

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Curso de Pós-graduação em Biologia Parasitária**

**“Avaliação da Imunogenicidade de Vacina Recombinante Brasileira
(Butang) contra Hepatite B entre crianças
do Rio de Janeiro”**

Juliana Custódio Miguel

***Tese submetida ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Biologia Parasitária***

Orientação:

**Dra Clara Fumiko Tachibana Yoshida
Laboratório de Referência Nacional para Hepatites Virais
Departamento de Virologia**

***Rio de Janeiro
Abril 2005***

Agradecimentos

- *À Dra Clara Yoshida pela orientação e transmissão de tanto conhecimento.*
- *À Maria de Lourdes Aguiar de Oliveira pela orientação, apoio e carinho por todos esses anos.*
- *Ao Dr. Reinaldo Menezes Martins por me permitir transformar esse projeto em uma tese de mestrado e por me auxiliar em tudo que foi necessário.*
- *Ao Dr. Luiz Antônio Bastos Camacho e ao Dr. Adilson José de Almeida pelo auxílio imprescindível na análise estatística. Sem eles jamais teria conseguido.*
- *Aos meus amigos da sorologia: Cleber Ginuino, Elisângela da Silva, Ilton Santanna, Maria Lúcia Pires, Jucimara da Silva e Sheila Cheles Ferraz, por me socorrerem sempre e por transformarem momentos de desespero em momentos de muita diversão.*
- *À minha querida amiga Sabrina Alberti Nóbrega de Oliveira , sua amizade, apoio e ajuda foram muito importantes pra mim.*
- *À Natália Araújo Motta por estar sempre pronta a me ajudar.*
- *À minha família por estarem sempre ao meu lado.*
- *Ao meu noivo Rodrigo da Silva Cruz, obrigado pelo seu amor e por me aturar nos momentos de mau humor e em que só pensava em tese.*
- *Obrigado àqueles que de alguma forma me ajudaram .*
- *E claro, não poderia esquecer de agradecer a Deus por ter chegado até aqui.*

Índice Geral

1.0. Introdução	1
1.1. Breve Histórico	1
1.2. Agente Etiológico	3
1.3. Replicação Viral & Variabilidade Genética	6
1.4. Patogênese & Patologia	9
1.5. Imunobiologia & Diagnóstico Laboratorial	14
1.6. Epidemiologia	17
1.7. Tratamento	23
1.8. Prevenção e Controle	27
1.9. Vacina Butang	32
2.0. Justificativa	33
3.0. Objetivos	34
4.0. Aspectos Éticos	35
5.0. Material e Métodos	36
5.1. Imunogenicidade de Vacina Recombinante entre crianças	36
5.2. População de Estudo	36
5.3. Protocolo de Vacinação	37
5.4. Testes Laboratoriais	38
5.5. Teste comparativo de metodologias para quantificação do anti-HBs	41
6.0. Análise Estatística	43
7.0. Resultados	44
7.1. Avaliação de imunogenicidade da Vacina Butang	44
7.2. Sorologia para HBV	46
7.3. Estudo comparativo entre diferentes metodologias	51
8.0. Discussão	65
8.1. O problema da hepatite B no Brasil e no mundo	65
8.2. Características da população estudada	67
8.3. Imunogenicidade da Vacina Butang em crianças	69
8.4. Estudo comparativo entre diferentes metodologia	71
9.0. Conclusões	74
10.0. Perspectivas Futuras	75
11.0. Referências Bibliográficas	76
12.0. Anexos	90

Índice de Figuras

Figura 1. Microscopia eletrônica do HBV	3
Figura 2. Representação esquemática do HBV	5
Figura 3. Representação esquemática do genoma do HBV	5
Figura 4. Ciclo de replicação do HBV	8
Figura 5. Curso sorológico da infecção aguda pelo HBV	12
Figura 6. Curso sorológico da infecção crônica pelo HBV	12
Figura 7. Distribuição geográfica da hepatite B crônica no mundo	17
Figura 8. Distribuição da infecção pelo HBV no Brasil	18

Índice de Esquemas

Esquema 1. Fluxograma com breve histórico das hepatites virais	2
Esquema 2. Variação da amostragem no decorrer do projeto	45

Índice de Tabelas

Tabela 1. Marcadores sorológicos da hepatite B	16
Tabela 2. Interpretação do perfil sorológico na hepatite B	16
Tabela 3. Distribuição da população recrutada, segundo faixa etária	44
Tabela 4. Prevalência dos marcadores do HBV nas amostras positivas	46
Tabela 5. Frequência da resposta vacinal, segundo título de anti-HBs	48
Tabela 6. Soroproteção e TMG obtidos após vacinação	50
Tabela 7. Títulos de anti-HBs em diferentes metodologias	51
Tabela 8. Características operacionais e técnicas das três metodologias	52
Tabela 9. Adequação para pequenos laboratórios	53

Índice de Gráficos

Gráfico 1. Distribuição da vacinação de acordo com o sexo	45
Gráfico 2. Marcadores do HBV, pré-vacinação	46
Gráfico 3. Marcadores do HBV, pós-vacinação	47
Gráfico 4. Perfil sorológico, cruzamento de dados	48
Gráfico 5. Frequência de resposta vacinal entre crianças	49
Gráfico 6. Título Médio Geométrico (TMG) de acordo com o sexo	50
Gráfico 7. Frequência dos títulos de anti-HBs (Access) em mUI/ml	55
Gráfico 8. Títulos de anti-HBs transformados em logaritmo (laccess)	55
Gráfico 9. Frequência dos títulos de anti-HBs (IMx) em mUI/ml	56
Gráfico 10. Títulos de anti-HBs transformados em logaritmo (limx)	56
Gráfico 11. Frequência dos títulos de anti-HBs (Diasorin) em mUI/ml	57
Gráfico 12. Títulos de anti-HBs transformados em logaritmo (ldiasorin)	57
Gráfico 13. Correlação linear entre títulos de anti-HBs com Access e IMx	58
Gráfico 14. Correlação linear entre títulos de anti-HBs com Access e Diasorin	59
Gráfico 15. Correlação linear entre títulos de anti-HBs com IMx e Diasorin	60
Gráfico 16. Anti-HBs após vacinação com Butang , em Access e IMx	61
Gráfico 17. Anti-HBs após vacinação com Engerix-B , em Access e IMx	61
Gráfico 18. Anti-HBs após vacinação com Butang, em Access e Diasorin	62
Gráfico 19. Anti-HBs após vacinação com Engerix-B, em Access e Diasorin	62
Gráfico 20. Anti-HBs após vacinação com Butang, em IMx e Diasorin	63
Gráfico 21. Anti-HBs após vacinação com Engerix-B, em IMx e Diasorin	64

Abreviaturas e Siglas

ALT = alanina aminotransferase
Antígeno Au = antígeno Australia
Anti-HBc total = anti-HBc IgM + anti-HBc IgG
Anti-HBe = anticorpo contra o HBeAg
Anti-HBs = anticorpo contra o HBsAg
AST = aspartato aminotransferase
CHC = Carcinoma hepatocelular
CV = Coeficiente de variação
DNA = ácido desoxirribonucléico
DST = doença sexualmente transmissível
ELISA = Ensaio imunoenzimático
FDA = Food and Drug Administration
HAV = Vírus da hepatite A
HBcAg = antígeno do capsídeo do HBV
HBeAg = antígeno “e” do HBV
HBIG = Imunoglobulina humana contra o vírus B
HBsAg = antígeno de superfície do HBV
HBV = Vírus da hepatite B
HBV-DNA = Genoma do HBV
HCV = Vírus da Hepatite C
HDV = Vírus da hepatite delta
HEV = Vírus da hepatite E
HIV = Vírus da imunodeficiência humana
HRP = *Horseradish peroxidase*
Ln = Logaritmo neperiano
MS = Ministério da Saúde
MUI/ml = miliunidades internacionais por mililitro
ORF = Região aberta de leitura
OMS = Organização mundial de saúde
PCR = Reação em cadeia da polimerase
PNI = Programa Nacional de Imunizações
RE = Retículo endoplasmático

SVS = Secretaria de Vigilância em Saúde
TC₀ = Triagem sorológica pré-vacinal
TC₉ = Sorologia após término do esquema
TMB = Tetrametilbenzidina
TMG = Título médio geométrico
Vacina A = Vacina Butang
Vacina T = Vacina Engerix-B

Resumo

Avaliação da Imunogenicidade de Vacina Recombinante Brasileira (BUTANG) contra Hepatite B em Crianças do Rio de Janeiro

Juliana Custódio Miguel

Orientadora: Dra Clara Fumiko Tachibana Yoshida

Recentemente, o Instituto Butantan (São Paulo) produziu a primeira vacina recombinante brasileira contra a Hepatite B – Butang (BUT). Ministério da Saúde promoveu um estudo multicêntrico em 5 diferentes regiões do país em diferentes faixas etárias (Recém-nascidos, crianças, adolescentes e adultos). Como parte do projeto, nós avaliamos a imunogenicidade de BUT entre crianças de 1 a 10 anos provenientes do Educandário Social Lar de Frei Luíz, Rio de Janeiro, no período de 2001-2002. As crianças foram imunizadas com 3 doses (10 µg) de BUT (N=219) ou Engerix-B (EB, Glaxo SmithKline Biologicals, N=264), em esquema de 0,1,6 meses. Amostras de sangue foram coletadas antes da 1ª dose (Co) e 28-100 dias após a 3ª dose (C₁). HBsAg, anti-HBc e anti-HBs foram testados em ensaios imunoenzimáticos comerciais (BioMerieux) (Co) e anti-HBc foi retestado em C₁. Os títulos de anti-HBs foram determinados usando um ensaio imunoenzimático de quimioluminescência (Access Ab HBsII, Beckman-Coulter) e soroproteção foi definida como anti-HBs ≥ 10 mUI/ml. A equivalência entre as vacinas foi definida como: i) Diferença de soroproteção ≤ 5% (BUT-EB) e ii) Razão de TMG-BUT/TMG-EB > 0,67. A soroproteção foi observada em 100% e 97,7% das crianças, assim como TMGs de 3600 e 2761 de BUT e EB, respectivamente. A diferença de soroproteção foi de 2,3% e a razão de TMG foi de 1,3.

Durante o projeto, avaliamos diferentes ensaios comerciais para estimar a resposta vacinal. Cento e sessenta e três utilizadas no projeto foram retestadas usando um ensaio de micropartículas (IMx AUSAB, Abbott Laboratories) e um método baseado na técnica do ELISA (ETI-AB-AUK-3, Diasorin). Os ensaios mostraram resultados concordantes. Os equipamentos foram analisados de forma pareada - Access/IMx, Access/Diasorin e IMx/Diasorin, os coeficientes de correlação linear (r) obtidos foram: 0,960, 0,913 e 0,943, respectivamente. A correlação mais forte obteve-se entre Access/IMx.

Com estes resultados, concluímos que BUT mostrou-se equivalente à EB, podendo ser utilizada na faixa etária estudada sem restrições. As metodologias também se mostraram equivalentes, com uma forte correlação entre si (p<0.01), demonstrando assim a confiabilidade do uso das três metodologias na análise da resposta vacinal.

Abstract

Immunogenicity of a Hepatitis B Recombinant Vaccine Produced by Instituto Butantan among Children in Rio de Janeiro.

Juliana Custódio Miguel

Orientadora: Dra Clara Fumiko Tachibana Yoshida

Recently, the Instituto Butantan (São Paulo, Brazil) produced the first Brazilian recombinant vaccine against hepatitis B (BUTANG-BUT). To enlarge the existing data, the CGPNI/FNS/MS promoted a multi-center study, carried out in 5 localities and among different age strata. As part of this project, we investigated the immunogenicity of BUT among children aged 1-10 years from Educandário Lar de Frei Luiz, Rio de Janeiro, during the period 2001-2002. Children were immunized with 3 doses (10ug) of BUT (N=219) or Engerix B ("EB", Glaxo SmithKline Biologicals, N=264), following the schedule 0, 1, 6 months. Blood samples were collected prior to the first (C₀) and 28-100 days after the third doses (C₁). Detection of HBV markers was performed using immunoassays (BioMerieux) (C₀) and anti-HBc was retested in C₁. Anti-HBs titer was determined using a paramagnetic-particle chemiluminescent immunoassay (Access Ab HBs II, Beckman-Coulter) and seroprotection was defined as anti-HBs ≥ 10 mUI/ml. Equivalence between vaccines was defined as i) a difference not larger than 5% between seroprotection proportions (BUT- EB) and ii) GMT-BUT/GMT-EB ratio > 0.67 . Seroprotection was observed in 100.0% and 97.7% of children, with GMTs of 3.600 mUI/ml and 2761 mUI/ml for BUT and EB, respectively. The difference between seroprotection proportions was 2.3% and GMT ratio was 1.3.

During the project we evaluated different commercially assays to assess HBV vaccine response. A total of 163 samples were further tested using a microparticle enzyme immunoassay (IMx AUSAB, Abbott Laboratories) and a method based in EIA (ETI-AB-AUK-3, Diasorin). The tests presented concordant results ($p < 0.01$). We analyzed in pairs – Access/IMx, Access/Diasorin and IMx/Diasorin. The linear coefficients were 0.960, 0.913 and 0.943, respectively. The highest correlation was among Access/IMx.

These results showed that both vaccines are equivalent and suitable for use among children and that commercial assays are suitable for vaccine response evaluation.

1.0. Introdução

1.1. Breve histórico

As hepatites virais são infecções antigas com múltiplas causas, caracterizadas por uma lesão necroinflamatória dos hepatócitos, de gravidade variável. As primeiras descrições desta infecção ocorreram no século V a.C. por Hipócrates, que relatou uma icterícia epidêmica. O primeiro surto de uma forma de hepatite, que mais tarde foi reconhecida como hepatite B, foi documentada por Lurman na Alemanha, em 1883. O surto foi observado num grupo de 1289 trabalhadores de um estaleiro, imunizados para varíola, com vacina preparada a partir de linfa humana.

No início do século XX, observou-se um tipo de hepatite de longo período de incubação em indivíduos que eram atendidos em clínicas onde se administravam injeções com agulhas e seringas inadequadamente esterilizadas (Mahoney , 1999; Hollinger & Liang , 2000).

Em 1937, Findlay e MacCallum descreveram casos de icterícia ocorrendo de 2 a 7 meses após administração de uma vacina atenuada para febre amarela, fabricada utilizando soro humano como estabilizador. Em 1942, durante a 2ª Guerra Mundial houve uma grande epidemia de hepatite nas tropas britânicas que haviam sido vacinadas para febre amarela. Ocorreram em torno de 28.000 casos com 62 mortes. Posteriormente estudos demonstraram que a epidemia foi causada pelo Vírus da Hepatite B (HBV). Os termos Hepatite A e Hepatite B foram introduzidos por MacCallum e Bauer em 1947 para classificar hepatite infecciosa e hepatite por “soro homólogo” (Beeson, 1943; MacCallum & Bauer, 1947). Estas classificações foram adotadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1973 (Lok , 2000).

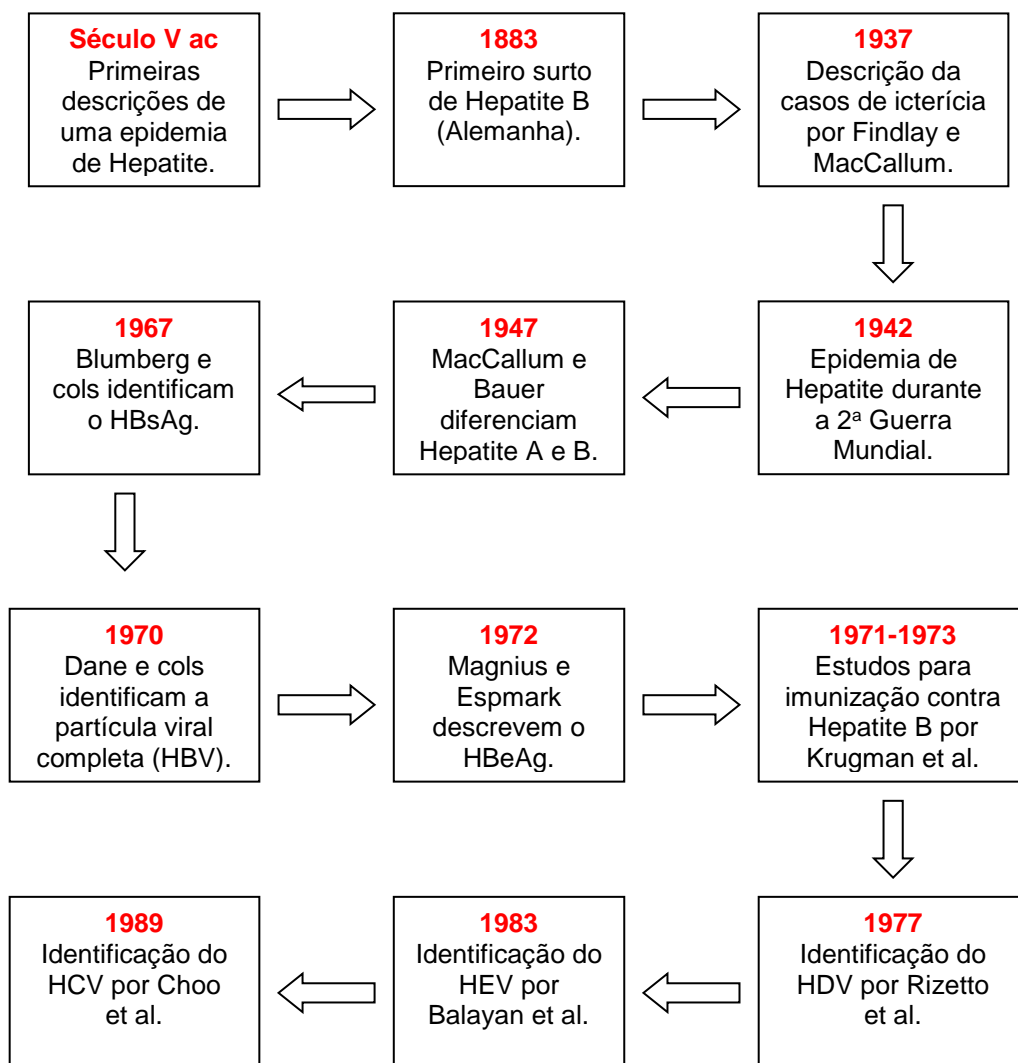
Na década de 60, Blumberg e colaboradores identificaram um antígeno presente no soro de um paciente aborígine australiano leucêmico que reagia com anticorpos do soro de um paciente americano hemofílico. Desta forma, o antígeno foi denominado Antígeno Austrália (Au), que hoje conhecemos como antígeno de superfície do HBV (HBsAg) (Blumberg , 1965; Blumberg , 1977). Em 1970, Dane e colaboradores identificaram no sangue de indivíduos infectados, a partícula viral

completa (HBV), com 42 nm de diâmetro, que na época foi denominada partícula de Dane (Dane, 1970).

Um outro antígeno foi descrito em 1972 por Magnius e Espmark que foi denominado antígeno “e” da hepatite B (HBeAg). Este antígeno está relacionado à infecciosidade (Magnius & Espmark, 1972).

Entre 1971 e 1973, Krugman e colaboradores estudaram a imunização ativa contra hepatite B utilizando uma preparação imunogênica e parcialmente protetora (Krugman, 1971; Krugman & Giles, 1973). A descrição desta vacina “inativada” levou ao desenvolvimento de uma vacina derivada de plasma que, na década de 80, foi substituída por uma vacina recombinante.

Na década de 70, foi identificado o antígeno delta que corresponde a um marcador para infecção pelo Vírus da Hepatite Delta (HDV) (Rizzetto et al, 1977). Já nos anos 80, foram identificados os Vírus da Hepatite E (HEV) e Vírus da Hepatite C (HCV) (Balayan et al, 1983; Cho et al, 1989) (Esquema 1).



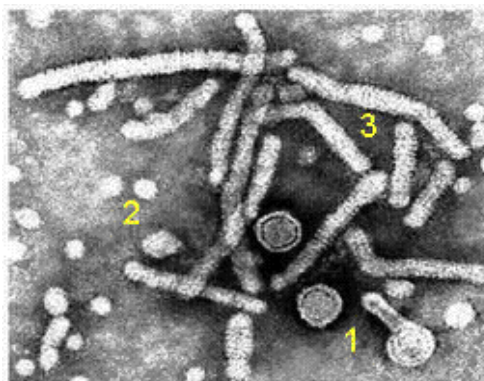
Esquema 1: Fluxograma com breve histórico das Hepatites Virais

1.2. Agente Etiológico

➤ Vírus da Hepatite B (HBV)

O Vírus da Hepatite B (HBV) foi classificado na família *Hepadnaviridae*, gênero *Orthohepadnavirus*. Dentre as principais características dos vírus pertencentes a essa família estão o fato de serem predominantemente hepatotrópicos e estarem relacionados com desenvolvimento de um processo de cirrose hepática e carcinoma hepatocelular. Pequenas quantidades de DNA viral podem ser encontradas nos rins, pâncreas e células mononucleares (Mahoney, 1999; Hollinger & Liang, 2000).

O HBV é um vírus envelopado, de simetria icosaédrica. A partícula viral completa com aproximadamente 42 nm de diâmetro, constitui o virion infeccioso, composta pelo envelope e nucleocapsídeo. A camada externa ou envelope é formada por proteínas, lipídeos e carboidratos e é composta pelo antígeno de superfície do HBV ou HBsAg. O HBsAg é produzido em larga escala e circula no sangue, não só na partícula viral completa, mas também sob a forma de partículas menores não infecciosas. Estas partículas são imunogênicas, assumindo formas esféricas ou tubulares com aproximadamente 22 nm de diâmetro e diâmetro variado (figura 1). A camada interna ou nucleocapsídeo apresenta uma estrutura interna ou “core” (HBcAg), uma proteína solúvel (HBeAg), uma fita de DNA parcialmente dupla e a enzima viral DNA polimerase (Ganem & Varmus, 1987; Grob, 1998; Hilleman, 2003).



Fonte: web.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/hepb.html

Figura 1: Microscopia eletrônica do HBV. 1. Partícula de Dane; 2. Partículas esféricas; 3. Partículas tubulares

O HBV é o menor vírus de DNA conhecido, seu genoma apresenta apenas 3200 pares de base de comprimento. Este é composto por uma fita de DNA circular, parcialmente dupla (figura 2). O genoma viral contém 4 fases abertas de leitura (ORFs – Open Reading Frames), sendo estas regiões responsáveis por codificar mRNAs de 3.5, 2.4, 2.1 e 0.7 Kb que são traduzidos nas proteínas estruturais (envelope e nucleocapsídeo) e não-estruturais (envolvidas no processo de replicação viral) do vírus. A fita negativa do DNA, denominada L(-), é maior, forma quase um círculo completo e encerra as ORFs (genes S, C, P e X). Já a fita positiva denominada L(+), é menor e de comprimento variável (figura 3) (Chisari & Ferrari, 1997; Mahoney, 1999; Malik & Lee, 2000).

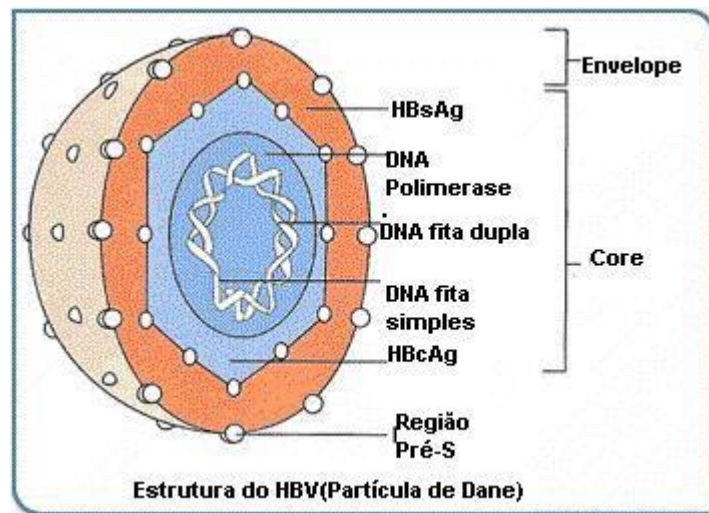
O gene S é dividido nas regiões pré-S₁, pré-S₂ e S que codificam três proteínas do envelope, para as quais os anticorpos neutralizantes são dirigidos. A região pré-S₁ codifica a proteína grande (L-large), a região pré-S₂ codifica a proteína intermediária (M-medium) e a região S codifica a proteína menor (S-small) que é a mais abundante e apresenta 226 aminoácidos. A proteína M corresponde à proteína S acrescida de 55 aminoácidos da região pré-S₂ e a proteína L corresponde à proteína M acrescida de 108 a 119 aminoácidos da região pré-S₁. O antígeno de superfície do HBV (HBsAg) encontra-se presente nas três proteínas. Sugere-se que as proteínas pré-S tenham um importante papel na ligação do vírus aos hepatócitos, na montagem do virion e sua liberação pela célula (Sherlock, 1990; Grob, 1998).

O gene C é dividido nas regiões pré-C e C que codificam as proteínas do nucleocapsídeo (HBcAg e HBeAg). A Região C codifica a proteína do core (HBcAg) e a região pré-C codifica polipeptídeos que originam uma proteína solúvel (HBeAg), envolvida na replicação viral. Quando transcrito, o HBcAg é direcionado ao retículo endoplasmático onde será clivado e o HBeAg é secretado. O HBcAg é essencial para empacotamento do vírus, não sendo detectável no soro e sim no tecido hepático. Já o HBeAg pode ser detectado no soro de pacientes com altos títulos virais (Lee 1997; Lok, 2000).

O gene P codifica enzimas essenciais para replicação viral, como a DNA polimerase e a RNase H. A DNA polimerase apresenta aproximadamente 2500 pares de base de comprimento, podendo agir como uma DNA polimerase convencional, assim como uma transcriptase reversa. Quando o vírus penetra nos hepatócitos, o genoma viral se direciona ao núcleo e é convertido em um DNA circular covalentemente fechado (cccDNA). Esta molécula serve como molde para o

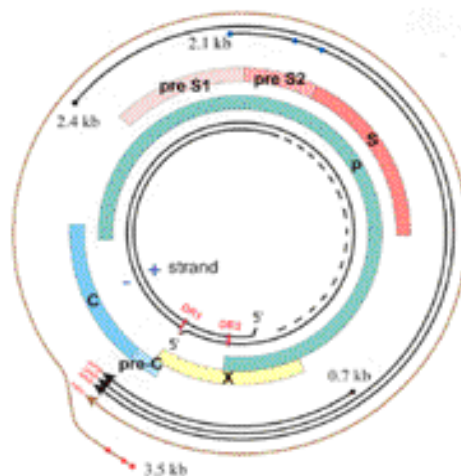
RNA mensageiro viral que se desloca para o citoplasma. Lá por um processo de transcrição reversa, haverá a síntese de uma nova molécula de DNA circular.

O gene X, cuja função não é totalmente esclarecida, codifica proteínas transativadoras responsáveis pela regulação de promotores virais e celulares. A proteína X está presente em pequenas quantidades no tecido infectado. Estudos sugerem que a expressão desregulada do gene X tenham importantes consequências fisiopatológicas na infecção crônica pelo HBV, incluindo hepatocarcinogênese (Ganem & Varmus, 1987; Glitin, 1997; Cooper et al, 2003; Bruix & Llovet, 2003).



Fonte:
www.worldwidevaccines.com

Figura 2: Representação esquemática do HBV



Fonte: Kidd-Ljunggren et al, 2002

Figura 3: Representação esquemática do genoma do HBV

1.3. Replicação viral & Variabilidade genética

O processo replicativo do HBV é único, que somente pode ser observado no gênero *Hepadnaviridae*.

O processo inicial de penetração viral nos hepatócitos é mediada pela interação entre receptores presentes em seu envelope e nos hepatócitos. Evidências indicam que a ligação pode ser mediada pela interação de um domínio na região pré-S com uma ou mais estruturas da membrana dos hepatócitos (Hilleman, 2003).

Ao penetrar na célula, o vírus perde o envoltório externo, o nucleocapsídeo é liberado no citoplasma e transportado para o núcleo. No núcleo, o DNA circular aberto é convertido pela DNA polimerase do hospedeiro, em um DNA circular covalentemente fechado (cccDNA), que atua como molde para transcrição de RNAs virais pela RNA polimerase II do hospedeiro. Estes transcritos são poliadenilados e o RNA mensageiro ou sub-genômico é transportado para o citoplasma onde será traduzido em várias proteínas virais, como por exemplo as proteínas do envelope, do core e proteína X. O outro RNA transcrito é o RNA pré-genômico. Este RNA serve de molde para a síntese da cadeia L(-) e posteriormente é traduzido em proteínas do capsídeo e DNA polimerase, assim o novo nucleocapsídeo pode seguir dois caminhos: formação e secreção de novos virions ou replicação do genoma viral no núcleo da célula (Chisari & Ferrari, 1997).

No primeiro caminho, o RNA pré-genômico no nucleocapsídeo serve como molde para a síntese da fita negativa do DNA por transcrição reversa, sendo a fita de RNA degradada concomitantemente pela ação da RNase H. Este RNA não é completamente degradado, sua sequência terminal é utilizada como iniciador na síntese da fita positiva do DNA. Em seguida, ocorre o acoplamento com as proteínas do envelope, que encontram-se inseridas como proteínas integrais na membrana do retículo endoplasmático (RE), havendo a formação de novos virions. Estes são transportados pelas membranas intracelulares do RE e Complexo de Golgi e, finalmente, secretados. No segundo caminho, o capsídeo migra para a membrana nuclear onde irá liberar seu genoma nascente, aumentando assim o pool intracelular de cccDNA (figura 4) (Mahoney, 1999; Ganem & Prince, 2004).

Em cada processo replicativo e durante o ciclo de vida do HBV, há chances do DNA viral incorporar-se ao genoma do hospedeiro. As chances são aumentadas

na infecção crônica (Ganem & Varmus, 1987; Chirasi & Ferrari, 1997; Cooper et al, 2003).

O HBV está classificado em diferentes genótipos/subtipos, segundo a homologia de nucleotídeos. A heterogenicidade sorológica está relacionada às mutações no envelope viral, ou seja, no HBsAg. Pelo menos 8 genótipos são conhecidos com diferentes distribuições ao redor do mundo: A, B, C, D, E, F, G e H. Os subtipos do HBsAg contêm um determinante de grupo, denominado “a”, comum a todos e quatro determinantes que constituem dois pares de alelos mutuamente exclusivos, denominados d/y e w/r, formando os quatro subtipos principais – adw, adr, ayw e ayr. Posteriormente, foi identificado o determinante q, assim o subtipo adr foi subdividido nas categorias *q positiva* e *q negativo*. As combinações destes determinantes resultam em 10 subtipos: ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adw4q⁻, adr⁺q⁺ e adr⁻q⁻, os números representam variedades antigênicas de cada subtipo (Jazayeri et al, 2004).

Os subtipos adw2 e ayw1 são inseridos nos grupos genômicos A e B que apresentam maior prevalência em áreas como o Noroeste da Europa e China, respectivamente. Os subtipos adw1, adr⁺q⁺, adr⁻q⁻ e ayr estão classificados no grupo genômico C, que apresenta prevalência significativa na Ásia Oriental e Coreia. No grupo genômico D, encontramos os subtipos ayw2 e ayw3 com maior prevalência na Região Mediterrânea e Índia. Nos grupos genômicos E e F, encontramos os subtipos ayw4 e adw4, respectivamente. As maiores prevalências encontradas para estes subtipos encontram-se na África Ocidental e entre os Índios das Américas, respectivamente. O genótipo G pode ser encontrado na França e EUA e o genótipo H na América Central e México (Magnius & Norder, 1995; Grob, 1998; Lai et al, 2003).

No Brasil, os genótipos mais comumente encontrados são A, D e F e os subtipos são adw2, ayw2, ayw3 e adw4. O subtipo adw2 é prevalente nas regiões centro-oeste, nordeste e sudeste; ayw2 e ayw3 na região sul e adw4 na população aborígine situada na região norte do país (Gaspar & Yoshida, 1987; Niel et al, 1994; Araujo et al, 2004). Nas populações de origem oriental foram encontrados os genótipos B e C.

Alguns estudos tentam relacionar o genótipo com o potencial patogênico do vírus. O genótipo A parece estar relacionado com melhor resolução da doença e maior sobrevida; o genótipo B com desenvolvimento de carcinoma hepatocelular e C

com maior virulência. A mutação no pré-core associada a hepatite fulminante é mais prevalente em determinados genótipos, como D, do que em outros (Baumert et al, 1996; Hollinger & Liang, 2000).

O escape de mutantes à vacinação parece estar envolvido com o determinante “a” que é formado por duas alças entre os resíduos de aminoácidos 124-147. Mutações nos resíduos 141 e 145 foram observadas em vacinados na Itália e oeste da África (Waters et al, 1992; Magnius & Norder, 1995; François et al, 2001).

A mutação mais comum é a substituição da Arginina por Glicina na posição 145. Os anticorpos neutralizantes (anti-HBs) são direcionados ao determinante “a”, com isso, observou-se que as vacinas não são capazes de proteger os indivíduos contra essas variantes do HBV (Yokosawa et al, 2002).

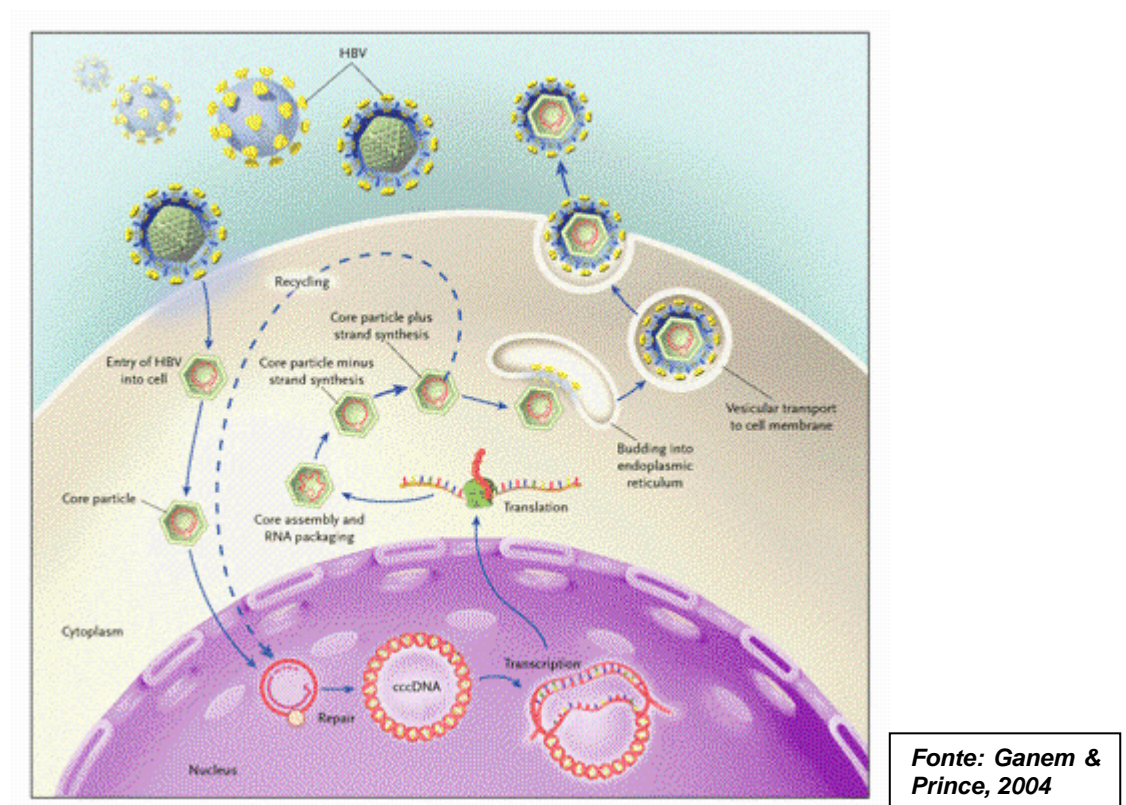


Figura 4: Ciclo de Replicação do HBV

1.4. Patogênese e Patologia

➤ Infecção pelo HBV

A hepatite B pode apresentar-se de várias formas: desde hepatite subclínica a hepatite sintomática e em alguns casos hepatite fulminante. Os danos causados ao fígado são caracterizados por destruição dos hepatócitos, regeneração e infiltrado celular que geralmente são resolvidos após eliminação viral (Fattovich, 2003).

Na hepatite crônica estas alterações podem levar desde um estado de portador assintomático até uma fibrose progressiva, culminando com cirrose hepática e carcinoma hepatocelular.

Vários fatores estão relacionados à evolução da doença como idade, nível de replicação viral e estado imunológico do hospedeiro.

A patogênese do HBV é de suma complexidade, visto a diversidade de respostas imunes e capacidade do vírus de escapar do sistema imunológico do hospedeiro.

O mecanismo de defesa inicial contra o vírus é através da resposta imune que se inicia através do reconhecimento não específico de componentes virais.

Havendo falha da resposta imune inata, segue-se a resposta imune adaptativa de duas formas:

- Imunidade Humoral composta de anticorpos, a fim de reduzir a carga viral através da destruição de partículas circulantes e,
- Imunidade Celular que visa destruir as células infectadas (apoptose) ou suprimir a replicação viral com ação de uma população de linfócitos T, principalmente linfócitos T CD8+. Estes apresentam-se em grande quantidade nas áreas de destruição celular (Hollinger & Liang, 2000; Liang et al, 2002).

As formas clínicas da hepatite B estão relacionadas com a resposta imunológica do hospedeiro:

- Pacientes com resposta imune forte: quadro clássico de hepatite aguda com eliminação do vírus ou em casos raros hepatite fulminante responsável por falência hepática nas primeiras semanas de doença aguda, devido a uma necrose hepatocelular maciça.

- Pacientes com resposta imune fraca: pode ser assintomático, resultando em cura ou tolerância parcial com replicação viral prolongada. Este processo pode levar à cirrose ou carcinoma hepatocelular, devido a uma lesão hepática contínua como consequência de uma eliminação viral ineficaz.
- Pacientes com resposta imune ausente: portador assintomático com perfeita tolerância à replicação pelo HBV, levando ou não a uma pequena lesão no fígado infectado (Ganem & Varmus, 1987; Hoofnagle et al, 1987; Grob, 1998; Hilleman, 2003).

➤ **Infecção Aguda**

As conseqüências da hepatite aguda são altamente variáveis. Este tipo de infecção pode manifestar-se de forma assintomática ou sintomática. A forma assintomática é mais comum entre neonatos e crianças. Apenas 5 a 15% das crianças entre 1 e 5 anos de idade desenvolvem quadro típico de hepatite B aguda (Liang et al,2002).

O curso da hepatite viral aguda pode ser dividido em 4 fases clínicas:

- a) Período de incubação;
 - b) Estágio pre-ictérico;
 - c) Fase ictérica e
 - d) Período de convalescência.
- a) O período de incubação do HBV varia de 45 a 180 dias. Vários fatores estão relacionados com variações neste período como: tamanho do inócuo, rota de infecção, co-infecção com outros agentes, interação vírus-hospedeiro, etc.
 - b) A fase pre-ictérica varia de dias a semanas precedendo o aparecimento da icterícia. Esta fase é caracterizada pelos seguintes sinais e sintomas: mialgia, anorexia, náuseas, vômitos, fadiga e mal estar. Observa-se também aumento das enzimas hepáticas.
 - c) A fase ictérica é caracterizada pela colúria (bilirrubinúria), acolia fecal e obviamente icterícia. Hepatomegalia ocorre em cerca de 10% dos pacientes, em alguns casos observam-se manifestações extrahepáticas como rash cutâneo, artralgia e artrite.

d) Na fase de convalescência, a icterícia e demais sintomas desaparecem. Na grande maioria dos pacientes, a recuperação ocorre em até 6 meses após início da doença (figura 5).

A hepatite fulminante é caracterizada por uma resposta exacerbada do sistema imunológico do hospedeiro levando a uma destruição maciça de hepatócitos, ocorrendo em aproximadamente 1 a 2% dos pacientes que desenvolvem hepatite B aguda (Mahoney, 1999; Ferreira, 2000; Befeler & Bisceglie, 2000).

➤ **Infecção crônica**

A hepatite B crônica é caracterizada pela presença do HBsAg por mais de 6 meses. Geralmente, os pacientes são assintomáticos ou apresentam sintomas mínimos. As enzimas hepáticas podem apresentar-se levemente alteradas ou até 20 vezes aumentadas (Liang et al, 2002) (figura 6).

Os pacientes, geralmente, apresentam altos níveis das enzimas hepáticas (ALT e AST), HBsAg e HBeAg positivos, HBV-DNA e atividade necro-inflamatória ou fibrose moderada a intensa. Pode-se observar em alguns indivíduos positividade para anti-HBe, na presença de HBV-DNA e transaminases elevadas. Estes indivíduos encontram-se infectados por uma variante do HBV que devido a uma mutação do pré-core, não secretam HBeAg. A mutação mais comum é observada no códon 28, nucleotídeo 1896, onde há uma troca de guanina por adenina (G1896A), resultando num códon de parada (Lee, 1997).

Na infecção crônica podemos observar 3 fases de replicação viral:

- Fase de replicação ativa: geralmente ocorre na fase inicial da doença e detecta-se a presença do HBsAg, HBeAg e HBV-DNA. A atividade inflamatória pode variar de leve a intensa e o risco de evolução para cirrose é elevado.
- Fase de baixa replicação: Observa-se conversão do HBeAg para anti-HBe, o que é indicativo de redução na replicação viral, diminuindo assim a reação inflamatória.
- Fase não-replicativa: Esta fase encontra-se relacionada à ausência de marcadores de replicação viral e redução da inflamação.

Em alguns casos, observam-se fenômenos de reativação que pode ocorrer espontaneamente ou após o emprego de drogas imunossupressoras podendo adquirir caráter fulminante (Ferreira, 2000).

A probabilidade de desenvolver hepatite B crônica está relacionada à idade, sendo maior em recém-natos infectados com HBV (90%). Cerca de 25 a 50% das crianças entre 1 a 5 anos desenvolverão infecção crônica enquanto cerca de 10% dos adultos não eliminarão o vírus e conseqüentemente evoluirão para cronicidade (Mahoney, 1999).

Indivíduos com infecção crônica apresentam fibrose do fígado, sendo 15-40% predispostos a desenvolver cirrose hepática, descompensação hepática e carcinoma hepatocelular (Fattovich, 2003).

O carcinoma hepatocelular se desenvolve em 0,5% dos pacientes com hepatite crônica e 2,4% dos pacientes com cirrose (Lee, 1997; Fattovich, 2003).

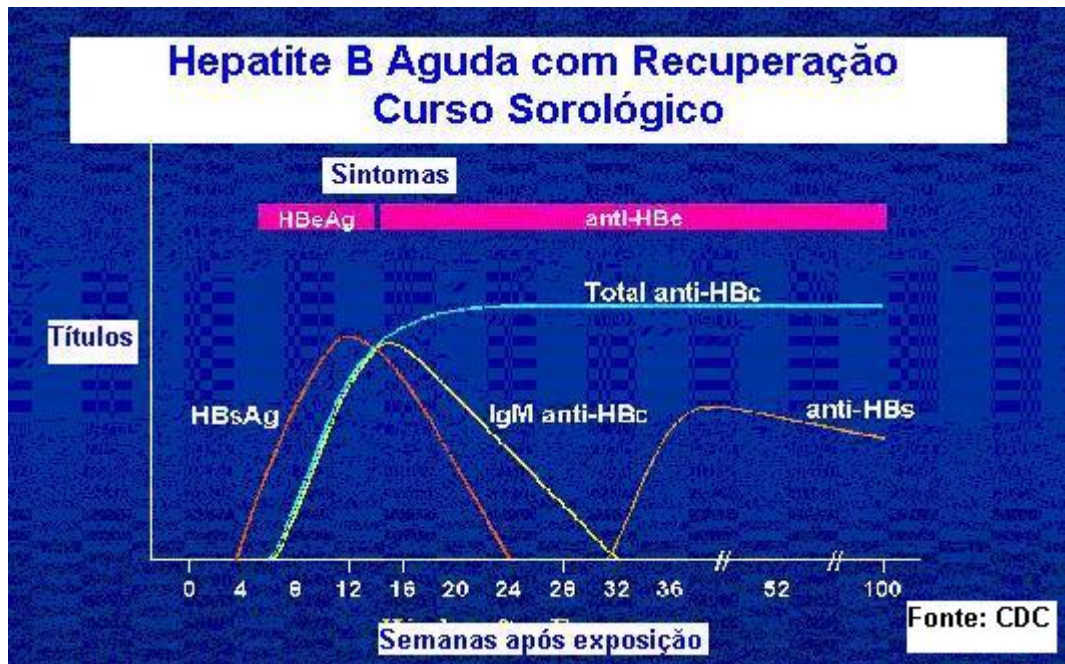


Figura 5: Curso sorológico da infecção aguda pelo HBV

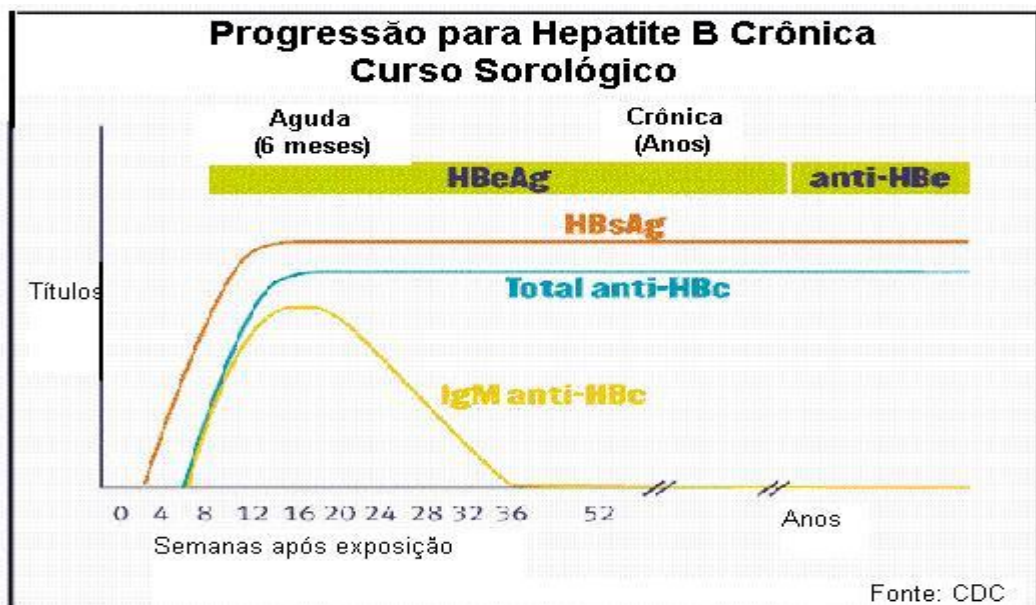


Figura 6: Curso sorológico da infecção crônica pelo HBV

1.5. *Imunobiologia e Diagnóstico Laboratorial*

A resposta imunológica decorrente da infecção pelo HBV é de grande complexidade e está relacionada ao hospedeiro, vírus e especificidade antigênica. A resposta humoral direcionada ao antígeno do envelope viral e células T citotóxicas que destroem os hepatócitos infectados, contribuem para a eliminação viral (Lee, 1997).

O diagnóstico laboratorial das hepatites virais e conseqüentemente da hepatite B pode ser realizada por vários métodos:

- Métodos bioquímicos que são importantes para avaliar o grau de comprometimento hepático. Num indivíduo infectado, pode-se observar elevação das enzimas hepáticas – alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) – que podem apresentar-se em níveis superiores a 10 e 100 vezes o valor normal (em torno de 40 UI/l). Outros testes bioquímicos são realizados a fim de avaliar as funções hepáticas como bilirrubina, fosfatase alcalina e gama-glutamil transferase.

A biopsia hepática também é de grande importância para auxílio no diagnóstico através da observação de alterações morfológicas do tecido hepático.

- Testes sorológicos que são capazes de identificar frações antigênicas do vírus e anticorpos secretados contra o vírus. A principal técnica utilizada é o Ensaio Imunoenzimático (ELISA) que possui alta especificidade e sensibilidade. Através da pesquisa dos marcadores sorológicos é possível a confirmação do diagnóstico. Os marcadores irão variar de acordo com o estágio da doença, sugerindo desta forma a fase da infecção: aguda, crônica e resolução.

Num quadro típico de hepatite aguda, o primeiro marcador a surgir é o antígeno de superfície do HBV (HBsAg), que é detectado por um período de 1 a 3 meses. Este marcador atinge um pico de concentração e em seguida declina a níveis indetectáveis dentro de 4 a 6 meses, dando lugar ao anti-HBs. A persistência do HBsAg por um período superior a 6 meses é característico de uma infecção crônica, podendo ser detectado indefinidamente. O percentual de eliminação do HBsAg em portadores crônicos é baixa (0,1-0,8%) (Lai et al, 2003).

O HBeAg é detectado subsequentemente ao aparecimento do HBsAg. Este marcador determina altos níveis de replicação viral e infecciosidade, sendo secretado no soro em altas concentrações durante o processo de replicação viral.

Dependendo do curso da infecção, soroconverte em poucas semanas dando lugar ao anti-HBe. A persistência por mais de 3 meses é indicativo de infecção crônica.

Um anticorpo da classe IgM, típico de infecção aguda, denominado anti-HBc IgM é detectado duas semanas após o aparecimento do HBsAg, podendo persistir por um período aproximado de 6 meses. Este marcador é importante para o diagnóstico da infecção aguda quando os níveis de HBsAg encontram-se inferiores ao limite de detecção do ensaio. O anti-HBc IgM também pode ser detectado em indivíduos com a infecção crônica, num período denominado reativação.

O anti-HBc Total é um marcador de exposição ao HBV, estando presente em infecções agudas e crônicas. Este anticorpo não confere imunidade ou qualquer proteção, persistindo por toda vida. Em muitos casos, observa-se a presença do anti-HBc como único marcador, o que pode levar a diversas interpretações: período de janela imunológica, após desaparecimento do HBsAg e aparecimento do anti-HBs; HBsAg em níveis indetectáveis; anti-HBc passivo e deve-se considerar a possibilidade de falso positivo (Alhababi et al, 2003).

O anti-HBe é detectável após desaparecimento do HBeAg. Seu surgimento é indicativo de redução na replicação viral e início da resolução da doença, sendo desta forma um marcador favorável.

O anti-HBs constitui o anticorpo neutralizante e confere imunidade à infecção pelo HBV. Pode surgir após a resolução da doença ou como resposta vacinal.

- Outro método diagnóstico é através das técnicas de biologia molecular que são utilizadas principalmente para esclarecimento diagnóstico e acompanhamento de pacientes que serão submetidos a tratamento. A principal técnica é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) que utiliza iniciadores permitindo a amplificação do genoma viral, como por exemplo DNA no caso da hepatite B. A técnica é altamente sensível podendo detectar 200 cópias/ml (Lai et al, 2003).

A presença do DNA do HBV avaliada por esta técnica é o indicador mais sensível da replicação viral, sendo de grande importância na determinação da resposta do organismo ao tratamento (Gitlin, 1997; Befeler et al, 2000; Mahoney, 1999) (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1: Marcadores sorológicos da hepatite B

Marcador	Significado
HBsAg	Antígeno de superfície do HBV. Primeiro marcador a surgir no curso da infecção. A persistência por mais de 6 meses é característico de evolução para infecção crônica.
HBeAg	A presença deste marcador é indicativo de intensa replicação viral, representando o período de maior infecciosidade. A persistência por mais de 3 meses é característico de evolução para infecção crônica.
Anti-HBc IgM	Marcador de infecção recente sendo importante para o diagnóstico da hepatite aguda.
Anti-HBc total	Marcador de exposição viral. Não confere imunidade e é detectado por toda a vida.
Anti-HBe	Marcador detectado após desaparecimento do HBeAg, sugerindo redução na replicação.
Anti-HBs	Anticorpo que confere imunidade ao indivíduo. Marcador indicador de cura ou resposta vacinal.

Tabela 2: Interpretação do perfil sorológico na hepatite B.

Interpretação	HBsAg	HBeAg	Anti-HBc IgM	Anti-HBc Total	Anti-HBe	Anti-HBs
Susceptível	-	-	-	-	-	-
Incubação	+	-	-	-	-	-
Hepatite aguda	+	+	+	+	-	-
Fim fase aguda ou hepatite crônica	+	+/-	-	+	-/+	-
Fase convalescente ou infecção recente	-	-	+	+	-	-
Imunidade, infecção passada recente	-	-	-	+	+	+
Imunidade, infecção passada	-	-	-	+	-	+
Imunidade, resposta vacinal	-	-	-	-	-	+

1.6. *Epidemiologia*

Globalmente, a hepatite B constitui um sério problema de saúde pública.

A OMS estima que aproximadamente 2 bilhões de pessoas, ou seja, 1/3 da população mundial tenha sido infectada e 350 milhões de indivíduos sejam portadores crônicos do vírus. Anualmente ocorrem em torno de 1 milhão de mortes devido a complicações posteriores como cirrose hepática e carcinoma hepatocelular. A hepatite B é apontada como uma das principais causas do câncer hepático, ou seja, corresponde a 75% dos casos, sendo o 5º tipo de câncer mais freqüente (Lai et al, 2003).

A maior freqüência de infecção ocorre entre indivíduos na faixa etária de 20 a 49 anos de idade (Brasil et al, 2003).

O HBV é transmitido através da exposição a sangue e fluidos corporais infectados, como sêmen, saliva e secreção vaginal. O vírus também encontra-se presente em títulos baixos no leite materno, lágrima e urina. Atualmente, a principal via de transmissão é a sexual.

O vírus também pode ser transmitido de mãe para filho (transmissão perinatal) principalmente durante o parto (Mahoney, 1999; Ranger-Rogez et al, 2002; Alter, 2003).

O Vírus da Hepatite B é 100 vezes mais infeccioso que o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e 10 vezes mais que o Vírus da Hepatite C (HCV) (MMWR, 2003).

O HBV é distribuído de forma heterogênea mundialmente, sendo o homem seu principal reservatório. A classificação epidemiológica se dá de acordo com a prevalência apresentada nas regiões observadas (Banker, 2003; Lavanchy, 2004):

- Baixa endemicidade: menos de 2% da população possui o HBsAg.
- Endemicidade intermediária: a prevalência de HBsAg fica entre 2-8%.
- Alta endemicidade: a prevalência de HBsAg é superior a 8%.

Estas prevalências estão diretamente relacionadas à idade em que a infecção ocorre (Grob et al, 1998; Andre, 2004).

Em áreas de alta endemicidade como Sudeste Asiático, África e República Dominicana, a transmissão ocorre principalmente de mãe para filho e durante a infância, o que aumenta o risco de evolução para cronicidade e conseqüentemente, câncer hepático (Fattovich, 2003).

Em áreas de endemicidade intermediária como Japão, Israel e parte da América do Sul e Central, a transmissão ocorre em todas as faixas etárias (Alter, 2003).

Em áreas de baixa endemicidade como Austrália, América do Norte e Nova Zelândia, a transmissão ocorre principalmente entre adultos jovens de determinadas populações sob especial risco como usuários de drogas injetáveis, heterossexuais e homossexuais com múltiplos parceiros, hemofílicos, hemodialisados e etc (figura 7) (Mahoney, 1999; Koff, 2002; Lavanchy, 2004).

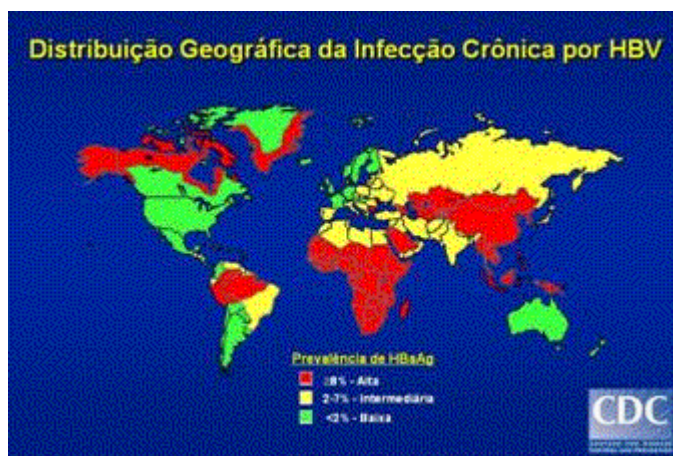


Figura 7: Distribuição Geográfica da Hepatite B Crônica no mundo.

A prevalência média de HBsAg entre doadores de sangue no Brasil, gira em torno de 0,6%, caracterizando área de baixa endemicidade, no entanto é um país que apresenta diversos padrões epidemiológicos para infecção pelo HBV, que aumentam no sentido sul-norte (Lewis-Ximenez et al, 2002; Rosini et al, 2003).

No geral, as regiões sul e sudeste são consideradas áreas de baixa endemicidade; as regiões nordeste e centro-oeste são consideradas áreas de endemicidade intermediária e a Região Amazônica, parte do Espírito Santo e oeste de Santa Catarina apresentam um padrão de alta endemicidade (figura 8) (Souto, 1999; Chávez et al, 2003).

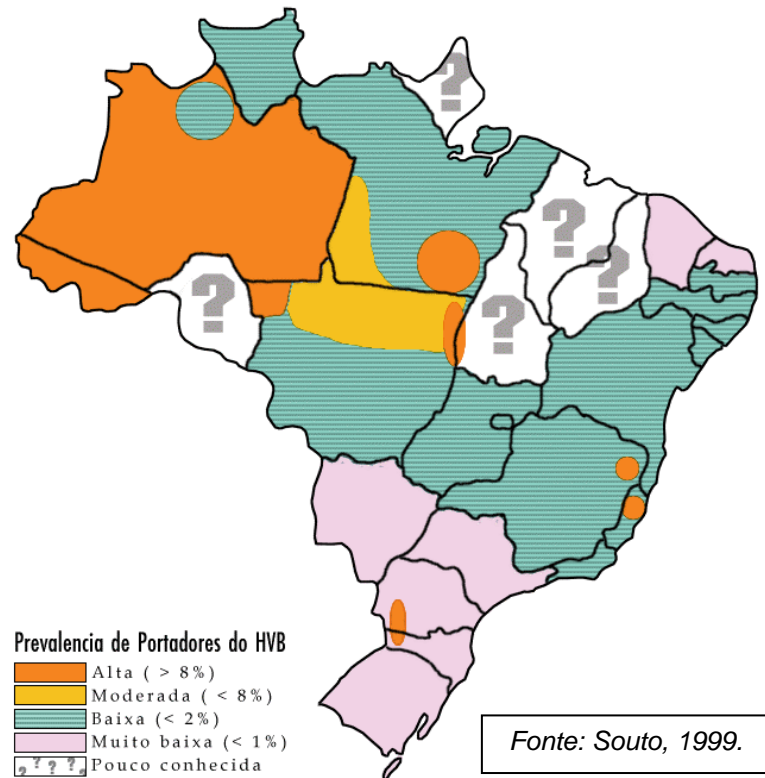


Figura 8: Distribuição da infecção pelo HBV no Brasil

➤ **Formas de Transmissão**

• **Transmissão Perinatal**

Principal forma de transmissão em áreas de alta endemicidade. Estima-se que 23% dos portadores na Ásia e 8% na África foram infectados através desta forma de transmissão (Zhang et al, 2004).

A criança é infectada principalmente durante o parto, caso não ocorra, o risco ainda existe através da transmissão horizontal durante os cinco primeiros anos de vida, principalmente em áreas endêmicas. O risco de transmissão aumenta com a aproximação do término da gravidez e a probabilidade de infecção é maior nas portadoras agudas (Broderick & Jonas, 2003).

A presença de HBeAg e HBV-DNA estão relacionados à um aumento no risco de evolução para cronicidade nos recém-nascidos. Crianças de mães HBeAg negativas apresentam menor probabilidade de se tornarem portadores (MMWR, 1991; Ranger-Rogez et al, 2002; Zhang et al, 2004).

O HBsAg pode ser detectado em pequenas quantidades no leite materno, o que poderia ocasionar a infecção pelo HBV, porém estudos demonstram que a amamentação não causa risco ao recém-nascido (Broderick & Jonas, 2003).

- ***Transmissão Horizontal***

Este tipo de transmissão ocorre principalmente em áreas endêmicas. A transmissão se dá entre familiares, principalmente entre pais e irmãos e indivíduos da comunidade. O mecanismo não é totalmente conhecido, mas acredita-se que ocorra através de itens de limpeza pessoal, alicates, lesões na pele como escabiose, impetigo e etc (Broderick & Jonas, 2003; Alter, 2003).

A transmissão horizontal está relacionada com carga viral elevada e HBeAg no soro do portador. O risco aumenta com adoção de crianças de áreas de alta endemicidade, já que as crianças possuem maior probabilidade de desenvolverem cronicidade, sendo conseqüentemente mais infecciosas (MMWR, 1991).

- ***Transmissão Sexual***

A via sexual é a principal via de transmissão atualmente, sendo mais evidente em áreas de baixa endemicidade. Ocorre principalmente através de sêmen e secreção vaginal contaminados.

Fatores como sexo desprotegido, tipo de prática sexual e outras doenças sexualmente transmissíveis como sífilis, gonorréia, herpes genital e etc, aumentam o risco de infecção (Oliveira, 2001; Ghanaat et al, 2003; Trepka et al, 2003).

- ***Transmissão Parenteral***

Constitui uma das formas mais importantes de transmissão do HBV, com ocorrência em todas as áreas.

O vírus pode ser transmitido através de acidentes com materiais perfurocortantes contaminados, compartilhamento de agulhas e seringas contaminantes entre usuários de drogas injetáveis (UDIs), em procedimentos como acupuntura e piercing e por acidentes de trabalho entre profissionais de saúde. Este tipo de

transmissão apresenta um declínio devido a maior rastreamento nos bancos de sangue e campanhas de prevenção (MMWR, 1991).

- ***Transmissão por artrópodes***

A possibilidade do HBV ser transmitido por mosquitos é debatida há muito tempo. Observou-se que o vírus pode sobreviver no interior de mosquitos, mas não ocorre replicação, sendo desta forma apenas um vetor mecânico. O Estado do Amazonas apresenta uma elevada densidade de mosquitos, o que elevaria a possibilidade deste tipo de transmissão (Brasil et al, 2003).

➤ ***Fatores de Risco***

Vários indivíduos são classificados em grupos que constituem uma população sob especial risco para infecção pelo HBV (Gitlin, 1997).

Estas populações de alto risco incluem:

1. **Profissionais de saúde.** O risco de adquirir a infecção pelo HBV está relacionado ao tempo de exposição ao sangue e outros fluidos corporais contaminados. O HBV é altamente estável no ambiente, desta forma deve-se identificar as principais formas de transmissão no ambiente hospitalar, adotando medidas adequadas de esterilização e proteção individual. A prevalência desta infecção entre estes indivíduos gira em torno de 1% (Floreani et al, 2004; Roggendorf & Viazov , 2003).
2. **Pacientes de hemodiálise.** Em vários países, como o Brasil, a infecção pelo HBV ainda constitui um sério problema nas clínicas de hemodiálise, apresentando alta prevalência, em torno de 12% como apresentado em alguns estudos. Vários fatores estão relacionados com esta prevalência, como: compartilhamento de equipamentos e suprimentos, não identificação de pacientes infectados pelo HBV e etc (Teles et al, 1998; Teles et al, 2001).
3. **Indivíduos Hemotransfundidos.** Esta forma de transmissão tem diminuído, principalmente após 1994, quando foram implementadas novas regras para maior controle dos doadores nos bancos de sangue. Alguns estudos

demonstram que em algumas localidades, como por exemplo Santa Catarina, ainda representa um problema, ocorrendo na proporção de 1:2077. Algumas medidas podem ser tomadas, principalmente em áreas de alta endemicidade, como testes laboratoriais que sejam capazes de detectar a infecção no chamado “período de janela imunológica” , aprimorar a seleção dos doadores e vacinação que trará resultados a longo prazo (Assad & Francis, 2000; Kupek, 2001).

4. **Familiares de portadores do HBV.** Este tipo de transmissão ainda não foi bem esclarecido. O fato do HBV sobreviver em superfícies por um período prolongado, o compartilhamento de objetos de higiene pessoal e lesões na pele facilitam a transmissão do vírus em um ambiente familiar (Alter, 2003).
5. **Usuários de Drogas Injetáveis (UDIs).** O compartilhamento de agulhas e seringas contaminadas e o comportamento sexual de alto risco observada neste grupo aumentam o risco de infecção nesta população. Nos últimos anos a prevalência vem caindo e gira em torno de 4% (Kunches et al, 1986; Oliveira, 1997; Oliveira, 2004).
6. **Homossexuais e Heterossexuais com múltiplos parceiros.** Além da multiplicidade de parceiros, aumentando a possibilidade de contato com o HBV, o tipo de prática sexual (principalmente anal) e outras Doenças Sexualmente Transmissíveis (DSTs), facilitam a propagação viral. As prevalências observadas podem variar de 3 a 13%. (Osella et al, 1998; Russi et al, 2003; Diamond et al, 2003).

1.7. Tratamento

➤ Hepatite Aguda

Não há tratamento específico para hepatite viral aguda. Assim, a terapia tem como objetivo adequar o balanço nutricional e minimizar a sintomatologia. Mais de 90% dos indivíduos adultos infectados evoluem espontaneamente para cura.

Os testes sorológicos devem ser repetidos após 3 meses para certificar que o vírus foi eliminado e para averiguar possibilidade de evolução para infecção crônica (Glitin, 1997; Ferreira, 2000).

➤ Hepatite Crônica

Os indivíduos indicados para tratamento são os pacientes com hepatite crônica ou cirrose hepática.

O objetivo da tratamento é reduzir o dano hepático através da diminuição da replicação viral, minimizando a inflamação crônica e prevenindo complicações posteriores como a progressão para cirrose hepática e carcinoma hepatocelular. Em pacientes infectados com mutantes, o sucesso do tratamento é evidenciado com negatificação do HBV e posterior negatificação do HBsAg (Malik & Lee , 2000; Ganem & Prince, 2004) .

Diversos medicamentos têm sido avaliados para o tratamento desta infecção. O *Interferon- α* e a *Lamivudina* são liberados mundialmente, o Adefovir dipivoxil foi liberado na Europa e EUA (Lok & McMahon, 2003). No Brasil, o tratamento é realizado de acordo com a Portaria nº860 de 12/11/2002 .

De acordo com a Portaria nº860, são adotados alguns critérios para a inclusão de um paciente no protocolo de tratamento:

- Idade superior a 2 anos;
- HBsAg positivo por mais de seis meses;
- HBeAg positivo ou HBeAg negativo com carga viral do HBV superior a 30000 cópias/ml;

- ALT superior a duas vezes o limite superior da normalidade em pelo menos duas determinações com intervalos superiores a trinta dias nos últimos seis meses;
- Biópsia hepática com atividade necro-inflamatória moderada a intensa e/ou fibrose moderada a intensa.

O transplante de fígado é efetivo em pacientes que se encontram em estágios muito avançados da doença e que não respondem à terapia (Heathcote, 2002).

➤ **Interferon-Alfa (IFN- α)**

O IFN pertence a uma família de moléculas protéicas naturalmente produzidas pelo organismo. Esta molécula apresenta ação dupla, sendo um potente antiviral e imunomodulador, através do aumento da atividade das células T, estimulando maturação das células B, inibindo as células T supressoras e aumentando a expressão do MHC de classe I (Lee, 1997).

A dose recomendada é de 5 milhões/unidades diariamente ou 10 milhões/unidades três vezes por semana de 4 a 6 meses por via subcutânea. O tratamento geralmente dura 16 semanas (Ferreira, 2000).

Os efeitos colaterais são comuns como febre, mialgia, dor de cabeça, fadiga e incluem efeitos mais graves como supressão da medula óssea, ocorrência de doença auto-imune e efeitos neuropsiquiátricos (Banker, 2003).

Apenas 30 a 40% dos pacientes tratados apresentam uma resposta sustentada. Alguns fatores são importantes para uma melhor resposta à terapia como ALT > 100 mUI/ml, níveis de HBV-DNA < 200 pg/ml, sexo feminino e doença hepática ativa (Heathcote, 2002).

As crianças infectadas com mais de 2 anos respondem à terapia de forma semelhante aos adultos (Lok & McMahon, 2003).

Para pacientes que não respondem ao IFN ou não são candidatos apropriados para o tratamento são necessários outros métodos. Neste grupo são inclusos:

- Indivíduos com contagem de plaquetas inferior a 70000 ou contagem de neutrófilos maiores que 1500/mm³.
- Com cardiopatia grave;
- Com neoplasias que não carcinoma hepatocelular;

- Diabete melito tipo 1 não controlada;;
- Cirrose hepática descompensada;
- Depressão grave;
- Imunodeprimidos;
- Gravidez ou mulheres em idade fértil sem contracepção adequada;
- Pacientes com mutações do pré-core;
- Pacientes com níveis normais de ALT (Banker, 2003; Ganem & Prince, 2004).

Recentemente, foi liberado para uso o Interferon Peguilado que apresenta meia-vida mais prolongada. Os dados disponíveis indicam que o dobro de pacientes soroconvertem para anti-HBe, atingem níveis de HBV-DNA inferiores a 500.000 cópias/ml e normalizam ALT em comparação ao IFN convencional (Lavanchy, 2004)

➤ **Lamivudina**

Pertence a uma família de medicamentos denominados análogos de nucleosídeos. Estes compostos atuam por fosforilação e competem com o substrato por ligação à seqüência do DNA viral. A Lamivudina atua inibindo, competitivamente, a transcriptase reversa viral e, com isso, encerra a extensão da cadeia de DNA, bloqueando diretamente a replicação viral (Thomas et al, 2002).

A droga é administrada oralmente em uma dosagem de 100 mg/dia pelo período mínimo de 12 meses.

A Lamivudina é bem tolerada apresentando poucos efeitos colaterais como dor de cabeça, náuseas e fadiga, podendo ser utilizada em situações onde o Interferon não é adequado (Glitin, 1997).

Após o tratamento, 17 a 21% dos pacientes fazem soroconversão do HBeAg para anti-HBe. A resposta é sustentada em cerca de 50% dos indivíduos (Lavanchy, 2004).

Pacientes que não atendem aos seguintes critérios, não deverão ser tratados com Lamivudina:

- Portadores do HIV;
- Hipersensibilidade a um dos componentes da fórmula da Lamivudina;
- Mulheres férteis sem controle adequado;

- Gravidez.

Um dos problemas da Lamivudina é o aparecimento de mutantes resistentes, o que é proporcional ao tempo de tratamento. A suspensão do tratamento leva ao desaparecimento do vírus mutante, já que este não replica de forma tão efetiva quanto o vírus selvagem. A mutação melhor estudada ocorre na região YMDD da polimerase com substituição de metionina por valina ou isoleucina (Lau et al, 2002).

A droga pode ser administrada em indivíduos com doença hepática descompensada proporcionando uma melhora da função hepática e qualidade de vida (Malik & Lee, 2000; Ferreira, 2000; Ganem & Prince, 2004).

➤ **Adefovir dipiroxil**

Este análogo de nucleosídeo foi aprovado recentemente pelo *Food and Drug Administration (FDA)* para tratamento da hepatite B crônica na Europa e EUA.

O medicamento atua como inibidor seletivo da polimerase viral, sendo administrado na dosagem de 10 µg/dia. Observa-se um aumento na soroconversão de HBeAg para anti-HBe, uma melhora histológica e bioquímica, sendo bem tolerado. Dados demonstram que é possível manter uma resposta por pelo menos 1 ano.

O Adefovir também atua nos mutantes do HBV resistentes à Lamivudina, inibindo desta forma sua replicação (Peters et al, 2002; Lai et al, 2003; Ganem & Prince, 2004).

Outros medicamentos estão sendo utilizados no tratamento da hepatite B crônica ou encontram-se em fase de estudo como Fanciclovir e Entecavir (Malik & Lee, 2000; Lok & McMahon, 2003).

1.8. Prevenção e Controle

A prevenção da hepatite B visa reduzir os casos de hepatite aguda, crônica e conseqüentemente as complicações desencadeadas pelo agravamento desta infecção. Estes fatores dependem da seleção e controle de doadores de sangue, sêmen, tecidos e educação da população em relação às formas de transmissão através de programas de conscientização e treinamento de profissionais de saúde. Vários caminhos podem ser seguidos para combate da hepatite B como: prevenção de exposição ao vírus e prevenção através de vacinação. O modo mais eficaz de combater a hepatite B é a prevenção através das vacinas. Esta inclui programas de vacinação que englobam crianças em todo mundo e adolescentes e adultos que constituam uma população sob especial risco para esta infecção (Hollinger & Liang, 2000; Hilleman, 2003). No Brasil, a vacina contra hepatite B foi implementada em 1992. Atualmente é oferecida a menores de 20 anos em todo país, a indivíduos sob especial risco em qualquer faixa etária, fazendo parte do calendário infantil de imunizações do Ministério da Saúde (Ministério da Saúde, 2003).

➤ Desenvolvimento de vacinas contra hepatite B

O antígeno de superfície do HBV (HBsAg) induz a produção de anticorpos protetores (anti-HBs). O HBsAg é altamente imunogênico e não infeccioso. As vacinas desenvolvidas contra Hepatite B utilizam o envelope viral para estimular o sistema imune a produzir estes anticorpos (Sherlock, 1990).

➤ Vacinas derivadas de plasma

A imunização ativa contra hepatite B em humanos foi inicialmente investigada por Krugman e colaboradores entre 1971 e 1973 usando uma preparação imunogênica de soro contendo HBV (cepa MS-2). Observou-se que este preparado ao ser fervido, perdia infectividade, mas mantinha antigenicidade (Krugman & Giles, 1973).

Uma vacina contra hepatite B derivada de plasma produzida nos EUA foi licenciada em 1981 (Heptavax-B®, Merck & Co, West Point, Pensilvânia). O Instituto

Pasteur, França, também produziu uma vacina derivada de plasma, denominada Hevac B[®], que foi amplamente utilizado no mundo, inclusive no Brasil.

Para produção desta vacina foram realizadas uma série de purificações e inativações que mostraram-se eficazes para remover ou inativar virions infecciosos e outros grupos de vírus capazes de infectar o homem.

Nos anos 80, a vacina derivada de plasma Heptavax-B[®], por ser de produção limitada devido à pequena disponibilidade de plasma, por ser dispendiosa e devido receio da presença de agentes infecciosas como HIV, foi substituída por uma vacina recombinante derivada de leveduras, não sendo mais produzida.

Alguns países, principalmente asiáticos como China e Taiwan, ainda utilizam as vacinas derivadas de plasma, podendo apresentar uma resposta em torno de 75% (Lee et al, 1995; Hui et al, 1998)

➤ **Vacinas recombinantes**

Tanto a vacina original derivada de plasma quanto as vacinas obtidas a partir da tecnologia do DNA recombinante, usam o envelope do HBV (HBsAg), como imunógeno responsivo.

Nas vacinas recombinantes, o gene S, responsável pela codificação do HBsAg (subtipo adw2), é clonado e o plasmídeo contendo o inserto é inserido em células eucarióticas (*Sacharomyces cerevisiae*, por exemplo). Nestas, proteínas HBsAg recombinantes são expressas. Posteriormente, as proteínas recombinantes são purificadas, adsorvidas em hidróxido de alumínio para fabricação da vacina e conservadas em timerosal (Hilleman, 1987; Stephenne, 1990).

As vacinas recombinantes, após administração de 3 doses, induzem à soroconversão em mais de 95% dos indivíduos jovens e saudáveis. Em indivíduos adultos com mais de 40 anos, 30-50% desenvolvem anticorpos após a primeira dose, 75% após a segunda dose e mais de 95% após a terceira dose. A terceira dose confere a maior soroproteção, atuando como um reforço e conferindo proteção de longa duração através do estímulo da memória imunológica. A resposta vacinal pode ser alterada com o avanço da idade, tabagismo, sexo masculino (mulheres respondem melhor), obesidade e infecções crônicas (Assad & Francis, 2000). Os efeitos colaterais são bastante reduzidos, sendo os mais comuns dor local e febre (MMWR, 2003). O esquema vacinal pode variar de acordo com o padrão

epidemiológico da região e a necessidade do indivíduo, sendo o mais comum de 0,1 e 6 meses.

Esquemas alternativos mostraram-se eficientes, podendo ocorrer intervalos menores entre as doses para indivíduos que irão viajar para áreas de alta endemicidade, por exemplo e esquemas de 4 doses para indivíduos imunodeprimidos como dialisados e HIV positivos. Observou-se taxa de soroconversão de 87 a 95% em crianças vacinadas com 3 doses de 0, 10 e 21 dias. Comparando-se o esquema acelerado com o esquema clássico, observou-se que o primeiro induziu uma resposta mais acentuada, mas após 6 meses, 100% de ambos os grupos permaneceram soroprotégidos (Bosnak et al, 2002; Alter, 2003).

Concentrações séricas de anti-HBs superiores a 10 mUI/ml conferem imunidade à infecção pelo HBV. Após o esquema de 3 doses, geralmente alcançam-se níveis entre 100 e 1000 mUI/mL. A necessidade de um reforço geralmente não é recomendado, já que a imunização induz à memória imunológica, o que permite que mesmo com níveis baixos o indivíduo seja capaz de desenvolver uma resposta contra o vírus (Mahoney, 1999; Siegrist, 2004). Alguns profissionais recomendam uma dose extra em indivíduos não respondedores e naqueles em que os níveis se tornem inferiores a 10 mUI/ml (Banatvala & Damme, 2003).

As principais vacinas recombinantes contra hepatite B licenciadas são Engerix B® (Glaxo SmithKline Biologicals, Rexensart, Bélgica e Filadélfia, Pensilvânia), Recombivax HB® (Merck – MSD, West Point, Pensilvânia) e Euvax-B® (Coréia) amplamente utilizada pelo Ministério da Saúde. A soroproteção induzida por estas vacinas é superior à 90%, sendo administrada em 3 doses. Em crianças a dose recomendada é de 10 µg/ml e em adultos é de 20 µg/ml, mas estas vacinas já foram testadas em vários grupos em doses de 2,5 a 40 µg/ml. Essas vacinas são amplamente utilizadas nos programas de vacinação, diminuindo a incidência de hepatite B e, por conseguinte, do carcinoma hepatocelular. Ainda, têm sido altamente eficazes em recém-nascidos de mães portadoras crônicas. Para prevenir a transmissão perinatal deve-se administrar a vacina no neonato assim que possível, juntamente com imunoglobulina humana (HBIG), que é padronizada com 100.000 UI de anti-HBs/ml, preferencialmente até 24 hs após o nascimento.

A imunoglobulina humana também é utilizada, juntamente com a vacina, em indivíduos que tiveram exposição percutânea ou sexual ao HBV e em pacientes recém transplantados para evitar infecção, administrando-se dose de 5 ml por via

intramuscular (Mahoney FJ, 1999; Coates et al, 2001; Keating & Noble, 2003; Koff, 2003; MMWR, 2003).

Alguns estudos indicam que a soroproteção pode manter-se por mais de 15 anos, havendo uma perda na detecção de anti-HBs de 13-60% entre 9 e 15 anos (West & Calandra, 1996; McMahon et al, 2005).

➤ ***Vacina combinada para Hepatites A e B***

Recentemente foi licenciada em indivíduos com mais de 18 anos, uma vacina combinada para prevenção das Hepatites A e B (Twinrix® - Glaxo SmithKline Biologicals). Esta vacina contém 20 µg de HBsAg recombinante juntamente com 720 unidades de ELISA do antígeno HAV inativado, sendo administrada em esquema de 0,1 e 6 meses. A vacina mostrou-se segura, bem tolerada e altamente imunogênica (99.7% para HBV e 100% para HAV), apresentando-se similar às vacinas monovalentes com o diferencial de reduzir o número de intervenções (Thoelen et al, 1999).

Algumas populações são considerada grupos alvos, beneficiando-se com a vacina combinada: jovens adultos, viajantes para áreas de alta prevalência, profissionais de saúde, UDIs e outros que estejam sob especial risco para estas infecções (Bruguera et al, 1996; Batalla & Urbiztondo, 1999; Schneller et al, 2002).

➤ ***Vacinas recombinantes com frações pré-S***

Algumas vacinas têm sido desenvolvidas, com objetivo de induzir resposta em indivíduos não-respondedores, estimular imunidade em indivíduos infectados com mutantes de escape do HBV e aumentar a imunogenicidade em indivíduos que apresentam fatores que reduzem a resposta vacinal, como idade, obesidade, fumo e etc (Itoh et al, 1986).

Dentre as mais utilizadas em humanos, temos as vacinas com frações pré-S, que são seqüências antigênicas do envelope do HBV que atraem os anticorpos neutralizantes (anti-HBs) (Zuckerman et al, 2001).

Estudos demonstraram que a seqüência pré-S₂ é altamente imunogênica, estimulando a resposta por células T e, desta forma, amplificando a resposta contra

o HBsAg. A vacina também mostrou induzir imunidade para os que não responderam com a vacina convencional, mas estudos complementares devem ser realizados a fim de confirmar estes dados (Jilg, 1998; Heineman et al, 1999; Koff, 2003).

Esta vacina também foi administrada em portadores do HBV (HBsAg e HBV-DNA positivos), onde observou-se em 26% dos indivíduos desaparecimento do HBV-DNA. Comparando-se com a vacina apenas com a fração S, a vacina préS₂+S mostrou-se superior neste mesmo grupo (20,0% x 4,8%) (Hollinger & Liang, 2000).

➤ ***Vacinas de DNA***

Estudos demonstraram que as vacinas de DNA podem trazer muitas vantagens em relação à vacina convencional, como por exemplo estimular células T CD8⁺ citotóxicas, já que o antígeno é sintetizado dentro da célula, facilitando a apresentação do antígeno via MHC de classe I.

Estas vacinas são de fácil administração (Intramuscular) e produção, com grande pureza e diminuindo a possibilidade de contaminação; podem ser mais seguras que algumas vacinas atenuadas; diversos antígenos podem ser inseridos em apenas um plasmídeo diminuindo o número de intervenções e além disso são mais estáveis, facilitando o armazenamento e o estoque (McDonnell & Askari, 1996).

A vacina além de segura e bem tolerada foi capaz de estimular soroconversão em indivíduos que não responderam à vacina convencional (Davis et al, 1996; Jilg, 1998; Rottinghaus et al, 2003).

1.9. Vacina Butang®

Recentemente, o Instituto Butantan em São Paulo, com cooperação da N.G. Biotecnologia Ltda produziu a primeira vacina recombinante brasileira contra Hepatite B . O Programa Nacional de Imunizações (PNI), a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) e o Ministério da Saúde (MS) promoveram um estudo multicêntrico para avaliação da Imunogenicidade e reatogenicidade desta vacina em diferentes faixas etárias (recém-nascidos, crianças, adolescentes e adultos), de modo a verificar a equivalência com a Vacina Engerix B® (Glaxo SmithKline Biologicals), a qual foi utilizada como a vacina padrão no escopo deste estudo (Martins et al, 2004).

A vacina Butang apresenta HBsAg recombinante purificado produzido na levedura *Hansenula polymorpha* e com hidróxido de alumínio como adjuvante.

Alguns estudos foram desenvolvidos em adultos para obtenção de dados preliminares da imunogenicidade desta vacina. Costa e colaboradores obtiveram soroconversão em 95,3% de 22 voluntários adultos após administração de 10 µg em esquema de 3 doses. Já Ioshimoto e colaboradores compararam 2 esquemas vacinais (0, 1, 3 e 0, 1, 6 meses) com dosagens diferentes, 10 µg e 20 µg, respectivamente. Os resultados obtidos demonstraram que a vacina com 20 µg mostrou-se mais eficiente em adultos (Costa et al, 1997; Ioshimoto et al, 1999).

2.0. Justificativa

O presente projeto teve como objetivo principal a avaliação da imunogenicidade da Vacina Butang entre crianças de 1 a 10 anos de idade no Rio de Janeiro, abordando uma faixa etária que é decisiva para uma possível erradicação da hepatite B nas gerações imunizadas.

A produção nacional de uma vacina recombinante contra hepatite B é de grande importância na prevenção e controle desta infecção, que representa um problema de saúde pública no Brasil e no mundo, além de baratear os custos e possivelmente permitir o acesso a esta vacina para um grupo maior de indivíduos.

Adicionalmente, o estudo comparativo entre diferentes metodologias, ACCESS AbHBs II (Beckman-Coulter), IMx AUSAB (Abbott Laboratories) e ETI-AB-AUK-3 (Diasorin), para quantificação de anti-HBs é de grande importância, de forma a disponibilizar alternativas com obtenção de resultados confiáveis, com custo mais baixo.

3.0. Objetivos

Objetivo Geral:

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a imunogenicidade da Vacina Butang[®] entre crianças de 1 a 10 anos de idade do Educandário Social Lar de Frei Luís, no Rio de Janeiro, utilizando uma vacina de padrão internacional como referência – Engerix-B[®].

Objetivos Específicos:

- Avaliar a taxa de soroconversão e Títulos Médios Geométricos (TMGs) após imunização com a vacina Butang[®], utilizando o ensaio imunoenzimático comercial Access AbHBs II (Beckman-Coulter).
- Comparar os títulos de anti-HBs obtidos com a administração da Vacina Butang[®] e da Engerix-B[®].
- Promover estudo comparativo entre três ensaios imunoenzimáticos comerciais para a quantificação do anti-HBs: ACCESS AbHBs II (Beckman-Coulter), IMx AUSAB (Abbott Laboratories) e ETI-AB-AUK-3 (Diasorin).

4.0. Aspectos Éticos

O estudo multicêntrico com a Vacina Butang® foi aprovado pelo COADE/FUNASA, pelo CGPNI, pelas Comissões de Ética das instituições participantes e pelo Comitê de Infectologia da Sociedade de Pediatria do Rio de Janeiro.

Em reunião com as entidades, foram feitos todos os esclarecimentos sobre o projeto e todos os voluntários assinaram um consentimento livre e esclarecido.

O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) emitiu um certificado de boa qualidade para a Vacina Butang permitindo sua utilização no estudo.

Aos indivíduos infectados pelo Vírus da Hepatite B, foi dada orientação e encaminhamento para tratamento e aos indivíduos que não responderam à vacinação ofereceu-se doses adicionais da vacina.

Tanto a equipe de trabalho quanto os participantes desconheciam a vacina a ser administrada. A alocação sistemática segundo o mês de nascimento tinha como objetivo evitar a administração errônea das vacinas utilizadas.

5.0. Material e Métodos

5.1. Imunogenicidade de Vacina Recombinante entre crianças:

5.1.1. Desenho do estudo:

Estudo multicêntrico controlado, randomizado, com duplo mascaramento visando verificar a imunogenicidade da Vacina Butang[®] em crianças de 1 a 10 anos de idade em comparação a uma vacina de padrão internacional – Engerix-B[®].

Este estudo foi desenvolvido no Educandário Social Lar de Frei Luíz (LFL), no Rio de Janeiro e no Departamento de Virologia, Laboratório de Referência Nacional para Hepatites Virais, FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

5.2. População de estudo:

Neste estudo foram recrutadas 652 crianças de 1 a 10 anos de idade, provenientes do Educandário Social Lar de Frei Luíz, Rio de Janeiro. O número de participantes foi baseado em outros estudos desenvolvidos no Laboratório de Referência Nacional para Hepatites Virais, FIOCRUZ. Todos os indivíduos recrutados deveriam preencher os seguintes critérios:

5.2.1. Critérios de inclusão:

- Serem considerados saudáveis, sem doenças de base, comprometimentos imunes graves ou infecções crônicas.
- Livres de doença que pudessem afetar a imunogenicidade.
- Nunca terem sido vacinados contra hepatite B.
- Ausência de utilização nos últimos três meses de imunoglobulina intravenosa ou transfusões de sangue ou plasma.
- Ter domicílio em localidade que permita o acompanhamento adequado durante toda a duração do estudo, de acordo com as peculiaridades de cada local de estudo.

5.2.2. Critérios de exclusão:

- Indivíduos que não preencham os critérios de inclusão.
- Indivíduos que não cumprirem o esquema vacinal de três doses, aplicadas de acordo com a orientação prevista neste protocolo.
- Os que não tenham sorologia dos tempos TC₀ (triagem sorológica pré-vacinal) e TC₉ (sorologia após término do esquema).
- Os que apresentarem doença grave, que possa afetar a imunidade, durante o período de estudo.

5.3. Protocolo de vacinação:

As vacinas utilizadas neste estudo foram as seguintes:

- Vacina Butang[®], lote 0004068/A, data de validade: 25/02/2002 (1^a e 2^a doses).
- Vacina Butang[®], lote 0105081, data de validade: 25/02/2002 (3^a dose).
- Vacina Engerix-B[®], lote ENG3364AI, data de validade: 31/03/2003 (1^a, 2^a e 3^a doses).

As vacinas foram armazenadas em geladeiras próprias para armazenamento de vacinas, sendo mantidas entre 2°C e 8°C, evitando-se o congelamento.

Após consentimento livre e informado, os participantes foram alocados sistematicamente em dois grupos, segundo o mês de nascimento. As vacinas Butang[®] e Engerix-B[®] foram codificadas com as letras A e T, respectivamente. Assim, as crianças nascidas nos meses pares foram vacinadas com 3 doses de 10 µg/ml da vacina A e as nascidas nos meses ímpares foram vacinadas com 3 doses de 10 µg/ml da vacina T, em esquema de 0, 1 e 7 meses, por via intra-muscular, na região deltóide. Desta forma, têm-se três tempos de vacinação: 1^a dose, 2^a dose (administrada um mês após a primeira) e 3^a dose (administrada seis meses após a primeira).

Amostras de sangue foram coletadas no período de junho/2001 e agosto/2002, ocorrendo em dois tempos: anteriormente à 1^a dose da vacina e 28-100 dias (aproximadamente 1 a 3 meses) após a última dose, de forma a permitir a resposta ideal do sistema imune.

5.4. Testes laboratoriais:

5.4.1. Sorologia pré-vacinal

As amostras inicialmente reativas ou indeterminadas foram retestadas em duplicata. O resultado final foi pela concordância de, pelo menos, 2 das 3 replicatas.

5.4.1.1. HBsAg

O teste foi realizado com o ensaio imunoenzimático comercial Hepanostika HBsAg Uni-Form II (BioMerieux, França), lote 01070301, data de validade: 12/2002.

- **Princípio do teste:**

Este teste é um ensaio imunoenzimático (ELISA) baseado no princípio do “sanduíche”. As cavidades da microplacas são sensibilizadas com anti-HBs monoclonal de camundongo e contém uma esfera de conjugado contendo anticorpos anti-HBs de carneiro marcados com peroxidase (HRP). As amostras e controles são incubados nas cavidades. A esfera se dissolve e caso a amostra contenha HBsAg, haverá a formação um complexo anticorpo em fase sólida/HBsAg/anticorpo marcado. Após lavagem e incubação com o substrato tetrametilbenzidina (TMB), desenvolve-se uma coloração azul, que torna-se amarela com a adição de ácido sulfúrico. Na ausência do HBsAg, não ocorrerá aparecimento de cor. A intensidade da cor é medida em um leitor a 450 nm e 620 nm como referência.

5.4.1.2. Anti-HBc Total

O teste foi realizado com o Kit comercial Hepanostika anti-HBc Uni-Form (BioMerieux, França), lote 01080803, data de validade: 07/2003.

- **Princípio do teste:**

Este teste é um ensaio imunoenzimático (ELISA) baseado no princípio da inibição competitiva. As cavidades da microplacas são sensibilizadas com antígeno do core da hepatite B (HBcAg). Amostras, controles e anti-HBc humano marcado com peroxidase (HRP) são incubados nas cavidades. Caso a amostra não contenha anti-HBc, haverá a formação de um complexo antígeno em fase sólida/anticorpo marcado, formando uma intensa coloração após a adição do substrato TMB. Se amostra contiver anti-HBc, este competirá com o anticorpo marcado pelo antígeno

não ocorrendo o aparecimento de cor. A intensidade da cor é medida em um leitor a 450 nm.

5.4.1.3. Anti-HBs

O teste foi realizado com o Kit comercial Hepanostika anti-HBs New (BioMerieux, França), lote 0105040700F13-001, data de validade: 10/2002.

- **Princípio do teste:**

Este teste é um ensaio imunoenzimático (ELISA) baseado no princípio do indireto. As cavidades da microplacas são sensibilizadas com HBsAg, o antígeno de fase sólida. Amostras e controles são incubados e caso haja presença do anti-HBs este se ligará ao HBsAg. Posteriormente, adiciona-se o HBsAg marcado com peroxidase (HRP) como conjugado, formando o complexo antígeno em fase sólida/anti-HBs/antígeno marcado. Após lavagem e incubação com o substrato tetrametilbenzidina (TMB), desenvolve-se uma coloração azul, que torna-se amarela com a adição de ácido sulfúrico. Na ausência do anti-HBs não ocorrerá aparecimento de cor. A intensidade da cor é medida em um leitor a 450 nm.

5.4.2. Sorologia pós-vacinal

5.4.2.1. Anti-HBc Total

O teste foi realizado com o Kit comercial Hepanostika anti-HBc Uni-Form (BioMerieux, França), lote 01080803, data de validade: 07/2003 e lote 02011805, data de validade: 12/2003, cuja metodologia foi previamente descrita (item 5.4.1.2).

Este teste foi realizado de forma a evidenciar exposição ao HBV durante o estudo.

5.4.2.2. Quantificação do anti-HBs:

A dosagem quantitativa do anti-HBs foi realizada utilizando-se o ensaio imunoenzimático comercial automatizado Access® HBs Ab II (Beckman-Coulter).

- **Princípio do teste:**

Este teste é um ensaio imunoenzimático (ELISA) baseado no princípio indireto. A amostra é adicionada à cubeta de reação juntamente com antígeno de superfície (HBsAg) marcado com fosfatase alcalina como conjugado e partículas

paramagnéticas revestidas com HBsAg. A presença do anti-HBs na amostra, permite a formação de um complexo em fase sólida HBsAg marcado/anti-HBs/HBsAg sobre as partículas. A lavagem remove o material não ligado após a incubação. Em seguida, um substrato quimioluminescente (LumiPhos[®] 530) é adicionado e a luz gerada é medida pelo luminômetro.

A produção de fótons é proporcional ao teor do conjugado enzimático presente ao final da reação.

Neste ensaio, a determinação quantitativa dos títulos de anti-HBs em mUI/ml são obtidos através de uma curva de calibração de 6 pontos (0, 10, 20, 50, 150 e 500 mUI/ml). Os limites inferior e superior de detecção são definidos por 7 mUI/ml e 500 mUI/ml, respectivamente.

A imunogenicidade foi avaliada de acordo com os títulos de anti-HBs após a 3ª dose da vacina e sua derivada soroproteção, sendo considerados soroprotetidos indivíduos com títulos de anti-HBs maior ou igual a 10 mUI/ml.

As amostras que apresentaram títulos acima do limite de detecção, foram diluídas com soro humano negativo a 1/11 e 1/121, sendo o valor médio correspondente ao título final. As amostras com coeficiente de variação (CV) > 20% entre ambas as determinações foram novamente diluídas e retestadas.

As amostras com títulos inferiores a 500mUI/ml na diluição a 1/11 foram diluídas a 1/2, 1/4 e assim sucessivamente. Já as amostras com títulos superiores a 500 mUI/ml na diluição 1/11 foram diluídas a 1/242, 1/484 e assim sucessivamente até obtenção do “end-point”.

Critérios para avaliação da soroproteção: Os indivíduos com títulos de anti-HBs superiores a 10 mUI/ml foram considerados soroprotetidos.

Controle de Qualidade:

- Em todas as corridas foram utilizados dois controles de qualidade, sendo um interno e um do fabricante (Access[®] HBsAb II QC). O controle interno (Ep121833) foi disponibilizado pelo Instituto Evandro Chagas (IEC, Belém, PA), sendo testadas em triplicata, a cada corrida.
- O soro humano negativo foi produzido através da recalcificação de bolsas de plasma, utilizando uma solução de cloreto de cálcio.
- Cerca de 20% das amostras foram enviadas ao Instituto Evandro Chagas para realização de uma retestagem cruzada.

5.5. Teste comparativo entre metodologias para quantificação do anti-HBs.

5.5.1. Amostragem.

Dentre as amostras utilizadas para verificação da imunogenicidade da vacina Butang, foram selecionadas cerca de 25% (163 amostras), de acordo com o volume de soro disponível para realização dos outros dois ensaios.

5.5.2. IMx AUSAB (Abbott Laboratories)

O teste IMx AUSAB é um ensaio imunoenzimático de micropartículas (MEIA) automatizado para determinação qualitativa e quantitativa do anti-HBs. Este ensaio utiliza micropartículas sensibilizadas como fase sólida.

A amostra e micropartículas revestidas com HBsAg recombinante são combinadas. Quando anti-HBs estiver presente, forma-se o complexo antígeno/anticorpo. Em seguida, o conjugado é adicionado, se ligando ao complexo. O conjugado catalisa a remoção de um fosfato do substrato, produzindo um produto fluorescente. Essa luz será medida na curva de calibração através de um espectro fotômetro.

A concentração de anti-HBs é determinada por uma curva padrão de 6 pontos (0, 10, 50, 100, 500 e 1000 mUI/ml), analisados em duplicata. Uma nova calibração é realizada após cada troca de número de lote. As amostras com títulos superiores a 1000 mUI/ml foram diluídas a 1/11, 1/121 e assim sucessivamente, como descrito anteriormente para o equipamento Access, e retestadas.

5.5.2.2. ETI-AB-AUK-3 (Diasorin)

O ETI-AB-AUK-3 (anti-HBs) é um método baseado na técnica do ELISA para determinação qualitativa e quantitativa do anti-HBs. Este é um ensaio direto, “sanduíche”, não competitivo. Os orifícios das tiras microelisa são sensibilizadas com HBsAg humano, em seguida é adicionado a amostra ou calibrador. A presença do anti-HBs permite que o traçador enzimático (HBsAg humano conjugado com peroxidase) se ligue à fase sólida. A adição de um cromógeno/substrato produz uma coloração que é proporcional à concentração de anti-HBs presente e é medida através de um fotômetro.

A concentração de anti-HBs é determinada por uma curva padrão de 5 pontos (0, 10, 100, 500 e 1000 mUI/ml. Uma nova curva é obtida após cada corrida

realizada. As amostras com títulos superiores a 1000 mUI/ml foram diluídas, como descrito anteriormente para os demais testes (Access e IMx), e retestadas.

6.0. Análise Estatística

Após a análise de estudos semelhantes realizados previamente em recém-nascidos e crianças (Assad & Francis, 2000; Motta et al, 2002), estabeleceu-se a inclusão de 700 participantes, sendo 350 indivíduos para cada braço do estudo, a partir da prevalência observada nesses projetos.

Inicialmente, os dados foram armazenados no programa Access 2000 e em seguida convertido para o programa SPSS v.11 para realização da análise estatística, com colaboração do Dr. Luiz Antônio Bastos Camacho (ENSP, FIOCRUZ) e do Sr. Emídio Cavalcanti de Albuquerque (Instituto Materno-Infantil de Pernambuco, PE).

Realizou-se uma análise exploratória dos dados da amostragem, através da distribuição de frequência e medidas de tendência central e dispersão, de forma a confirmar o sucesso da randomização das amostras iniciais e do grupo com protocolo completo.

Estabeleceu-se uma diferença de 5 pontos percentuais para definir a equivalência entre as vacinas Butang[®] e Engerix B[®], com um intervalo de confiança de 90%. A superioridade da vacina Engerix-B[®] seria rejeitada quando o limite inferior do intervalo de confiança não fosse menor que -5.

A razão dos títulos médios geométricos (TMG) após a 3^a dose foi definida como equivalente quando intervalo de confiança inferior de TMG (Butang)/ TMG Engerix B fosse superior a 0,67.

Para análise dos resultados obtidos para o estudo comparativo entre diferentes metodologias, utilizou-se o programa SPSS v.13. para análise de regressão linear e correlação bivariada, de forma a determinar a equivalência entre as metodologias, com colaboração do Dr. Luís Antônio Bastos Camacho.

Para análise da correlação linear entre os testes transformou-se os resultados para logaritmo neperiano, o que é importante para os testes estatísticos, tornando a distribuição mais homogênea, reduzindo a assimetria da distribuição e a influência de valores extremos. Pelo fato do valor zero não apresentar logaritmo, todos foram substituídos pelo valor 1, permitindo a conversão.

7.0. Resultados

7.1. Avaliação da Imunogenicidade da Vacina Butang

7.1.1. População Estudada

Devido problemas sociais decorridos na comunidade participante, houve uma pequena redução no número de crianças recrutadas, num total de 651 amostras selecionadas após consentimento informado. Dentre elas, seis foram excluídas por não terem feito qualquer dose da vacina ou por terem feito qualquer dose da vacina em posto de saúde.

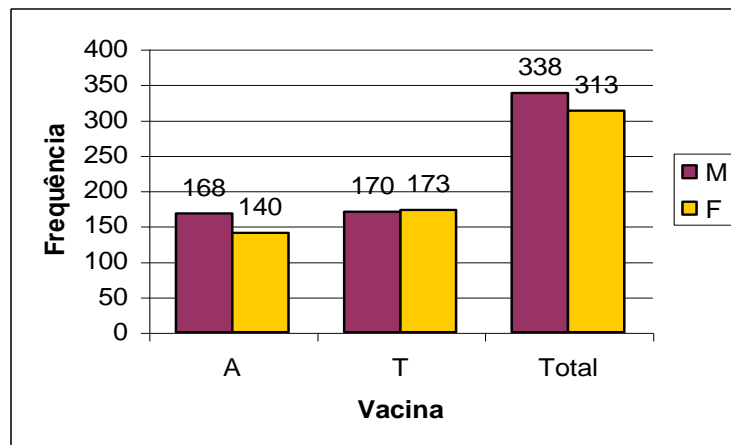
Houve uma quebra de protocolo, onde foram incluídas duas crianças com menos de 1 ano de idade e sete crianças com 11 anos de idade, que por serem ainda consideradas crianças foram mantidas no estudo (Tabela 3). O maior número de crianças recrutadas encontra-se na faixa entre 3 e 10 anos de idade .

Observou-se um número maior de crianças do sexo masculino (168/338) no grupo alocado para vacinação com a vacina Butang® e um pequeno predomínio do sexo feminino (173/313) no grupo para vacinação com a Engerix-B® (Gráfico 1).

Tabela 3: Distribuição da população recrutada, segundo faixa etária.

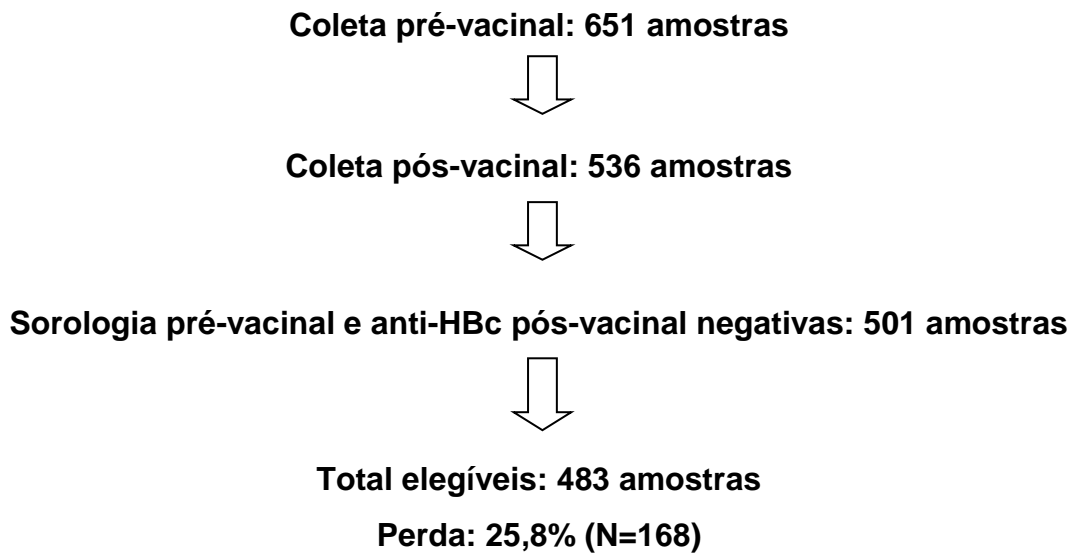
Idade	Frequência	Prevalência (%)
<1	2	0,3
1-2	17	2,6
3-4	151	23
5-6	180	27,7
7-8	179	27,6
9-10	115	17,7
>10	7	1,1
Total	651	100

Gráfico 1: Distribuição da vacinação de acordo com o sexo.



Após a vacinação, foram coletadas 536 (82,2%) amostras para realização da quantificação do anti-HBs e dentre eles 483 (74%) foram consideradas como protocolo completo (esquema 2).

Esquema 2: Variação da amostragem no decorrer do projeto.



7.2. Sorologia para marcadores do HBV

7.2.1. Prevalência de marcadores sorológicos da infecção pelo HBV.

Das 651 amostras testadas, 92,9% (602/651) eram negativas para todos os marcadores e 6,2% (40/651) apresentaram positividade para qualquer marcador do HBV.

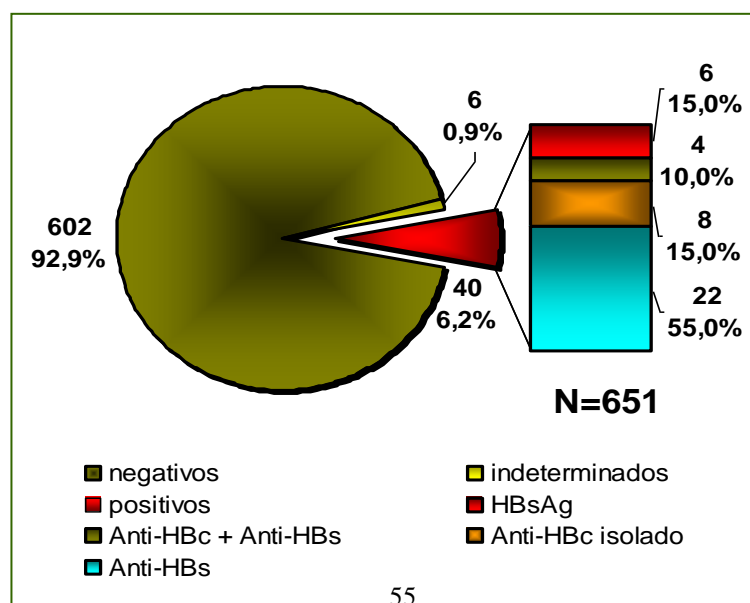
Em relação às amostras com marcador positivo para HBV, a prevalência de HBsAg encontrada foi da ordem de 15% (6/40), de anti-HBc total isolado de 20% (8/40) e de anti-HBs como único marcador de 55% (22/40), indicando vacinação prévia. Em 10% (4/40) das amostras, observou-se anti-HBc total e anti-HBs positivos indicando infecção prévia com evolução para cura (Tabela 4).

Amostras com resultados indeterminados foram da ordem de 0,9% (6/651) (Gráfico 2).

Tabela 4: Prevalência dos marcadores do HBV nas amostras positivas.

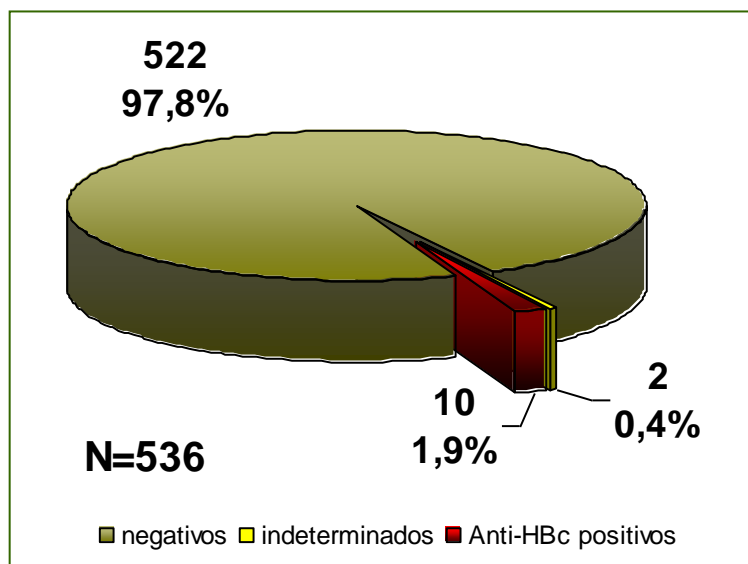
Marcador	Frequência	Prevalência (%)
HBsAg	6	15
anti-HBc isolado	8	20
anti-HBc + anti-HBs	4	10
anti-HBs isolado	22	55
<i>Total</i>	<i>40</i>	<i>100</i>

Gráfico 2: Marcadores do HBV, pré-vacinação.



Nas 536 amostras coletadas para quantificação do anti-HBs foi realizada sorologia para anti-HBc total, de forma a indicar contato com o HBV durante o estudo. 1,9% (10/536) das amostras eram anti-HBc positivas, enquanto 97,8% (522/536) apresentaram sorologia negativa para este mesmo marcador. Amostras com resultados indeterminados foram da ordem de 0,4% (Gráfico 3).

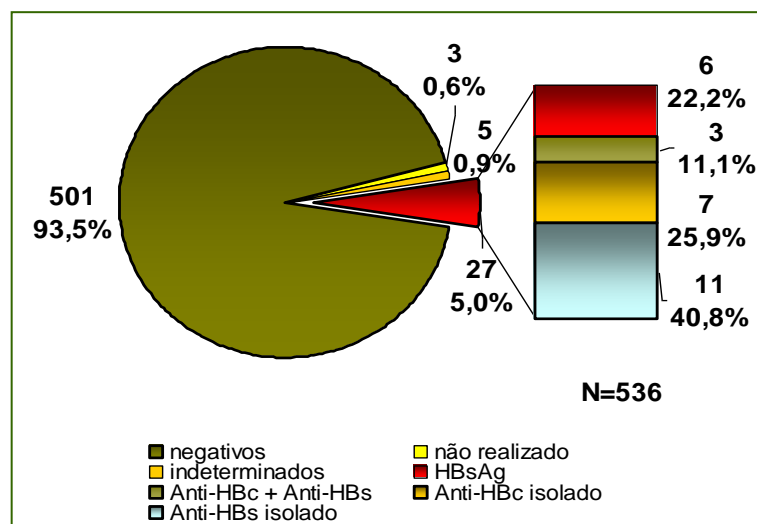
Gráfico 3: Marcadores do HBV, pós-vacinação.



Após cruzamento dos resultados obtidos nas coletas pré e pós vacinais, observou-se o seguinte perfil sorológico, na população das crianças estudadas:

Amostras negativas para todos os marcadores do HBV foram da ordem de 93,5% (501/536); 5% (27/536) apresentaram sorologia positiva para qualquer marcador; 0,9% (5/536) apresentaram sorologia indeterminada e em 0,6% (3/536) não foi possível realizar a sorologia. Dentre as amostras positivas, 22,2% (6/27) foram HBsAg positivas, 11,1% (3/27) apresentaram positividade para anti-HBc total e anti-HBs, 25,9% (7/27) apresentaram anti-HBc isolado e 40,8% (11/27) apresentaram anti-HBs como único marcador (Gráfico 4).

Gráfico 4: Perfil sorológico, cruzamento de dados.



7.2.2. Quantificação do anti-HBs

Após a realização da sorologia pós-vacinal, iniciou-se a quantificação de anti-HBs nas 536 amostras coletadas, independente do resultado da sorologia, para avaliação da resposta vacinal.

A frequência de resposta vacinal segundo os títulos de anti-HBs encontra-se descrito na tabela 5. A frequência de amostras com título inferiores à 10 mUI/ml foi da ordem de 2,6% (14/536), entre 10 -100 foi da ordem de 4,1% (22/536) e superior a 100 foi da ordem de 93,3% (500/536).

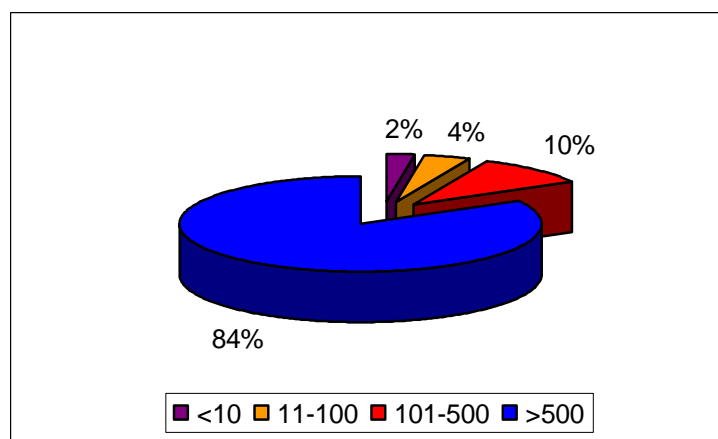
Tabela 5: Frequência de resposta vacinal, segundo título de anti-HBs.

anti-HBs (mUI/ml)	N	%
<10	14	2,6
10-100	22	4,1
>101	500	93,3
<i>Total</i>	<i>536</i>	<i>100</i>

Das 536 amostras testadas, 35 foram excluídas (tabela 6) por apresentarem sorologia positiva na coleta pré e pós-vacinal, desta forma 501 (93,5%) amostras foram consideradas para análise da imunogenicidade da vacina em questão.

Dentre as 501 crianças, 12 (2,0%) foram de não respondedores, ou seja, com títulos inferiores a 10 mUI/ml; 22 (4,0%) apresentaram títulos entre 11 e 100 mUI/ml; 51 (10,0%) entre 101 e 500 mUI/ml e 416 (84,0%) apresentaram títulos superiores a 500 mUI/ml (gráfico 5).

Gráfico 5: Frequência de resposta vacinal entre crianças, segundo a concentração de anti-HBs.



Após análise dos critérios de exclusão, previamente estabelecidos, 483 amostras foram consideradas como protocolo completo, sendo 219 (45,3%) de crianças vacinadas com a Vacina Butang[®] e 264 (54,7%) com a Vacina Engerix-B[®]. Os resultados encontram-se descritos na tabela 6.

Todas as crianças (100%) imunizadas com a vacina Butang[®] apresentaram soroconversão, sendo o TMG da ordem de 3600 mUI/ml. Com a vacina Engerix-B[®], a taxa de soroconversão foi de 97,7% e o TMG da ordem de 2761 mUI/ml. A diferença de soroproteção de 2,3% e a razão dos TMGs de 1,3 demonstram que há equivalência entre as vacinas investigadas.

Tabela 6: Soroproteção e TMG obtidos após vacinação.

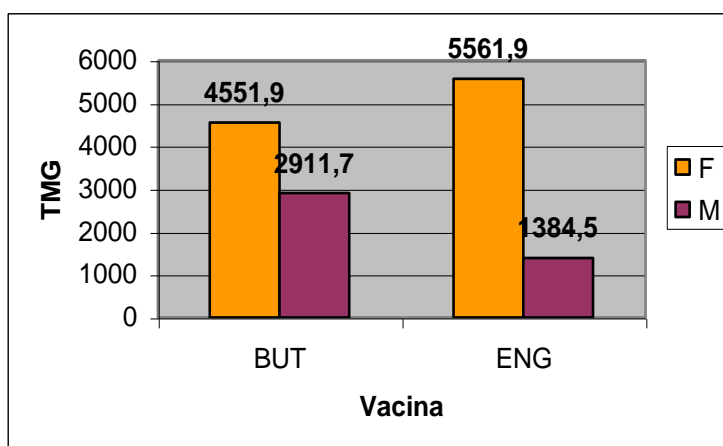
Vacina	N	%Pos	TMG(mUI/ml)	Diferença %SP*	Razão TMG**
Butang (A)	219	100	3600	2,3 (0,3 a 4,2)	1,3 (0,94 a1,81)
Engerix-B (T)	264	97,7	2761		

*% e IC 90%

**Razão e IC90%

O gráfico 6 demonstra as diferenças de TMGs de acordo com o sexo. O TMG obtido entre as crianças do sexo masculino imunizados com a Vacina Butang® e Engerix-B® foi da ordem de 2911,7 e 1384,5, respectivamente e entre as crianças do sexo feminino foi da ordem de 4551,9 e 5561,9.

Gráfico 6: Título Médio Geométrico (TMG) de acordo com o sexo



7.3. Estudo comparativo entre diferentes metodologias.

Para realização deste estudo comparativo, foram utilizadas 163 amostras de acordo com o volume disponível. As amostras foram submetidas à quantificação de anti-HBs, utilizando os ensaios imunoenzimáticos: Access® AbHBs II (Beckman-Coulter), IMx AUSAB (Abbott Laboratories) e ETI-AB-AUK-3 (Diasorin).

A frequência de títulos segundo as metodologias avaliadas, encontra-se apresentada na tabela 7. A maior frequência de não respondedores foi encontrada com o teste da Diasorin (10,4%), seguida por Access (9,8%) e IMx (8,6%). Na faixa de 10 a 100 mUI/ml, o teste da Diasorin apresentou a maior frequência (16%) frente aos demais (Access, 11% e IMx, 8,6%). Finalmente, nas amostras com títulos acima de 100 mUI/ml, a maior frequência observada foi no IMx (82,8%), seguida do Access (79,2%) e Diasorin (73,6%).

Tabela 7: Títulos de anti-HBs em diferentes metodologias

Títulos (mUI/ml)	Access		IMx		Diasorin	
	N	%	N	%	N	%
<10	16	9,8	14	8,6	17	10,4
10-100	18	11	14	8,6	26	16
>100	129	79,2	135	82,8	120	73,6
Total	163	100	163	100	163	100

A tabela 8 mostra as principais características e diferenças operacionais e técnicas (metodologia, número de testes, custo, sensibilidade, especificidade, etc) entre as metodologias utilizadas para comparação neste estudo.

Já a tabela 9 descreve parâmetros de adequação para pequenos laboratórios, demonstrando fatores que permitem sua utilização no local especificado.

Tabela 8: Características operacionais e técnicas das três metodologias

1. Características gerais e aspectos operacionais

	Access	IMx	Diasorin
Empresa	Beckman-Coulter, EUA	Abbott Laboratories, EUA	Diasorin, Itália
Tipo de ensaio	Quimioluminescência	MEIA (Microparticle enzyme immunoassay)	EIA não-competitivo
Fase sólida	Partículas paramagnéticas	Micropartículas sensibilizadas	Tiras sensibilizadas(HBsAg)
Antígeno	HBsAg (ad e ay)	HBsAg (ad e ay)	HBsAg (ad e ay)
Amostras	Soro (preferencialmente)	Soro ou plasma	Soro ou plasma
Número de testes/ kit	100	100	96
Lotes avaliados	193130/293132	00825600	923090B/9230410B
Estabilidade (°C)	2-10°C	2-8°C	2-8°C
Volume de soro necessário (ul)	135	210	100
Tempo total para realização do ensaio	45 min	40 min	3h30min
Leitura	luminômetro	fotômetro	fotômetro
Preço/teste (US\$)	13,8	17,5	2,6
Número de soros por corrida (mínimo-máximo)	1-60	1-21	1-96
Número de controles por teste			
Negativo	1	1	1
Positivo	1	1	4

2. Características técnicas

	Access	IMx	Diasorin
Limite de detecção	7-500 mUI/ml	10-1000 mUI/ml	10-1000
Número de calibradores	6 (0,10,20,50,150 e 500)	6 (0,10,50,100,500 e 1000)	5 (0,10,100, 500 e 1000)
Sensibilidade (%)	99,8%	99,7%	99,6%
Especificidade (%)	99,7%	99,4%	99,8%
Reprodutibilidade (%)	CV<12%	CV<10%	CV<16%

Tabela 9: Adequação para pequenos laboratórios

Nome	Pontos	Access	IMx	Diasorin
Sensibilidade 100% 98-99% <98%	5 3 0	3	3	3
Especificidade 100% 95-99% <95%	5 3 0	3	3	3
Temperatura de incubação Ambiente Outra	3 1	1	1	1
Validade >1 ano 1-6 meses <6meses	3 2 1	3	3	3
Condições de estoque Ambiente (kit aberto) Ambiente (kit fechado) 2-8°C	5 2 1	1	1	1
Preço por teste (US\$) <5,0 5,0-10,0 >10,0	3 2 1	1	1	3
Facilidade de operação Muito fácil Fácil Razoável	5 3 1	3	3	5
Tempo de corrida <1 hora 1-3 horas >3 horas	3 2 1	3	3	1
Washer/agitador Não necessário Necessário	3 1	3	3	3

Leitura Visual Leitor do equipamento	5 1	1	1	1
Total		22	22	24
Adequação para pequenos laboratórios Menos adequado <23 Adequado 23-30 Muito adequado >30		Menos adequado	Menos adequado	Adequado

Para proceder à análise de concordância entre os testes, os títulos foram convertidos em logaritmo neperiano, visando normalizar a distribuição, como pode-se observar nos gráficos 7 a 12.

Gráfico 7: Frequência dos títulos de anti-HBs (Access) em mUI/ml.

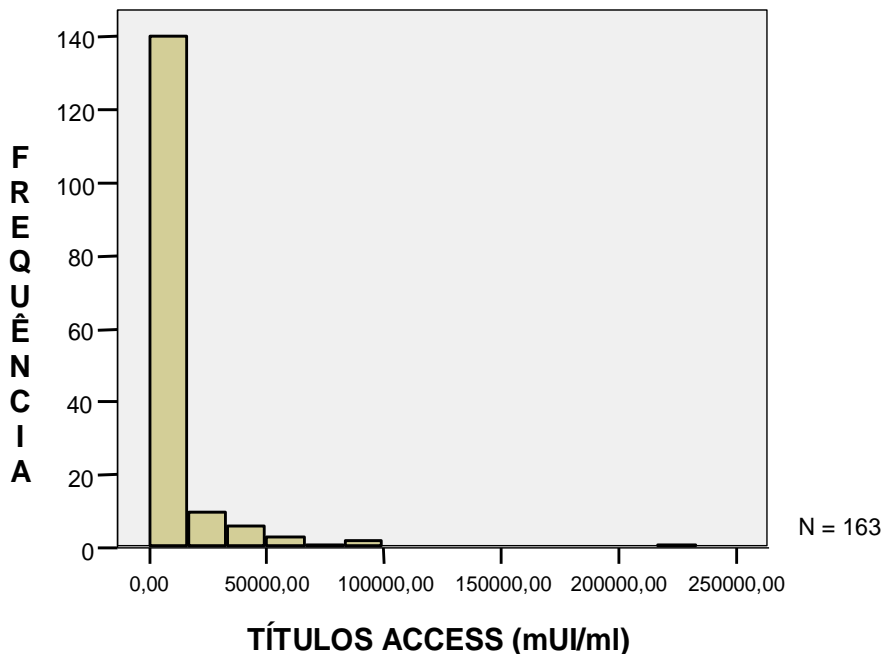


Gráfico 8: Títulos de anti-HBs transformados em logaritmos (laccess).

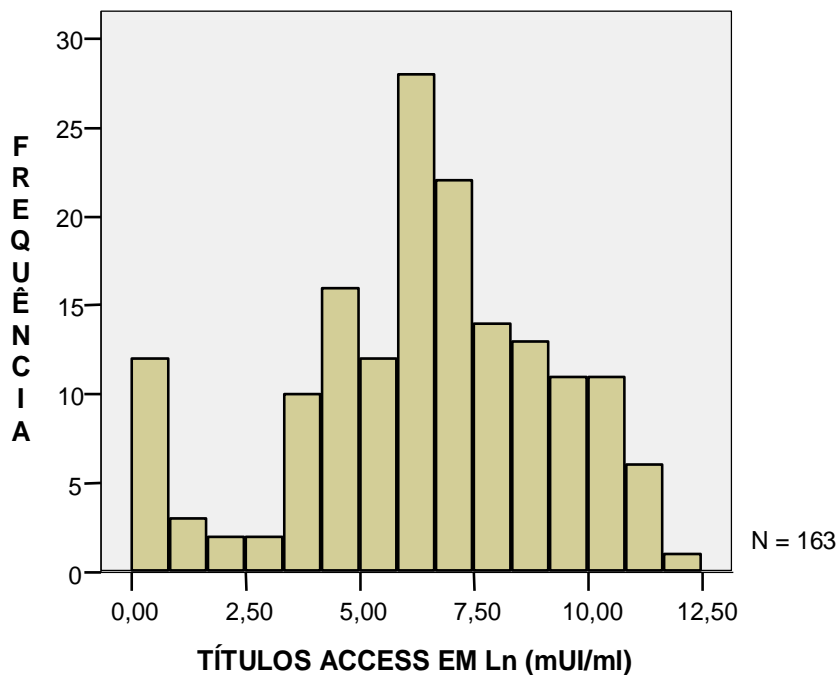


Gráfico 9: Frequência dos títulos de anti-HBs (IMx) em mUI/ml.

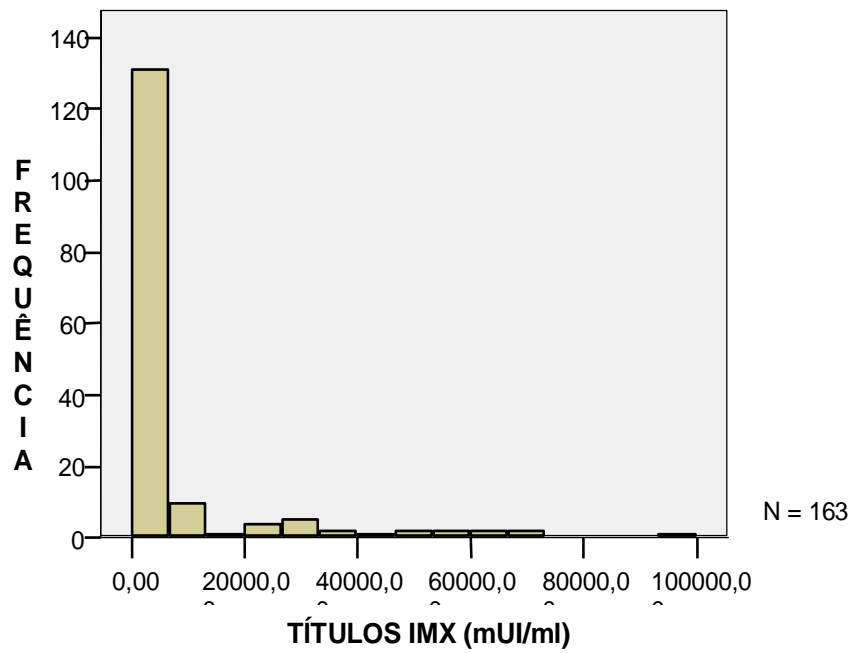


Gráfico 10: Títulos de anti-HBs transformados em logaritmos (liMx).

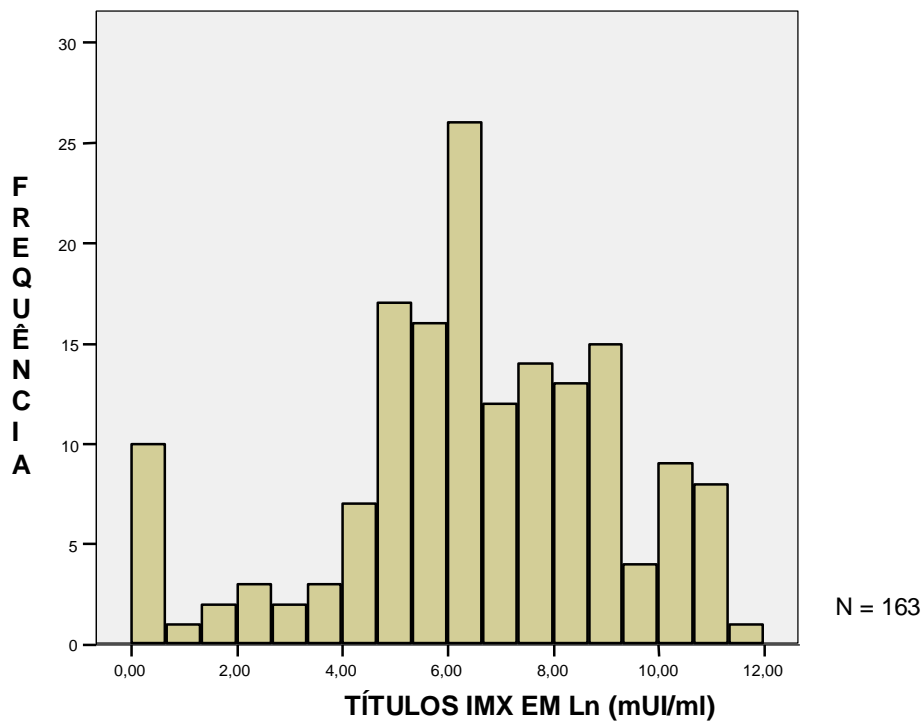


Gráfico 11: Frequência dos títulos de anti-HBs (Diasorin) em mUI/ml.

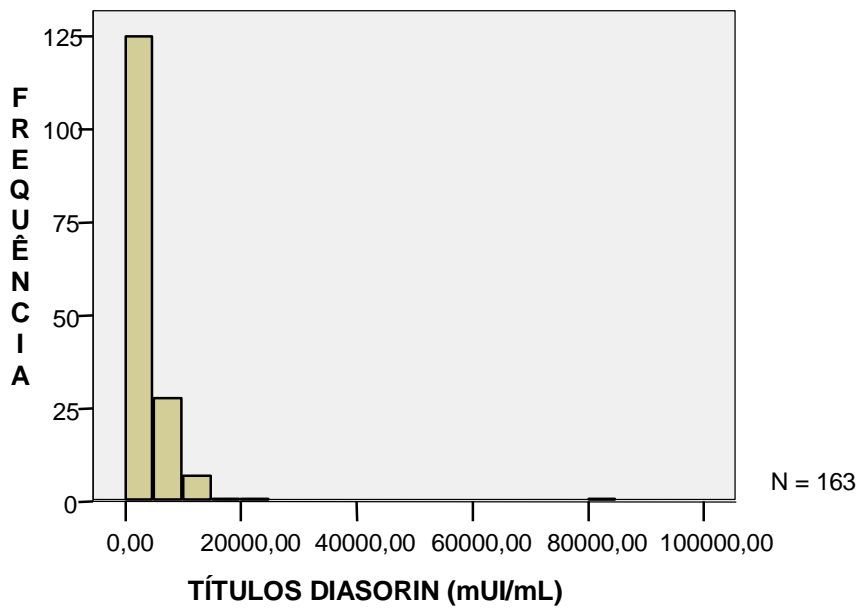
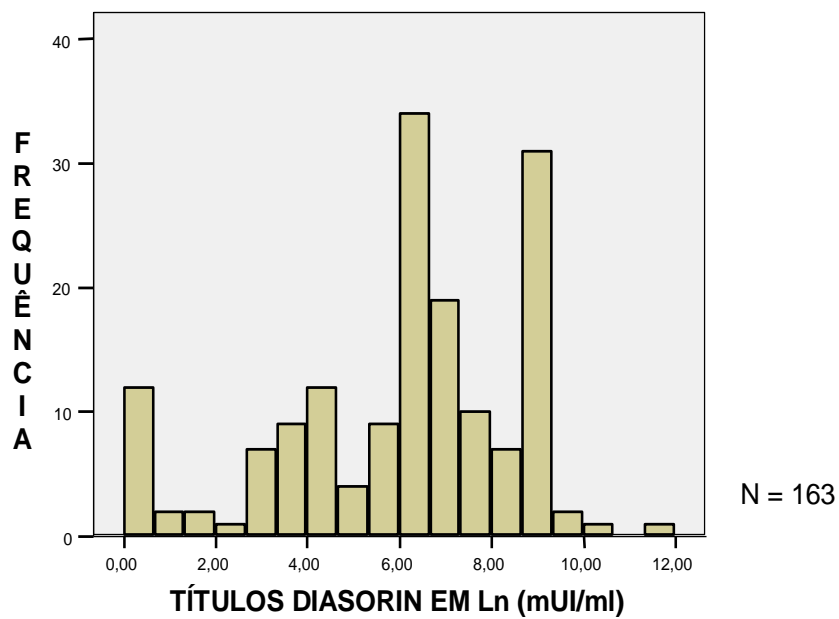


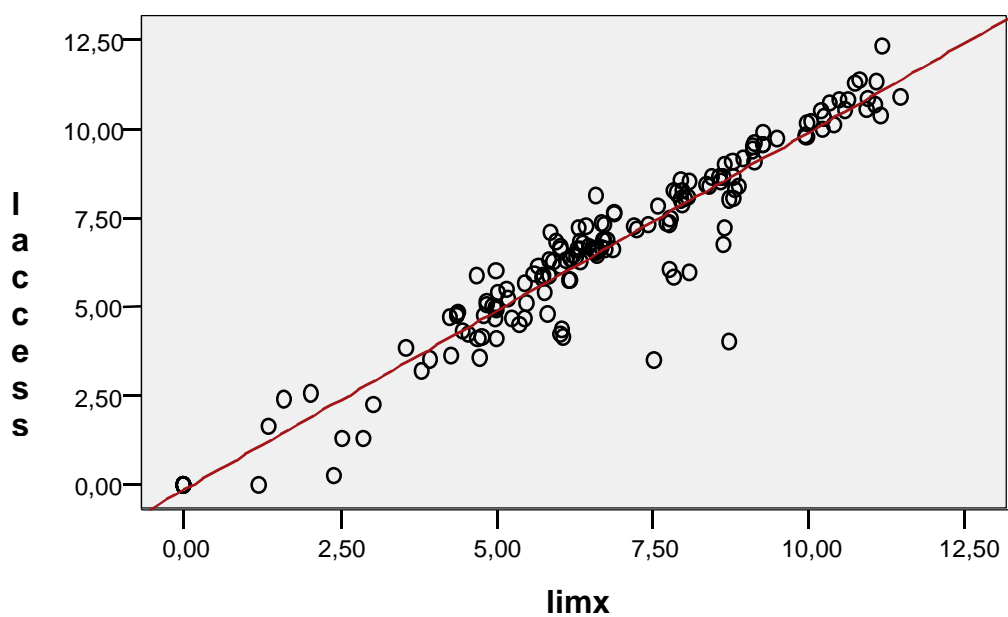
Gráfico 12: Títulos de anti-HBs transformados em logaritmos (Idiasorin).



Apesar das pequenas discrepâncias observadas, foi encontrada uma forte correlação linear ($p < 0,01$) entre as três metodologias (gráficos 13 a 15).

Já com relação à concordância e correlação entre eles, temos um coeficiente de correlação de Pearson igual a 0,960 ($R = 0,960$) entre Access e IMx, indicando uma forte correlação entre eles. O que me permite considerar estas metodologias equivalentes e efetivas. Os valores obtidos em cada espécime nos dois testes, eram em geral bastante próximos.

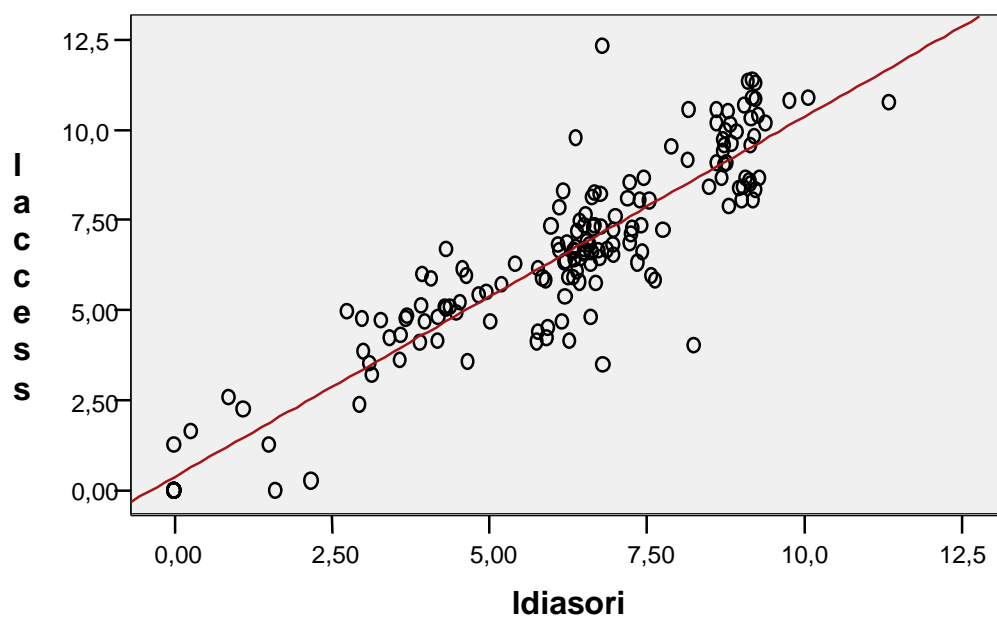
Gráfico 13: Correlação linear entre títulos de anti-HBs com as metodologias Access e IMx



O gráfico 14 mostra os resultados de anti-HBs pelos métodos Access e Diasorin, demonstrando uma forte correlação linear entre eles ($p < 0,01$).

Já com relação à concordância e correlação entre eles, temos um coeficiente de correlação de Pearson igual a 0,913, indicando uma forte correlação entre eles, sendo então extremamente significativo. O que me permite considerar estas metodologias equivalentes e efetivas.

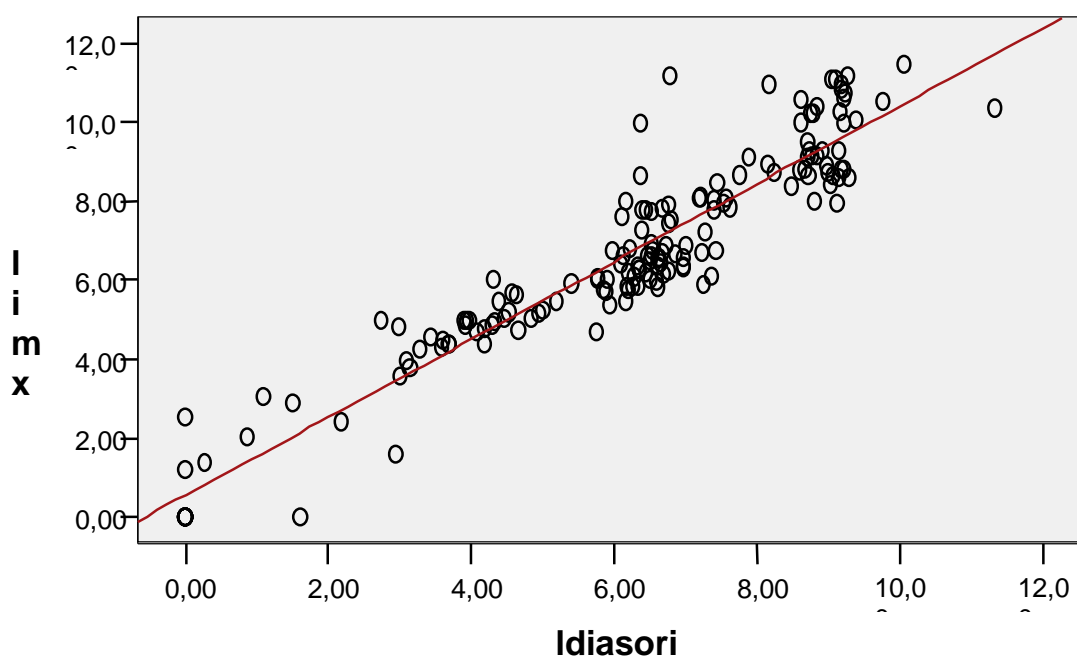
Gráfico 14: Correlação linear entre títulos de anti-HBs com as metodologias Access e Diasorin



O gráfico 15 mostra os resultados de anti-HBs pelos métodos IMx e Diasorin, demonstrando uma forte correlação linear entre eles ($p < 0,01$).

Já com relação à concordância e correlação entre eles, temos um coeficiente de correlação de Pearson igual a 0,943 ($R = 0,943$), indicando uma forte correlação entre eles, sendo então extremamente significativo. O que me permite considerar estas metodologias equivalentes e efetivas.

Gráfico 15: Correlação linear entre títulos de anti-HBs com as metodologias IMx e Diasorin



Considerando-se a vacina utilizada (Butang[®] ou Engerix-B[®]), a correlação linear entre as diferentes metodologias também foi estatisticamente significativa ($p < 0,01$), conforme pode ser observado nos gráficos 16 a 21.

Na análise feita entre Access e IMx, os coeficientes de correlação foram 0,880 e 0,939 para as vacinas Butang[®] e Engerix-B[®], respectivamente, confirmando a forte correlação entre as metodologias.

Gráfico 16: Anti-HBs após vacinação com Butang, em Access e IMx.

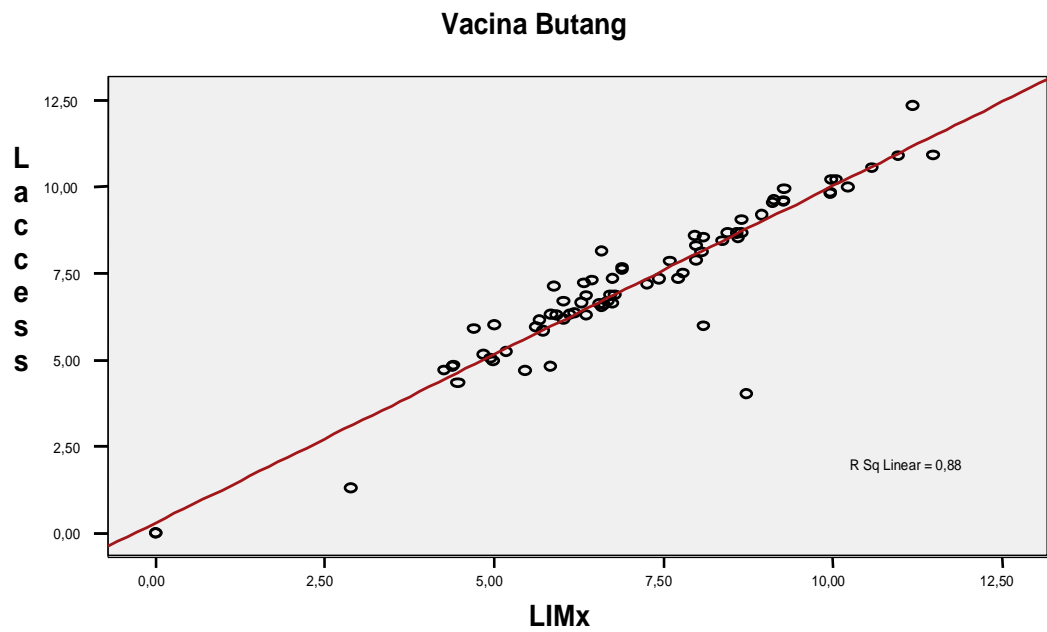
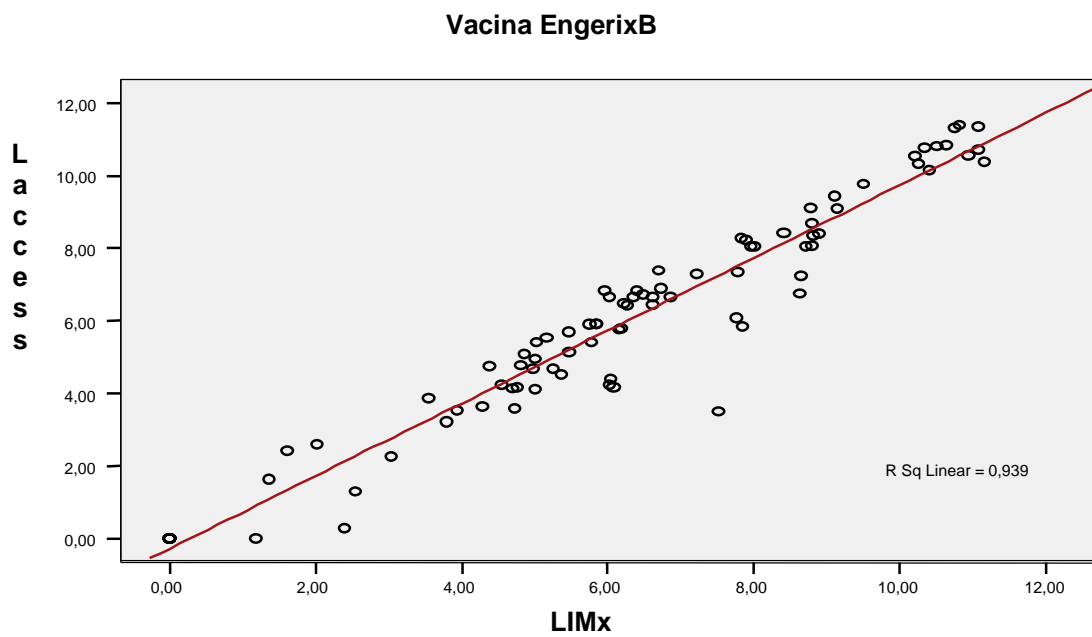


Gráfico 17: Anti-HBs após vacinação com Engerix B, em Access e IMx.



Os gráficos 18 e 19, mostram os títulos de anti-HBs com as Vacinas Butang® e Engerix -B® obtidos em Access e Diasorin.

Os coeficientes de correlação foram 0,703 e 0,889 para as vacinas, respectivamente, confirmando a boa correlação entre as metodologias ($p < 0,01$).

Gráfico 18: Anti-HBs após vacinação com Butang, em Access e Diasorin.

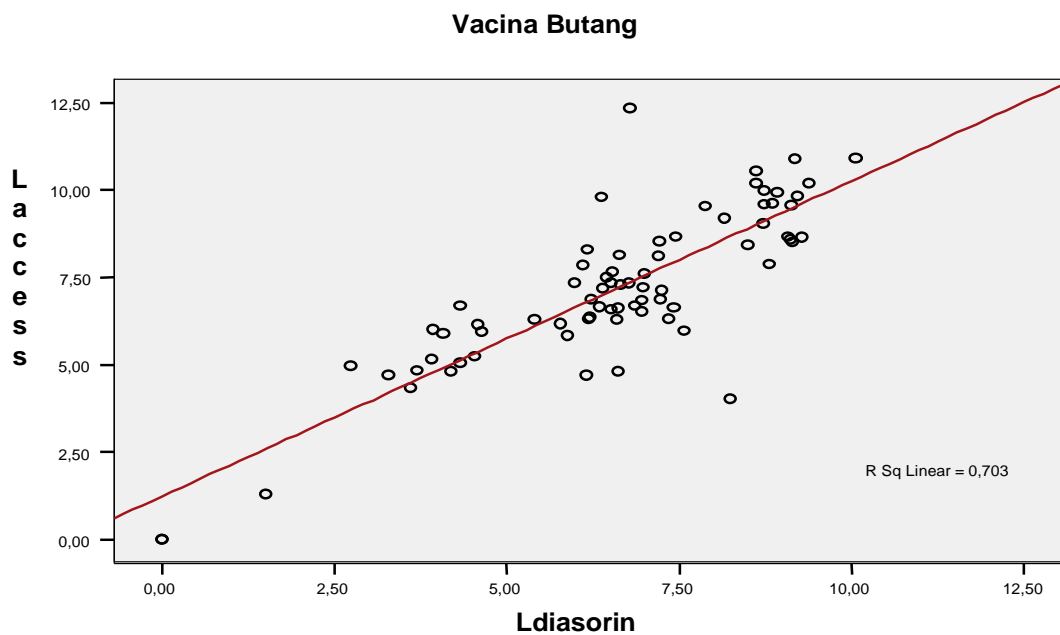
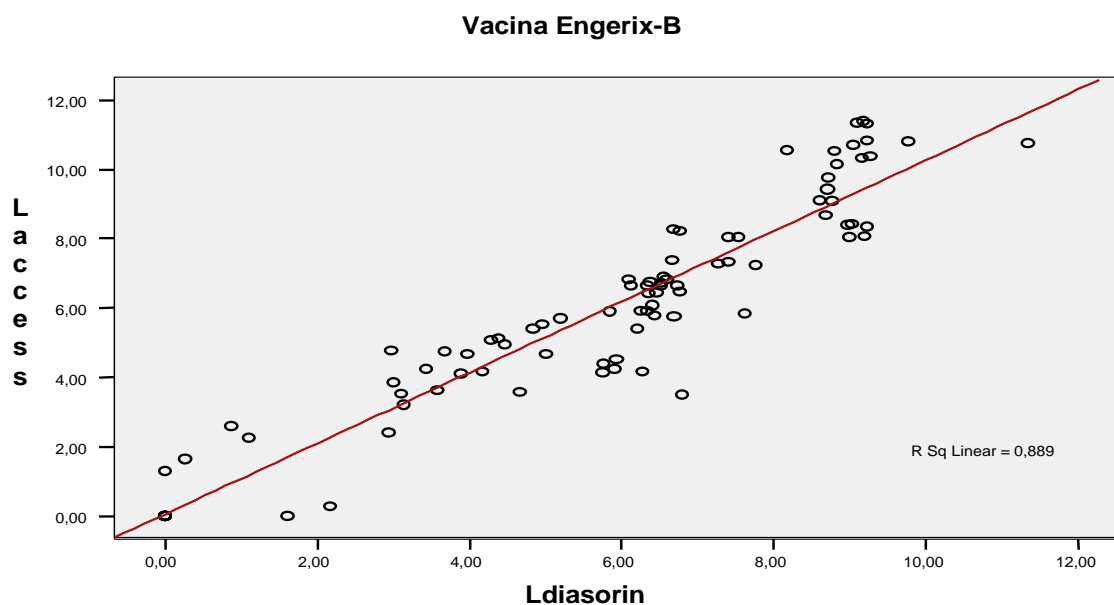


Gráfico 19: Anti-HBs após vacinação com Engerix B, em Access e Diasorin.



Os gráficos 20 e 21, mostram os títulos de anti-HBs com as Vacinas Butang® e Engerix-B® obtidos em IMx e Diasorin.

Os coeficientes de correlação foram 0,800 e 0,924 para as vacinas, respectivamente, confirmando a forte correlação entre as metodologias ($p < 0,01$).

Gráfico 20: Anti-HBs após vacinação com Butang, em IMx e Diasorin.

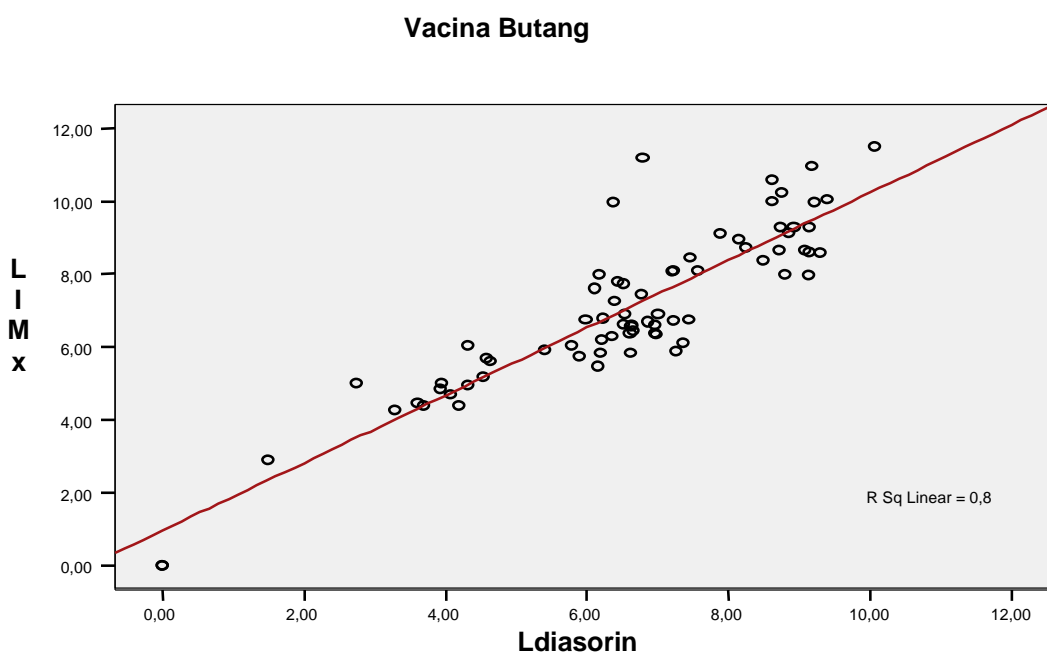
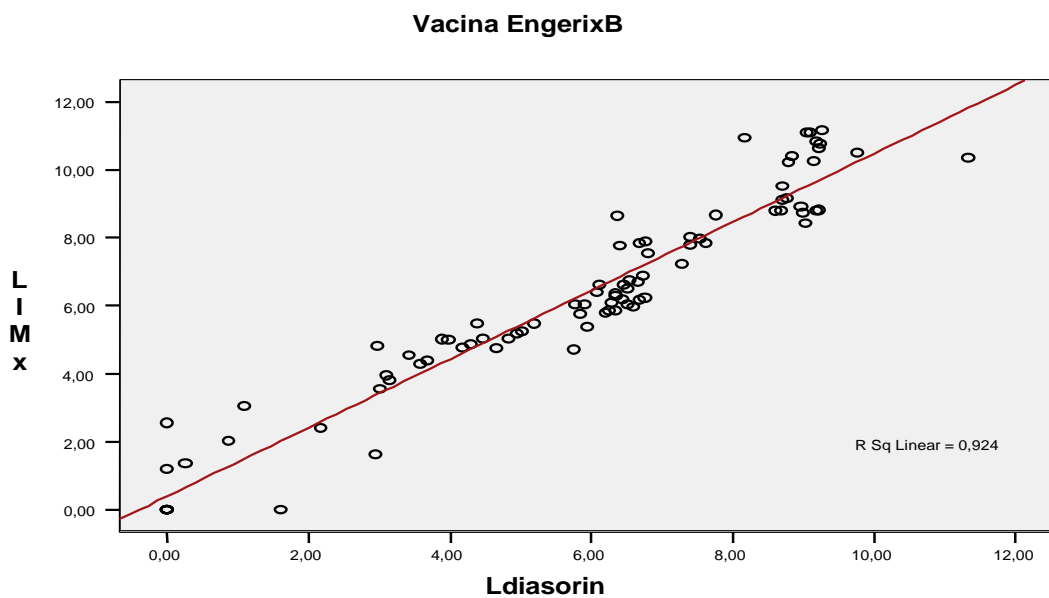


Gráfico 21: Anti-HBs após vacinação com Engerix B, em IMx e Diasorin.



8.0. Discussão

8.1. O problema da Hepatite B no Brasil e no mundo.

A hepatite B já era responsável, a séculos atrás, por grandes epidemias. No início do século XX foi a causa da morte de muitos soldados em guerra e indivíduos imunizados com vacinas contaminadas. Até hoje, mesmo com a produção de uma vacina altamente eficaz, a Hepatite B corresponde a um dos principais problemas de saúde pública no mundo, principalmente em países cuja endemicidade varia de intermediária a alta, como os africanos e asiáticos. O HBV seria a segunda principal causa de mortalidade devido a complicações posteriores como o câncer hepático (Maynard, 1990)

No mundo, estima-se que hajam 350 milhões de portadores crônicos, sendo que 2 milhões de indivíduos encontram-se no Brasil (Ministério da Saúde, 2004). Este, apresenta uma variação de prevalência em seu território, ocorrendo áreas de baixa prevalência, como parte da região sul até áreas de alta prevalência, como a região Amazônica (Souto, 1999).

Uma das principais preocupações nas regiões de alta endemicidade são as crianças, já que uma das principais formas de transmissão é a perinatal. Mesmo que a infecção não seja transmitida no parto, o risco ainda existe através da transmissão horizontal, principalmente até os 5 anos de idade. Esta faixa etária apresenta maior probabilidade de desenvolver a forma crônica (90-95%) e suas conseqüentes complicações, sendo na maioria dos casos assintomáticas, tornando-se um reservatório da infecção (MMWR 40, 1991).

O combate da hepatite B está relacionado às campanhas de prevenção e controle, vigilância epidemiológica e sanitária e assistência aos portadores garantindo o diagnóstico e tratamento destes indivíduos.

A vacinação é a principal forma de prevenção da hepatite B. A principal estratégia de eliminação está relacionada às crianças, vacinando recém-nascidos de mães portadoras, principalmente HBeAg positivas, vacinando as crianças rotineiramente, como acontece desde 1998 no Brasil, e indivíduos que são considerados de uma população de alto risco, criando desta forma uma futura população de adultos imunes ao HBV (Mast et al, 1998).

A primeira vacina licenciada era produzida com plasma proveniente de portadores do HBV. A purificação e inativação do HBV e outros possíveis agentes infecciosos presentes no sangue, apresentavam várias etapas que incluíam: digestão com pepsina e tratamento com formaldeído, de forma a assegurar o resultado final pretendido. Diversos estudos demonstravam que esta vacina apresentava uma imunogenicidade elevada, principalmente em recém-nascidos e crianças, com taxas de soroproteção variando de 80 a 100% (Hwang et al, 1983; Matsaniotis et al, 1985; Liu et al, 2000), sendo considerada a primeira vacina anti-câncer - Carcinoma Hepatocelular (CHC) (Krugman, 1982; Hilleman, 2000). Múltiplos fatores como alto custo, disponibilidade de plasma e receio em torno de uma vacina produzida com plasma humano, levou à níveis reduzidos de adesão à vacina.

A produção de uma vacina com engenharia genética e que era capaz de induzir altos níveis de soroproteção, foi um grande avanço na prevenção e controle da hepatite B. Inicialmente, a vacinação era prioridade em populações de risco, mas observou-se que não seria suficiente para reduzir a incidência da hepatite B de forma significativa. A partir daí deu-se maior ênfase às crianças, o que tem permitido controlar o avanço dos números desta infecção no mundo e talvez erradicar a doença daqui algumas décadas. A vacina para hepatite B ainda pode ser administrada juntamente com outras vacinas da infância, sem que haja interferência na imunogenicidade das outras e da própria.

Em países como Taiwan, a prevalência da hepatite B declinou de forma surpreendente, de 10% em 1984 para 1,3% em 1994 e 0,7% em 2003 após a inclusão da hepatite B no programa de vacinação, mostrando o potencial e a eficácia desta vacina (Chen et al, 1996; Broderick & Jonas, 2003).

No Brasil, a vacina é administrada regularmente desde 1998 segundo as normas da OMS através do EPI (Expanded Program on Immunization). Em 2003, a meta de vacinação do Ministério da Saúde era de 30,3 milhões/dose, sendo 3,3 milhões em crianças e 27 milhões entre 1 e 19 anos de idade, além de 600 mil indivíduos que estão incluídos em populações sob especial risco para esta infecção.

8.2. Características da população estudada.

A população estudada neste projeto foi recrutada em uma instituição chamada Educandário Social Lar de Frei Luís para crianças carentes, que passam o dia ou estão à espera de adoção. Seus respectivos responsáveis assinaram um consentimento livre e informado, de forma a permitir a sua participação. A faixa etária estudada geralmente apresenta altos níveis de resposta demonstrando o processo de maturação do sistema imune (Lee et al, 2003). Em países de alta endemicidade, como China por exemplo, a faixa etária escolhida (1 a 10 anos de idade), é de grande preocupação por apresentar níveis altos de prevalência: 12,9% em crianças de 1 a 5 anos de idade e 15,6% entre crianças de 6 a 10 anos de idade. Doganci e colaboradores obtiveram resultados semelhantes, onde entre 302 crianças, 68,2% dos casos foram diagnosticados entre crianças de 2 a 10 anos de idade. Estes dados são preocupantes, já que a maioria desta crianças estão em idade escolar e o contato entre elas é maior (Yeoh , 1990; Doganci et al, 2005).

Em 2002, 126 países haviam incorporado a vacina para hepatite B em seu programa infantil de imunizações, fato de extrema importância para prevenção e controle desta infecção. Em áreas de alta endemicidade, observou-se que a transmissão é reduzida de forma significativa a curto prazo após a implementação da vacinação em crianças (Andre, 2004; Basuni, 2004).

As crianças encontram-se muito expostas ao HBV, devido à grande possibilidade de transmissão através de mães portadoras e pela transmissão horizontal entre familiares e outras crianças, mantendo o reservatório da infecção. A infecção pode ser adquirida principalmente através de lesões na pele, compartilhamento de toalhas, escovas de dente e etc (Broderick & Jonas, 2003).

Estes fatores tornam a extensão da vacinação para indivíduos até 19 anos muito importante, pois imunizará aquelas crianças nascidas antes da obrigatoriedade das vacinas em recém-nascidos e que hoje se encontram no início da vida sexual, que se tornou a principal via de transmissão do HBV.

Além das vacinas recombinantes com fração S, as vacinas com frações pré-S₁ e pré-S₂ mostraram-se altamente imunogênicas em crianças, o que pode ser uma alternativa para não respondedores e também evitar infecção por cepas mutantes (Raz et al, 1995).

A instituição escolhida para o estudo (Lar de Frei Luís) encontra-se em uma região com muitos problemas econômicos e sociais, o que dificultou o acompanhamento de muitas crianças, levando a um decréscimo considerável na amostragem (~26%), mas suficiente para prosseguimento do estudo.

O percentual de crianças do sexo masculino e do sexo feminino não apresentou uma diferença significativa, com 48% e 52% respectivamente. Corroborando com outros estudos, observou-se maior TMG entre crianças do sexo feminino, tanto nos indivíduos vacinados com a Vacina Butang[®], quanto com a Engerix- B[®]. O sexo masculino compreende um dos fatores de risco para não resposta à vacinação. Neste estudo, as crianças não respondedoras (2,3%) foram vacinados com a Engerix-B[®], em sua maioria, crianças do sexo masculino.

Em um estudo conduzido em conjunto com nosso laboratório, Ferreira e colaboradores também observaram uma diferença de TMG de acordo com o sexo, sendo 1124,7 em indivíduos do sexo masculino e 1958,1 em indivíduos do sexo feminino e a soroproteção obtida com Engerix-B foi idêntica desse estudo, 97,7% (Ferreira et al, 1993).

Rendi-Wagner e colaboradores também descreveram o efeito do sexo no sistema imune, obtendo menor soroproteção e TMG em meninos (Rendi-Wagner et al, 2001).

8.3. *Imunogenicidade da vacina Butang® em crianças.*

O Instituto Butantan, São Paulo, produziu a primeira vacina brasileira para hepatite B, baseada na tecnologia do DNA recombinante denominada vacina Butang®. O Instituto possui uma capacidade de produção de 50 milhões de doses/ano, ultrapassando a meta de Ministério da Saúde. Isto torna possível a redução dos custos, já que a vacina para hepatite B ainda é cara, sendo seu preço unitário maior que o de vacinas básicas juntas (Ex: polio, sarampo, rubéola, etc). O alto custo dificulta a ampla imunização em países de menor poder econômico.

De forma a possibilitar o licenciamento e a distribuição da vacina Butang, foi realizado um estudo multicêntrico para avaliação da imunogenicidade e reatogenicidade desta vacina em diferentes faixas etárias. Dois estudos já haviam sido anteriormente conduzidos em adultos, a fim de avaliar o esquema vacinal e diferentes doses da vacina. Os dados preliminares indicaram imunogenicidade satisfatória em esquemas diferenciados e na dose de 20µg (Costa et al, 1997; Ioshimoto et al, 1999).

Para avaliação da imunogenicidade em crianças de 1 a 10 anos de idade, foi utilizada como padrão comparativo uma vacina de reconhecimento internacional, Engerix-B® (Glaxo SmithKline Biologicals), licenciada desde 1986. A eficácia dessa vacina entre crianças com mais de 1 ano de idade é da ordem de 96-100% (Hilleman, 1987; Andre, 1990; Moyes et al, 1988; Keating & Noble, 2003). Taxas de soroconversão similares foram observadas em indivíduos de outras faixas etárias.

Os critérios de exclusão adotados visaram assegurar que os participantes do projeto não apresentassem fatores que pudessem interferir na resposta vacinal, como por exemplo infecções crônicas, história de hemotransfusão e sorologia positiva para qualquer marcador do HBV. Indivíduos com doenças crônicas e hemotransfundidos possuem um sistema imune debilitado, talvez devido à terapia empregada ou pelo curso da própria doença. Estes fatores, comprometem a resposta vacinal, atingindo níveis de proteção inferiores aos indivíduos saudáveis (Thiel & Gavalier, 1992; Thiel et al, 1992).

Ambas as vacinas utilizam o subtipo adw2 do HBsAg. A diferença consiste nos sistemas de expressão de proteína: levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada na vacina Engerix-B® e *Hansenula polymorpha* na vacina Butang®. Este último

sistema parece apresentar algumas vantagens, como: expressar de 4 a 10 vezes mais antígeno que o primeiro e produzir cepas recombinantes mais estáveis.

Um estudo realizado em número pequeno de voluntários foi conduzido na Argentina para avaliar uma vacina recombinante produzida em *Hansenula polymorpha* (AgB®). Após a administração de 3 doses, observou-se uma taxa de soroconversão de 100%, sendo que mais de 95% dos indivíduos apresentaram títulos superiores a 1000 mUI/ml (Gadelha & Azevedo, 2003; Lepetic et al, 2003).

No presente estudo, encontramos 100,0% de soroproteção entre crianças imunizadas com a vacina Butang® (TMG= 3600 mUI/ml) e 97,7% com a vacina Engerix-B® (TMG = 2761 mUI/ml). Os resultados obtidos demonstraram a equivalência entre as vacinas, segundo os critérios estabelecidos (Martins et al, 2004).

Estes achados foram compatíveis com outros estudos para avaliação da eficácia da vacina Engerix-B® em crianças com menos de 10 anos de idade, onde foi observada taxa de soroproteção entre 98-100% e TMGs entre 3668-4023 mUI/ml (Duval et al, 2000) e 8062 mUI/ml (Goldfarb et al, 1996).

Ainda, observamos uma maior taxa de soroproteção entre crianças do sexo feminino imunizados com a vacina Engerix-B® (95,5% e 100,0%), entre crianças do sexo masculino e feminino, respectivamente.

Em um estudo comparativo entre esquemas vacinais distintos, André (1990) encontrou dados similares em crianças vacinadas com Engerix-B®, com TMGs inferiores em crianças dos sexo masculino.

A imunogenicidade da vacina Butang® foi avaliada em outras faixas etárias. Em recém-nascidos, foi observada taxa de soroproteção e TMG da ordem de 93,7% e 351, 1 mUI/ml; em adolescentes, de 95,1 % e 746,3 mUI/ml; em adultos jovens (20 a 30 anos), de 97,8% e 453,5 mUI/ml e em adultos (31-40 anos), de 79,8% e 122,7 mUI/ml, respectivamente.

Entre crianças, os resultados obtidos atenderam a todos os critérios de equivalência entre a vacina estudada e a vacina padrão, o que não foi verdadeiro para todas as faixas etárias estudadas. Com isso, a vacina foi reformulada, aumentando-se a concentração antigênica, e será reavaliada em recém-nascidos e adultos de 30 a 40 anos de idade (Martins, 2004).

Finalmente, o desenvolvimento da primeira vacina recombinante brasileira, de qualidade comparável às vacinas disponíveis no mercado internacional, representou um grande avanço na produção de imunobiológicos no país.

8.4. Estudo comparativo entre diferentes metodologias para quantificação de anti-HBs.

Na resposta vacinal para a hepatite B, os indivíduos são considerados soroprotetidos quando apresentam títulos pós-vacinais superiores a 10 mUI/ml. Contudo, é considerada uma resposta ideal, quando a concentração de anti-HBs é superior a 100mUI/ml (Assad & Francis, 2000).

Embora a quantificação de anti-HBs não seja recomendada após a vacinação regular de imunocompetentes, esta medida constitui um dado fundamental para a avaliação de novas vacinas ou esquemas vacinais alternativos em diferentes populações (ex: imunodeprimidos). Com isso, diversas metodologias diferentes vêm sendo desenvolvidas para a determinação dos títulos de anti-HBs (Gesemann & Scheiermann, 1995; Heijtkink et al, 2002).

Este estudo objetivou a análise comparativa entre três diferentes sistemas de teste para a quantificação de anti-HBs, sendo dois automatizados - (ELISA Não-competitivo/quimioluminescência, Access® AbHBs II - Beckman-Coulter MEIA, AUSAB - Abbott Laboratories) e o terceiro, de realização automatizada ou manual (ELISA não competitivo, ETI-AB-AUK - Diasorin), constituindo uma estratégia de menor custo.

A sensibilidade e especificidade dos sistemas Access, IMx e Diasorin, são bastante semelhantes: Access (99,8% e 99,7%), IMx (99,7% e 99,4%) e Diasorin (99,6% e 99,8%).

Após regressão linear, foi encontrada uma relação estatisticamente significativa entre os três testes (Access/IMx: $R=0,960$, $p<0,01$; Access/Diasorin: $R=0,913$, $p<0,01$ e IMx/Diasorin: $R=0,943$, $p<0,01$). Considerando duas vacinas (Butang® e Engerix-B®), resultados semelhantes foram encontrados (gráficos 17 a 22). Estes achados sugerem a adequação destes três testes para a quantificação do anti-HBs.

Após extensa consulta, foi encontrado um estudo de avaliação comparativa entre metodologias para determinação de títulos pós-vacinal, o qual utilizou os testes (AxSYM – Abbott Laboratories, Architect – Abbott Laboratories e Access AbHBs II – Beckman-Coulter) (Heijntink et al, 2002). Nesta investigação, Heijntink e colaboradores utilizaram grupos imunizados com as vacinas Engerix-B® (Glaxo SmithKline Biologicals) e GenHevac® (Pasteur Aventis, França) para avaliação dos diferentes testes comerciais, frente ao padrão internacional para hepatite B. Ainda, a correlação entre as metodologias foi pesquisada em diferentes faixas de concentração de anti-HBs (<1 mUI/ml, 1-10 mUI/ml, 11-50 mUI/ml, 51-100 mUI/ml, 101-150 mUI/ml e >150 mUI/ml). Entre as amostras de imunizadas com a vacina Engerix-B® e com títulos inferiores a 150 mUI/ml nos sistemas AxSYM e Architect (Abbott Laboratories), 13,0% (24/185), observou-se resultados discordantes, sendo negativas no sistema Access AbHBs II (Beckman-Coulter).

O mesmo não foi observado quando o grupo imunizado foi imunizado com a vacina GenVac (Pasteur Aventis, França). Em nosso estudo, encontramos uma correlação significativa entre ambos os sistemas.

Contudo, não estratificamos as amostras segundo os títulos de anti-HBs, abordagem esta, que será posteriormente realizada.

Outros aspectos relacionados aos testes foram considerados. Do ponto de vista operacional, os testes Access AbHBs II (Beckman-coulter) e IMx AUSAB (Abbott Laboratories) constituem sistemas automatizados, permitindo o processamento de grande número de amostras, adequando-se melhor a grandes demandas. Ainda neste contexto, o teste IMx AUSAB apresenta um maior limite de detecção (1000 mUI/ml) quando comparado com o Access AbHBs II (500 mUI/ml), permitindo a realização de um menor quantitativo de testes para determinação da concentração final de anti-HBs, sobretudo entre amostras com altos títulos de anticorpo.

Com relação ao tempo necessário para a determinação de resultados, nos sistemas automatizados, pode ser rapidamente liberado (cerca 40-45 minutos), quando comparado ao teste ETI-AB-AUK-3 (Diasorin), o qual demanda de 3-4 horas para a sua realização. Em contrapartida, o custo unitário do último é da ordem de U\$ 2,6, significativamente inferior aos demais (Access: U\$13,8 e IMx: U\$17,6). Este constitui um aspecto de grande relevância, ao considerarmos laboratórios com pequenas demandas ou com recursos restritos.

Estes achados sugerem que os três sistemas de teste constituem diferentes alternativas para avaliação laboratorial de resposta vacinal.

9.0. Conclusões

1. A vacina Butang[®] mostrou-se altamente imunogênica em crianças de 1 a 10 anos de idade, com taxa de soroconversão de 100,0% e título médio geométrico de 3600 mUI/ml.
2. A vacina Butang[®] apresentou imunogenicidade equivalente à vacina Engerix-B[®], utilizada como padrão no escopo deste estudo.
3. As metodologias de Quimioluminescência, MEIA e Ensaio Imunoenzimático não competitivo mostraram-se equivalentes e confiáveis para a quantificação de anti-HBs e avaliação de resposta vacinal.

10.0. *Perspectivas Futuras*

1. Avaliação da resposta vacinal obtida com a vacina Butang[®] entre crianças de 1 a 10 anos de idades, cinco anos após a vacinação, visando avaliar a eficiência de resposta vacinal a longo prazo.
2. Avaliação da imunogenicidade de esquemas alternativos de vacinação para a hepatite B em populações de imunodeprimidos.
3. Avaliação da imunogenicidade da vacina Butang[®] de nova formulação em recém-nascidos e adultos (Projeto Butang - fase 2).
4. Avaliação da imunogenicidade de uma vacina pentavalente em desenvolvimento no Instituto de Imunobiológicos (BIOMANGUINHOS/FIOCRUZ).

11.0. Referências:

Alhababi F, Sallam TA & Tong CYW. The significance of anti-HBc only in the clinical virology laboratory. *J Clin Virol* 2003; 27:162-169.

Alter MJ. Epidemiology and prevention of hepatitis B. *Semin Liver Dis* 2003; 23(1): 39-46.

Andre FE. Safety and efficacy of a hepatitis B vaccine. *Vaccine* 1990; 8(suppl): S74-S78.

Andre F. Hepatitis B: A comprehensive prevention, diagnosis, and treatment program – past, present, and future. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19:51-54.

Araujo NM, Mello FCA, Yoshida CFT, Niel C & Gomes AS. High proportion of subgroup A₁ (genotype A) among brazilian isolates of hepatitis B virus. *Arch Virol* 2004; 149(7):1383-1395.

Assad S & Francis A . Over a decade of experience with a yeast recombinant hepatitis B vaccine. *Vaccine* 2000; 18:57-67.

Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya AG, Savinskaya SS, Ketiladze ES, Braginsky DM, Savinov AP & Polischuk VF. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology* 1983; 20(1):23-31.

Banatvala JE & Damme PV. Hepatitis B vaccine – do we need boosters? *J Viral Hep* 2003; 10:1-6.

Banker DD. Viral hepatitis (part II). *Indian J Med Sci* 2003; 57(9):415-424.

Basuni AA, Butterworth L, Cooksley G, Locarnini S & Carman WF. Prevalence of HBsAg mutants and impact of hepatitis B infant immunisation in four Pacific Island countries. *Vaccine* 2004; 22:2791-2799.

Batalla J & Urbiztondo L. Vacuna combinada contra las hepatitis A y B. *semFYC* 1999; 23(9): 513-515.

- Baumert TF, Rogers AS, Hasegawa K & Liang TJ. Two core promoter mutations identified in a hepatitis B virus strain associated with fulminant hepatitis result in enhanced viral replication. *J Clin Invest* 1996; 98(10):2268-2276.
- Beeson BP. Jaundice occurring one to four months after transfusion of blood or plasma: Report of seven cases. *JAMA* 1943; 121:1332-1334.
- Befeler AS & Biscegli AM. Hepatitis B. *Infect Dis Clin North Am* 2000; 23(1):47-58.
- Blumberg BS, Alter HJ & Visnich S. A "new" antigen in leukemia sera. *JAMA* 1965;191:541-546.
- Blumberg BS. Australia antigen and the biology of hepatitis B. *Science* 1977; 197:17-25.
- Bosnak M, Dikici B, Bosnak V & Haspolat K. Accelerated hepatitis B vaccination schedule in childhood. *Pediatr Int* 2002 Dec; 44(6):663-665.
- Brasil LM, Fonseca JCF, Souza RB, Braga WSM & Toledo LM. Prevalência de marcadores para o vírus da hepatite B em contato domiciliares no Estado do Amazonas. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; 36(5):565-570.
- Broderick AL & Jonas MM. Hepatitis B in children. *Sem Liver Dis* 2003; 23(1): 59-68.
- Bruguera M, Bayas J, Vilella A, Tural C, González, Vidal J, Dal-Ré R & Salleras L. Immunogenicity and reactogenicity of a combined hepatitis A and B vaccine in young adults. *Vaccine* 1996; 14(15):1407-1411.
- Bruix J & Llovet JM. Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2003; 39:S59-S63.
- Chávez JH, Campana SG & Haas P. Panorama da hepatite no Brasil e no estado de Santa Catarina. *Rev Panam Salud Publica* 2003; 14(2): 91-96.
- Chen H, Chang M, Ni Y, Hsu H, Lee P, Lee C & Chen D. Seroepidemiology of hepatitis B virus infection in children. *JAMA* 1996; 276(11):906-908.

Chisari FV & Ferrari C. Viral hepatitis. In: *Viral pathogenesis*. Philadelphia: Lippincott-Raven. 1997; p. 745-770.

Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DN & Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244(4902):359-62.

Coates T, Patrick G, André F & Watson V. Hepatitis B vaccines: Assessment of the seroprotective efficacy of two recombinant DNA vaccines. *Clin Ther* 2001; 23(3):392-403.

Cooper A, Paran N & Shaul Y. The earliest steps in hepatitis B virus infection. *Bioch Bioph Acta* 2003; 1614:89-96.

Costa AA, Inenami M, Juarez E & Dorlhiado P. Preliminary report of the use on adults of a recombinant yeast vaccine manufactured by Instituto Butantan. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1997; 39(1):39-42

Dane DS, Cameron CH & Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with australia-antigen associated hepatitis. *The Lancet* 1970;1:695-698.

Davis HL, Mancini M, Michel M & Whalens RG. DNA-mediated immunization to hepatitis B surface antigen: longevity of primary response and effect of boost. *Vaccine* 1996; 14(9):910-915.

Diamond C, Thiede H, Perdue T, Secura G, Valleroy L, Mackeliar D, Corey L & The Seattle young men s survey team. Viral hepatitis among young men who have Sex with men: prevalence of infection, risk behaviors, and vaccination. *Sex Transm Dis* 2003; 30(5):425-432.

Doganci T, Uysal G, Kir T, Bakirtas A, Kuyucu N & Doganci L. Horizontal transmission of hepatitis B virus in children with chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2005; 11(3): 418-420.

Duval B, Boulianne N, Serres GD, Laflamme N, Wals PD, Massé R, Trudeau G, Delage G & Desjardins L. Comparative immunogenicity under field conditions of two

recombinant hepatitis B vaccines in 8-10-year-old children. *Vaccine* 2000; 18:1467-1472.

Fattovich G. Natural history of hepatitis B. *J Hepatol* 2003; 39:S50-S58.

Fattovich G. Natural history and prognosis of hepatitis B. *Semin Liver Dis* 2003; 23(1):47-58.

Ferreira CRB, Yoshida CFT, Mercadante LAC, Gomes DF, Oliveira JM, França MS, Sidoni M, Ennes IC, Schatzmayr HG & Gaspar AMC. Immunization against hepatitis B in children from endemic zone: Evaluation of the antibody response against the DNA recombinant vaccine (Engerix B- 20 MCG). *Rev Inst Med trop S Paulo*. 1993; 35(1):89-92.

Ferreira MS. Diagnóstico e tratamento da hepatite B. *Rev Soc Bras Med Trop* 2000; 33(4):389-400.

Floreani A, Baldo V, Cristofolletti M, Renzulli G, Valeri A, Zanetti C & Trivello R. Long-term persistence of anti-HBs after vaccination against HBV: an 18 year experience in health care workers. *Vaccine* 2004; 22:607-610.

François G, Kew M, Damme PV, Mphahlele MJ & Meheus A . Mutant hepatitis B viruses: a matter of academic interest only or a problem with far-reaching implications? *Vaccine* 2001; 19:3799-3815.

Gadelha C & Azevedo N. Vaccine innovations in Brazil: Recent experiences and structural constraints. *Hist Cienc Saude Manguinhos* 2003; 10 (supl 2): 697-724.

Ganem D & Varmus HE. The molecular biology of hepatitis B viruses. *Ann Rev Biochem* 1987; 56:651-693.

Ganem D & Prince AM. Mechanisms of disease: Hepatitis B virus infection – Natural history and clinical consequences. *N Engl J Med*. 2004; 350(11): 1118-1129.

Gaspar AMC & Yoshida CFT. Geographic distribution of HBsAg subtypes in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz (RJ)* 1987; 82:253-258.

Gesemann M & Scheiermann N. Quantification of hepatitis B vaccine-induced antibodies as a predictor of anti-HBs persistence. *Vaccine* 1995; 13(5):443-447.

Ghanaat J, Sadeghian A, Ghazvini K & Nassiri MR. Prevention and risk factors for hepatitis B virus infections among STD patients in northeast region of Iran. *Med Sci Monit* 2003; Feb, 9(2): CR 91-94.

Glitin N. Hepatitis B: diagnosis, prevention, and treatment. *Clin Chem* 1997; 43:8(B):1500-1506.

Goldfarb J, Medendorp SV, Nagamori K, Buscarino CBA & Krause D. Comparison study of the immunogenicity and safety of 5 and 10 µg dosages of a recombinant hepatitis B vaccine in healthy children. *Pediatr Infect Dis J* 1996; 15(9):768-771.

Grob PJ. Hepatitis B virus, pathogenesis and treatment. *Vaccine*. 1998;16:S11-S16.
Grotto I, Mandel Y, Ephros M, Ashkenazi I & Shemer J. Major adverse reactions to yeast-derived hepatitis B vaccines - a review. *Vaccine* 1998; 16(4): 329-334.

Heathcote J. The treatment of chronic hepatitis B. *In: Viral Hepatitis and Liver Disease. Proceedings of the 10th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease* 2002; 143-149.

Heijntink RA, Schneeberger PM, Postma B & Crombach W. Anti-HBs levels after hepatitis B immunization depend on test reagents: routinely determined 10 and 100 IU/l seroprotection levels unreliable. *Vaccine* 2002; 20(23-24): 2899-2905.

Heineman TC, Clements-Mann, Poland GA, Jacobson RM, Izu AE, Sakamoto D, Eiden J, Nest GAV & Hsu HH. A randomized, controlled study in adults of the immunogenicity of a novel hepatitis B vaccine containing MF59 adjuvant. *Vaccine* 1999; 17:2769-2778.

Hilleman MR. Yeast recombinant hepatitis B vaccine. *Infection* 1987; 15(1):3-7.

Hilleman MR. Vaccines in historic evolution and perspective: a narrative of vaccine discoveries. *Vaccine* 2000; 18:1436-1447.

Hilleman MR. Critical overview and outlook: pathogenesis, prevention, and treatment of hepatitis and hepatocarcinoma caused by hepatitis B virus. *Vaccine* 2003; 21:4626-4649.

Hollinger FB & Liang TJ. Hepatitis B virus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP et al. *Fields Virology*. Pensilvânia:Lippincott-Raven, 2000. Chapter 87, p. 2971-3021.

Hoofnagle JH, Shafritz DA & Popper H. Chronic type B hepatitis and the healthy HBsAg carrier state. *Hepatology* 1987; 7(4): 758-763.

Hui L, Rong-Cheng L, Su-Su L, Jin-Ye Y, Xian-Jia Z & Shu-Sheng W. Persistence of hepatitis B vaccine immune protection and response to hepatitis B booster immunization. *WJG* 1998; 4(6):493-496.

Hwang L, Beasley RP, Stevens CE & Szmuness W. Immunogenicity of HBV vaccine in healthy Chinese children. *Vaccine* 1983; 1:10-12.

Ioshimoto LM, Rissato ML, Bonilha VSJ, Miyaki C, Raw I & Granovski. Safety and immunogenicity of hepatitis B vaccine Butang in adults. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1999; 41(3):191-193.

Itoh Y, Takai E, Ohnuma H, Kitajima K, Tsuda F, Machida A, Mishiro S, Nakamura T, Miyakawa Y & Mayumi M. A synthetic peptide vaccine involving the product of the pre-S(2) region on the hepatitis B virus DNA: Protective efficacy in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci* 1986; 83:9174-9178.

Jazayeri MS, Basuni AA, Cooksley G, Locarnini S & Carman WF. Hepatitis B virus genotypes, core gene variability and ethnicity in the Pacific region. *J Hepatol* 2004; 41:139-146.

Jilg W. Novel hepatitis B vaccines. *Vaccine* 1998; 16:S65-S68.

Keating G & Noble S. Recombinant hepatitis B vaccine (Engerix-B): A review of its immunogenicity and protective efficacy against hepatitis B. *Drugs* 2003; 63(10):1021-1051.

Kidd-Ljunggren K, Miyakawa Y & Kidd AH. Genetic variability in hepatitis B viruses. *J Gen Virol* 2002; 83(Pt6): 1267-1268.

Koff RS. Immunogenicity of hepatitis B vaccine: implications of immune memory. *Vaccine* 2002; 20:3695-3701.

Koff RS. Hepatitis vaccines: recent advances. *Int J Parasitol* 2003; 33:517-523.

Krugman S, Giles JP & Hammond J. Viral hepatitis, type B (MS-2 strain): Studies on active immunization. *JAMA* 1971; 217:41-45.

Krugman S & Giles JP. Viral hepatitis, type B (MS-2 strain): Further observations on natural history and prevention. *New Engl J Med* 1973; 288(15): 755-760.

Krugman S. The newly licensed hepatitis B vaccine. *JAMA* 1982; 247(14):2012-2015.

Kunches LM, Craven DE & Werner BG. Seroprevalence of hepatitis B virus and delta agent in parenteral drug abusers – Immunogenicity of hepatitis B vaccine. *Am J Med* 1986. 81: 591-595.

Kupek EJ. Residual transfusion risk for hepatitis B and C in southern Brazil, 1991-99. *J Viral Hepat* 2003; 8:78-82.

Lai CH, Ratziu V, Yuen M & Poynard T. Viral hepatitis B. *The Lancet* 2003; 362: 2089-2094.

Lau DT, Khokhar MF, Doo E, Ghany MG, Herion D et al. Long-term lamivudine therapy for HBeAg-positive and HBeAg-negative chronic hepatitis B. *In: Viral Hepatitis and Liver Disease. Proceedings of the 10th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease* 2002; 203-210.

Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat* 2004; 11:97-107.

Lee P, Lee C, Huang L, Chen J & Chang M. A follow-up study of combined vaccination with plasma-derived and recombinant hepatitis B vaccines in infants. *Vaccine* 1995; 17(13): 1685-1689.

Lee SS, Wong KH, Lim WL & Young BWY. Children's age affects hepatitis B vaccine response. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18(6):750-751.

Lee WM. Medical: Hepatitis B virus infection. *Massachusetts Medical Society* 1997; 337(24):1733-1745.

Lepetic A, Biscayart C, Seigelchifer M, Arduino R & Stambouliau D. Persistence of immunity and seroprotection 4 years after a primary vaccination schedule with a *Hansenula polymorpha* recombinant hepatitis B vaccine. *Vaccine* 2003; 21:4481-4485.

Lewis-Ximenez LL, Ó KMR, Ginuino CF, Silva JC, Schatzmayr HG, Stuver S & Yoshida CFT. Risk factors for hepatitis B virus infection in Rio de Janeiro, Brazil. *BMC Public Health* 2002. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2458/2/26>.

Liang TJ, Hu Z, Zhang Z, Torii N, Ghany M & Doo E. Current concepts in the pathogenesis of hepatitis B virus infection. *In: Viral Hepatitis and Liver Disease. Proceedings of the 10th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease*. 2002; 133-138.

Liu HB, Meng ZD, Ma JC, Han CQ, Zhang YL, Xing ZC, Zhang YW, Liu YZ & Cao HL. A 12-year cohort study on the efficacy of plasma-derived hepatitis B vaccine in rural newborns. *World J Gastroenterol* 2000; 6(3):381-383.

Lok AS. Hepatitis B infection: pathogenesis and management. *J Hepatol* 2000; 32(suppl 1):89-97.

Lok AS & McMahon BJ. Chronic hepatitis B: update of recommendations. *AASLD Practice Guideline*. 2003.

McDonnel WM & Askari FK. DNA vaccines. *N Engl J Med* 1996; 334(1): 42-45.

McMahon BJ, Bruden DI, Petersen KM, Bulkow LR, Parkison AJ et al. Antibody levels and protection after hepatitis B vaccination: Results of a 15-year follow-up. *An Int Med* 2005; 142:333-341.

Mahoney FJ. Update on diagnosis, management and Prevention of hepatitis B virus infection. *Clin Micr Rev* 1999; 351-366.

Magnius LO & Espmark A . A new antigen complex co-occurring with Australia antigen. *Acta Pathol Microbiol Scand (B) Microbiol Immunol* 1972; 80(2): 335-337.

Magnius LO & Norder H. Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. *Intervirology* 1995; 38:24-34.

Malik AH & Lee WM. Chronic hepatitis B virus infection: treatment strategies for the next millenium. *Ann Intern Med* 2000; 132:723-731.

Martins RM, Bensabath G, Arraes LC, Oliveira MLA, Miguel JC, Barbosa GG & Camacho LAB. Multicenter study on the immunogenicity and safety of two recombinant vaccines against hepatitis B. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99(8):865-871.

Mast EE, Mahoney FJ Alter MJ & Margolis HS. Progress toward elimination of hepatitis B virus transmission in the United States. *Vaccine* 1998; 16:S48-S51.

Matsaniotis N, Kattamis C, Dionyssopoulou E & Laskari S. Immunogenicity of low doses of hepatitis B vaccine in normal children. *Vaccine* 1985; 3:297-299.

Maynard JE. Hepatitis B: global importance and need for control. *Vaccine* 1990; 8(suppl): S18-S20.

MMWR Recommendations and Reports. November 22, 1991/ 40(RR-13);1-19. Disponível em : <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00033405.htm>.

MMWR Recommendations and Reports. January 24, 2003/ 52(RR01);34-36. Disponível em : <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5201a2.htm>.

MMWR weekly. September 12, 2003/ 52(36);868-870. Disponível em : <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5236a5.htm>.

MMWR. Prevention and control of infection with hepatitis B virus in correctional settings. 2003; 52 (Nº RR-1): 1-36.

Motta MSF, Mussi-Pinhata MM, Jorge SM, Yoshida CFT & Souza CBS. Immunogenicity of hepatitis B vaccine in preterm and full term infants vaccinated within the first week of life. *Vaccine* 2002; 20:1557-1562.

Moyes C. Immunogenicity of a recombinant yeast-derived hepatitis B vaccine (Engerix B) in children. *NZ Med J* 1988; 101: 162-164.

Niel C, Moraes MTB, Gaspar AMC, Yoshida CFT & Gomes SA. Genetic diversity of hepatitis B virus strains isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Virol* 1994; 44:1180-1186.

Oliveira LHS, Silva IR, Xavier BLS & Cavalcanti SMB. Hepatitis B infection among patients attending a sexually transmitted diseases clinic in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 96(5):635-640.

Oliveira MLA. Hepatites virais parenteralmente transmissíveis (Hepatites B, C, D & G) em usuários de drogas injetáveis (UDIs) do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro; 1997. [Tese de Mestrado em Biologia Celular e Molecular- IOC].

Oliveira SAN. Aspectos epidemiológicos e dados moleculares da infecção pelo Vírus da Hepatite B (HBV) em uma amostra de usuários de drogas injetáveis do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro; 2004. [Tese de Mestrado em Biologia Parasitária- IOC].

Osella AR, Massa MA, Jockes S, Blanch N, Yacci MR, Centoze S & Silloni S. Hepatitis B and C virus sexual transmission among homosexual men. *Am J Gastroenterol* 1998; 93(1):49-52.

Peters M, Lamy P, Murray A, Perrilo R, Schiff E, Shiffman M, Wright T, Yoshida E, Dorin SV & Brosgart C. Adefovir dipivoxil treatment of hepatitis B in patients with resistance to lamivudine therapy. *In: Viral Hepatitis and Liver Disease. Proceedings of the 10th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease* 2002; 215-218.

Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas – Hepatite viral crônica B. Medicamentos: Lamivudina e Interferon- α . Portaria nº860- 12/11/2002.

Ranger-Rogez S, Alain S & Denis F. Hepatitis viruses: mother to child transmission. *Pathol Biol (Paris)* 2002 Nov; 50(9):568-575.

Rendi-Wagner P, Kundi M, Stemberger H, Wiedermann G, Holzmann H, Hofer M, Wiesinger K & Kollaristch H. Antibody-response to three recombinant hepatitis B vaccines: comparative evaluation of multicenter travel-clinic based experience. *Vaccine* 2001; 19:2055-2060.

Rizzetto M, Canese MG, Arico S, Crivelli O, Trepo C, Bonino F & Verme G. Immunofluorescence detection of a new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and serum of HBsAg carriers. *Gut* 1977; 18(12):997-1003.

Roggendorf M & Viazov S. Health care workers and hepatitis B. *J Hepatol* 2003; 39:589-592.

Rosini N, Mousse D, Spada C & Treitinger A. Seroprevalence of HBsAg, anti-HBc and anti-HCV in southern Brazil, 1999-2001. *Brazilian J Infect Dis* 2003; 7(4):262-267.

Rottinghaus ST, Poland GA, Jacobson RM, Barr LJ & Roy MJ. Hepatitis B DNA vaccine induces protective antibody responses in human non-responders to conventional vaccination. *Vaccine* 2003; 21(31): 4604-4608.

Russi JC, Serra M, Vinolis J, Perez MT, Ruchansky D, Alonso G, Sanchez JL, Russel KL, Montano SM & Negrete M. Sexual transmission of hepatitis B virus, hepatitis C virus, a human immunodeficiency virus type 1 infections among male transvestite commercial sex workers in Montevideo, Uruguay. *Am J Trop Med Hyg* 2003 Jun; 68(6):716-720.

Schneller P, Banz K & Stagnus U. Cost-effectiveness of combined hepatitis A and B vaccination compared with monovalent hepatitis B vaccination in Switzerland and Austria: a preliminary report. In: *Viral Hepatitis and Liver Disease. Proceedings of the 10th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease* 2002; 72-75.

Sherlock S. Hepatitis B: the disease. *Vaccine*.1990; 8(suppl):S6-S9.

Siegriest CA. Why are boosters no longer necessary for protection against hepatitis B? *Rev Prat* 2004 Mar 15; 54(5):509-511.

Souto FJD. Distribuição da hepatite B no Brasil: atualização do mapa epidemiológico e proposições para seu controle. *GED* 1998; 18(4):143-150.

Stephenne J. Development and production aspects of a recombinant yeast-derived hepatitis B vaccine. *Vaccine* 1990; 8:S69-S73.

Teles SA, Martins RMB, Silva AS, Gomes DMF, Cardoso DDP, Vanderborght BOM & Yoshida CFT. Hepatitis B virus infection profile in central brazilian hemodialysis population. *Rev Inst Med Trop S Paulo*.1992; 40(5):281-286.

Teles SA, Martins RMB, Lopes CLR, Carneiro MAS, Souza KP & Yoshida CFT. Immunogenicity of a recombinant hepatitis B vaccine (Euvax-B) in haemodialysis patients and staff. *Eur J Epidemiol* 2001; 17:145-149.

Thiel DHV, El-Ashmawy E, Love K, Gavaler JS & Starzl TE. Response to hepatitis B vaccination by liver transplant candidates. *Dig Dis Sci*. 1992; 37(8):1245-1249.

Thiel DHV & Gavaler JS. Response to HBV vaccination in patients with severe liver disease. Absence of an HLA effect. *Dig Dis Sci* 1992; 37(9): 1447-1451.

Thoelen S, Damme PV, Leentvaar-Kuypers A, Leroux-Roels A, Bruguera M, Frei PC & Safary A. The first combined vaccine against hepatitis A and B: an overview. *Vaccine* 1999; 17:1657-1662.

Thomas HC, Hoare JM & Forbes SJ. Chronic hepatitis B: current views on pathogenesis of chronic infection and therapies. *In: Viral Hepatitis and Liver Disease. Proceedings of the 10th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease* 2002; 139-143.

Trepka MJ, Weesbord JS, Zhang G & Brewer T. Hepatitis B virus infection, risk factors and immunity among sexually transmitted disease clinic clients. *Sex Transmitt Dis* 2003; 30(12):914-918.

Waters SA, Kennedy M, Voet P, Hauser P, Petre J, Carman W & Thomas HC. Loss of the common a determinant of hepatitis B surface antigen by a vaccine-induced escape mutant. *J Clin Invest* 1992; 90:2543-2547.

West DJ, Calandra GB. Vaccine induced immunologic memory for hepatitis B surface antigen: Implication for policy on booster vaccination. *Vaccine* 1996; 14:1019-27.

Yokosawa J, Ulanova T, Ioshimoto LM, Granovski N, Miyaki C, Swenson PD, Khudyakov YE & Fields HÁ. Antigenic properties of wild-type and mutant hepatitis B virus surface antigens. *In: Viral Hepatitis and Liver Disease. Proceedings of the 10th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease* 2002; 155-159.

Yeoh EK. Hepatitis B virus infection in children. *Vaccine* 1990; 8: S29-S30.

Zhang S, Yiu Y, Bai G, Shi L & Jiang H. Mechanism of intrauterine infection of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2004; 10(3):437-438.

Zuckerman JN, Zuckerman AJ, Symington I, Do W, Williams A et al. Evaluation of a new hepatitis B triple-antigen vaccine in inadequate responders to current vaccines. *Hepatology* 2001; 34(4): 798-802.

12.0. Anexos:

Termo de consentimento livre e esclarecido - crianças lactentes, pré-escolares e escolares

Eu, _____ RG n.º _____

Convidado a participar do estudo "Avaliação de imunogenicidade e segurança de vacina recombinante contra hepatite B em população de recém-nascidos e crianças", como responsável pela criança de nome _____ fui informado que:

- O estudo tem por objetivo principal avaliar se uma das vacinas em estudo, produzida no Brasil, é capaz de proteger contra a hepatite B, e secundariamente avaliar os eventos adversos pós-vacinais;
- A outra vacina a ser usada no estudo é uma referência internacional em qualidade e segurança.
- A vacina será oferecida gratuitamente, bem como os exames laboratoriais. Serão aplicadas 3 (três) doses da vacina, no músculo, com intervalo de 1 (um) mês entre a primeira e a segunda dose, e terceira dose seis meses após a primeira aplicação.
- Será coletado sangue em quantidade de no máximo 5 ml antes da aplicação da primeira dose e no máximo 5 ml após a terceira dose. O material será utilizado para exames de triagem (sorologia para aids e sífilis) e testar se a criança está, de fato, protegida contra a doença. Se, no primeiro exame, ficar demonstrado que a criança não tem as condições exigidas para participar do estudo, ainda assim ela será contemplada com a vacinação.
- Serei informado do resultado dos exames, e caso a criança não esteja imunizada após a 3ª dose, será oferecida uma dose adicional;
- Em caso de necessidade, a criança/adolescente receberá assistência médica durante todo o período do estudo.
- Não existe risco da vacina transmitir a hepatite B ou doenças devido ao seu modo de produção, mas pode haver desconforto no local da injeção (como dor, inchaço, vermelhidão, calor), e reações como: mal estar, indisposição, fadiga, dor muscular. Em qualquer momento, poderei procurar o Hospital para tratar esses sintomas ou quaisquer outros que venham a surgir após a aplicação da vacina;
- A criança poderá se beneficiar da vacina caso ela, de fato, seja capaz de estimular o sistema imunológico a produzir os anticorpos que vão proteger contra a hepatite B, bem como outras pessoas que venham a receber a vacina se ela vier a ser comercializada;
- Fui informado que para a proteção contra hepatite B são necessárias três doses, aplicadas no esquema 0, 1, 6 meses. Nenhuma das vacinas atualmente em uso é capaz de induzir 100% de proteção a todos os indivíduos vacinados. A criança poderá ser beneficiada com a aplicação de doses adicionais de vacina contra hepatite B, se eu assim o quiser, com o objetivo de tentar melhorar a proteção.
- O nome e os dados pessoais da criança somente serão utilizados com finalidade de pesquisa, não sendo permitida sua identificação em nenhuma publicação ou encontro científico;
- Os resultados dos exames laboratoriais serão utilizados em benefício da criança, a cujos responsáveis será oferecida a orientação indicada, se necessário, jamais poderão dar margem a qualquer discriminação e serão igualmente protegidos por sigilo;
- A qualquer momento, tenho a liberdade de perguntar ou questionar os pesquisadores sobre a conduta que estiver sendo realizada, sendo eles Dr. Luiz Cláudio Arraes e Dr. Edvaldo Souza (IMIP) e no Rio de Janeiro o Dr. Reinaldo de Menezes Martins. Caso haja necessidade, poderei entrar em contato com quaisquer um dos pesquisadores pelo telefone (81)3413-2223(IMIP) ou (21)493-7213 (RJ).
- Caso decida abandonar o estudo, nenhuma penalidade será aplicada, pois minha participação é totalmente voluntária.

Assim sendo, concordo em participar do estudo.

Concordo com a sorologia de triagem para AIDS e sífilis. Sim () Não ()
Recife/Rio de Janeiro, _____ de _____ de _____.

(assinatura)

