en 142 niños vacunados con VA-MENGOC-BC en Antioquia, Colombia

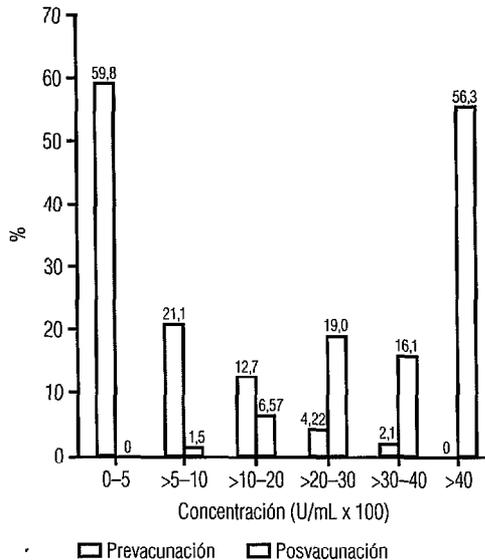
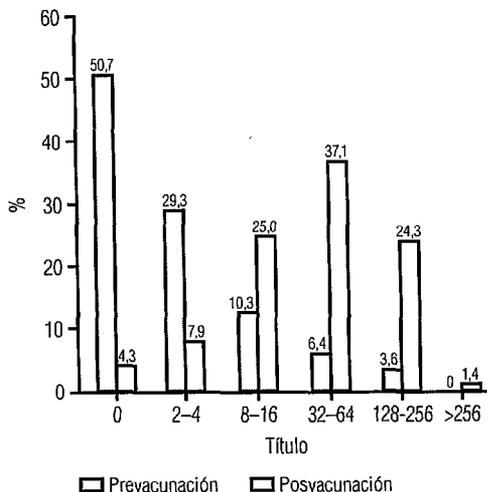


FIGURA 2. Distribución pre y posvacunación de los títulos de anticuerpos bactericidas antimeningococo C en 142 niños vacunados con VA-MENGOC-BC en Antioquia, Colombia



CUADRO 3. Número y porcentaje (e intervalo de confianza correspondiente) de niños de distintas edades que respondieron ($T_1/T_0 \geq 2$) al polisacárido C de la vacuna VA-MENGOC-BC según la prueba ELISA respecto al total de vacunados estudiados ($n = 142$)

Edad (años)	n	Respuesta	
		n	% (IC95%)
1	6	6	100 —
2	20	16	80 (62 a 98)
3	44	42	95 (89 a 100)
4	59	56	95 (89 a 100)
5	13	12	92 (78 a 100)
Total	142	132	93 (89 a 97)

menos de 8. Por el contrario, después de la vacunación 88% presentaron títulos de más de 4, hallándose 86% de los títulos entre 8 y 256. El cuadro 3 muestra la proporción de respuesta que fue de 93%; se consideró la existencia de la respuesta cuando el título posvacunal duplicó al título prevacunal, independientemente del valor de este. Estratificando las proporciones de respuesta por edades se obtuvo una proporción de respuesta de 80% o más en todos los estratos.

El cuadro 4 muestra los porcentajes de seroconversión considerando en los cálculos de estos las muestras que al menos cuadruplicaron su título prevacunal partiendo de valores iniciales menores o iguales a 500 U/mL por ELISA o sin actividad bactericida ($T_0 = 1$) en la prueba correspondiente.

Al estratificar por edades, algunos estratos son muy reducidos, lo que limita el valor de las inferencias correspondientes.

DISCUSIÓN

Un objetivo actual en la prevención de las enfermedades infecciosas es el desarrollo de vacunas múltiples que permitan con el mínimo de intervenciones lograr la inmunización contra el máximo de agentes infecciosos prevenibles por vacunas. El desarrollo de la vacunología hace que cada vez haya más microorganismos incluíbles en ese grupo (7).

CUADRO 4. Resultados de seroconversión ($T_1/T_0 \geq 4$) respecto a anticuerpos antipolisacárido C por inmunosorción enzimática (ELISA) y prueba de anticuerpos bactericidas en niños vacunados con VA-MENGO-C-BC en Antioquia, Colombia

Edad (años)	ELISA				Prueba de anticuerpos bactericidas			
	Total ($T_0 \leq 500$ U/mL)	Seroconversión			Total ($T_0 \leq 1$)	Seroconversión		
		<i>n</i>	%	IC95%		<i>n</i>	%	IC95%
1	3	2	67	(13 a 100)	3	2	67	(13 a 100)
2	12	12	100	—	11	10	91	(74 a 100)
3	29	28	96	(90 a 100)	22	19	86	(72 a 100)
4	29	29	100	—	27	25	93	(83 a 100)
5	12	12	100	—	9	7	78	(51 a 100)
Total	83	83	98	(94 a 100)	72	63	88	(80 a 95)

La introducción de una nueva vacuna para la prevención simultánea de la enfermedad meningocócica producida por los serogrupos B y C abre la posibilidad de incluirla en las vacunaciones de rutina, como se ha hecho en Cuba, ya que los serogrupos B y C son los principales causantes de la enfermedad en América y Europa, incrementándose en los últimos años también en Asia (16, 17).

En el grupo de niños estudiados la respuesta inmune estimulada por el polisacárido C de la vacuna VA-MENGO-C-BC fue elevada, pudiéndose evaluar la protección mediante la PAB (18).

Los complejos no covalentes de polisacáridos y proteínas de membrana externa de *N. meningitidis* han sido evaluados como candidatos para vacunas antimeningocócicas. Mediante esos complejos se han logrado respuestas inmunes timodependientes a los polisacáridos, conservándose la inmunogenicidad de los componentes proteínicos (19, 20). Cuando se emplean complejos naturales la respuesta no es la misma que cuando los complejos se forman por mezcla in vitro de los componentes previamente purificados, lo que indica la importancia de la forma de obtención de dichos complejos (19), ya que el tipo de respuesta contra estos está muy relacionada con la fuerza de la unión proteína-polisacárido. Otro procedimiento para lograr una respuesta timodependiente a los polisacári-

dos ha sido la síntesis y administración de conjugados covalentes proteína-polisacárido (21–23). En estos casos se logra una respuesta eficaz, pero la inmunogenicidad de la proteína resulta alterada y solamente actúa como portadora; el polisacárido también puede sufrir cierto deterioro en el proceso de conjugación (23).

Los resultados obtenidos en este trabajo no proporcionan todos los elementos necesarios para comparar el efecto de la combinación de los inmunógenos de los meningococos B y C presentes en la vacuna con otras combinaciones o con el polisacárido purificado, pero por las dos pruebas empleadas se obtienen resultados que permiten afirmar que el nivel de inmunidad alcanzado es satisfactorio en cuanto a intensidad y capacidad protectora de la respuesta en niños de 2, 3 y 4 años de edad, lo que concuerda con algunos de los resultados notificados en el Brasil (12). En los niños de menos de 2 años de edad, que en general han respondido mal a este y otros polisacáridos empleados con fines vacunales (1, 2, 6, 25, 26) si bien hubo respuesta en todos ellos, el reducido número de integrantes de la muestra relativiza las posibles conclusiones. La duración de la respuesta es otro aspecto a considerar que se evaluará en su momento.

Los niveles de anticuerpos previamente a la vacunación fueron bajos, lo que puede estar relacionado con una baja circu-

lación de *N. meningitidis* serogrupo C pero implica un elevado nivel de susceptibilidad a esta enfermedad (27).

En la evaluación de la vacuna VA-MENGOC-BC que estamos realizando en Antioquia debemos incluir inmediatamente niños desde los 3 meses de edad, momento a partir del cual comienzan a declinar los anticuerpos maternos y se incrementa el riesgo de contraer enfermedades infecciosas, que alcanza el máximo entre los 6 meses y el año de edad (2). La protección de los niños durante el primer trimestre de vida podría lograrse mediante la vacunación de las embarazadas si se demostrara que esta no presenta riesgos para el feto y le confiere una inmunidad pasiva protectora (28). Actualmente se desarrollan estudios en ese sentido.⁸

Podemos concluir que la vacunación con VA-MENGOC-BC estimuló en el grupo estudiado una respuesta inmune sustancial, con títulos de anticuerpos bactericidas en más de 95% de los niños y una seroconversión global elevada, pero con una muestra pequeña de menores de 2 años. Están en curso estudios para evaluar la duración de dicha respuesta y caracterizar la misma en lactantes.

AGRADECIMIENTO

Los autores expresan su agradecimiento a Iovagna Bravo y Aida Arnet, del Instituto Finlay; a Edilma Jaramillo, del Laboratorio Departamental de Salud Pública de la DSS, Antioquia; a Amanda Margarita Ruiz y Fanor Mejía, del Hospital San Rafael de Itagüí; y a la población del municipio de Itagüí.

REFERENCIAS

1. Frasch CE. Vaccines for prevention of meningococcal disease. *Clin Microbiol Rev* 1989; 2 Suppl.:S134.
2. Peltola H. Meningococcal disease: still with us. *Rev Infect Dis* 1983;5:71.

⁸ De Juan EM, Respuesta inmunológica humoral contra el meningococo B en niños de madres vacunadas durante el embarazo. La Habana: Hospital Pediátrico William Soler; 1992. (Trabajo de Terminación de la Residencia en Pediatría).

3. Caugant DA, Frøholm I.O, Bøvre K, Holten E, Frasch CE, Mocca LF, Zollinger WD. Intercontinental spread of a genetically distinctive complex of clones of *Neisseria meningitidis* causing epidemic disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:4927.
4. Gotschlich EC, Goldschneider I, Artenstein MS. Human immunity to the meningococcus IV. Immunogenicity of group A and group C polysaccharides in human volunteers. *J Exper Med* 1969;129:1367.
5. Reingold AL, Broome CV, Hightower AW, Bolan GA. Age-specific differences in duration of clinical protection after vaccination with meningococcal polysaccharide A vaccine. *Lancet* 1985; Jul 20: 114.
6. Griffin JM, Brandt BL, Broun DD, Goroff DK, Baker JC. Immune response of infants and children to disseminated infection with *Neisseria meningitidis*. *J Infect Dis* 1984;150:71.
7. World Health Organization. Programme for Vaccine Development and Transdisease Vaccinology. Activities and prospects. 1989. 11-15.
8. Wyle FA, Artenstein MS, Brandt BL, Tramont EC, Kasper DL, Altieri PL, Berman SL, Loventhal JP. Immunologic response of man to group B polysaccharide vaccine. *J Infect Dis* 1972;126:514.
9. Centers for Disease Control. Recommendations of the Immunizations Practices Advisory Committee (ACIP): meningococcal vaccines. *MMWR* 1985;34:255.
10. Sierra VG, Campa C, Valcarcel M. Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection trial and mass vaccination results in Cuba. *NIPH Ann* 1991;14:195.
11. Frasch CE, Pepler MS. Protection against group B *Neisseria meningitidis*: Preparation of soluble protein-polysaccharide immunogen. *Infect Immun* 1982;150:71-79.
12. Secretaría de Salud del Estado de São Paulo, Comisión Permanente de Asesoramiento en Inmunizaciones. *Imunizações Atualização*. 1991;4:47.
13. Colombia, Sistema Nacional de Salud, Servicio Seccional de Salud de Antioquia. *Estudio para la aplicación de la vacuna VA-MENGOC-BC en Antioquia, Colombia: Informe final*. Medellín, Colombia: 1992.
14. Echeverry Uribe ML, Malberty Agüero JA, Galeano LA, Sotolongo Padrón FT, Galguera MA, Montoya CM, et al. Respuesta inmune humoral a las proteínas de una vacuna antimeningocócica BC en un ensayo realizado en Antioquia, Colombia. *Bol Oficina Sanit Panam* 1995;118(4): 285-294.
15. Organización Mundial de la Salud. *Normas para sustancias biológicas*, N° 23. 1976: 52-78 (Serie de Informes Técnicos 594).

16. Pinne RW, Gellin BG, Bibb WF, Baker CN, Weaver R, Hunter S, Waterman SH, Mocca LF, Frasch CE, Broome CV. Meningococcal disease in the United States, 1986. *J Infect Dis* 1991;164:368.
17. Caugant DA, Frøholm LO, Sacchi CT, Sealder RK. Genetic structure and epidemiology of serogroup B *Neisseria meningitidis*. In: Achtman M, Kohl P, Marchal C, Morelli G, Seiler A, Thiesen B, eds. *Neisseriae* 1990. Berlin: Walter de Gruyter; 1991; 37-42.
18. Artenstein MS, Brandt BL, Tramont EC, Branche WC, Fleet HD, Cohen RL. Serologic studies of meningococcal infection and polysaccharide vaccination. *J Infect Dis* 1971;124:271.
19. Lively MR, Wang Z. Immune response in mice to different noncovalent complexes of meningococcal B polysaccharide and outer membrane proteins. *Infect Immun* 1988;56:3221.
20. Moreno C, Lively MR, Esdaile J. Immunity and protection of mice against *Neisseria meningitidis* group B vaccination, using polysaccharide complexed with OMP: A comparison with purified B polysaccharide. *Infect Immun* 1985;47:527.
21. Shapiro ED, Capobianco LA, Berg AT, Zitt MQ. The immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-*Neisseria meningitidis* group B outer membrane protein complex vaccine in infants and young children. *J Infect Dis* 1989;160:1064.
22. Ahonkhai VI, Lukacs LJ, Jonas LC, Calandra GB. Clinical experience with PedvaxHIB, a conjugate vaccine of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-*Neisseria meningitidis* outer membrane protein. *Vaccine* 1991; 9 Suppl:S38-S.
23. Lenoir AL, Granoff PD, Granoff DM. Immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-*Neisseria meningitidis* outer membrane protein conjugate vaccine in 2- to 6-month old infants. *Pediatrics* 1987;80:283.
24. Beuvery EC, Miedema F, Delft R, Haverkamp J. Preparation and immunochemical characterization of meningococcal group C polysaccharide-Tetanus toxoid conjugates as a new generation of vaccines. *Infect Immun* 1983;40:39.
25. Leinonen M. Antibody response against pneumococcal polysaccharide antigens in vaccinated persons. *Ann Clin Res* 1982;14:267.
26. Monto AS, Brandt BL, Artenstein MS. Response of children to *Neisseria meningitidis* polysaccharide vaccines. *J Infect Dis* 1973;127:394.
27. Goldschneider I, Gotschlich EC, Artenstein MS. Human immunity to the meningococcus: the role of humoral antibodies. *J Exper Med* 1969;129:1307.
28. Rubinstein LJ, Stein KE. Murine immune response to the group C *Neisseria meningitidis* capsular polysaccharide — 1. Ontogeny. *J Immunol* 1988;141:4352.

ABSTRACT

Humoral immune response to the capsular polysaccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup C in an antimeningococcal BC vaccination trial in Antioquia, Colombia

As a complement to studying humoral immune response to the proteins of an antimeningococcal vaccine (VA-MENGOC-BC) against serogroups B and C, the humoral immune response to polysaccharide C of the vaccine was also evaluated in 142 children from 1 to 5 years of age in an area of the Department of Antioquia, Colombia. Paired pre- (T_0) and post-

vaccination (T_1) sera were tested for IgG response by means of ELISA and for serum lytic capacity against a strain of serogroup C by means of the bactericidal antibodies test (BAT). Response to the vaccine was statistically significant ($P < 0.01$) by both techniques. PAB demonstrated seroconversion ($T_1/T_0 \geq 4$) in 88% (95% confidence interval, CI95%: 80% to 95%) of all those who were seronegative before vaccination. The proportion of seroconversion in children 2, 3, and 4 years of age was 86% or more. Of all the sera tested with ELISA, 93% (CI95%: 89% to 97%) showed response to the vaccine ($T_1/T_0 \geq 2$), and 98% (CI95%: 94% to 100%) of the subjects with $T_0 \leq 500$ U/mL seroconverted. In this sample, the vaccine stimulated a specific and protective response as measured by ELISA and BAT, the latter test being utilized to evaluate protection status.