

**EMÍLIA DE FARIA CARNIEL**

**IMUNOGENICIDADE E SEGURANÇA DA  
VACINA RECOMBINANTE DE HEPATITE B  
COMBINADA COM A VACINA BCG**

**CAMPINAS**

**2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



**EMÍLIA DE FARIA CARNIEL**

**IMUNOGENICIDADE E SEGURANÇA DA  
VACINA RECOMBINANTE DE HEPATITE B  
COMBINADA COM A VACINA BCG**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Saúde da Criança e do Adolescente; área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.

**ORIENTADORA: PROF. DRA. MARIA MARLUCE DOS SANTOS VILELA**

**CAMPINAS  
2009**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

C217i Carniel, Emília de Faria  
Imunogenicidade e segurança da vacina recombinante de Hepatite B combinada com a vacina BCG / Emília de Faria Carniel. Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientador : Maria Marluce dos Santos Vilela  
Tese ( Doutorado ) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Ensaio clínico controlado. 2. Imunização. 3. Hepatite - Vacina. 4. Vacinas. 5. Hepatite B. 6. Programas de imunização. 7. Serviços de saúde para crianças. I. Vilela, Maria Marluce dos Santos. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : Immunogenicity and safety of combined recombinant Hepatitis B with BCG vaccines at birth.**

- Keywords:**
- Clinical trial
  - Immunization
  - Hepatitis, vaccines
  - Vaccines
  - B hepatitis
  - Immunization program

**Titulação: Doutor em Saúde da Criança e do Adolescente**  
**Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente**  
**Banca examinadora:**

**Profa. Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela**  
**Profa. Dra. Brigina Kemp**  
**Prof. Dr. José Espin Neto**  
**Profa. Dra. Maria Angélica Bicudo Zeferino**  
**Profa. Dra. Eliete Maria Silva**

**Data da defesa: 15-12-2009**

---

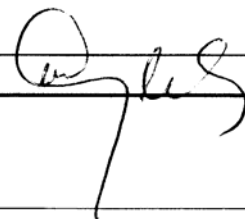
## Banca Examinadora de Tese de Doutorado

---

Emilia de Faria Carniel

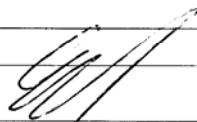
---

**Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Maria Marluce dos Santos Vilela**

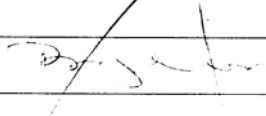


### Membros:

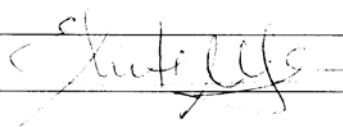
Professor (a) Doutor (a) José Espin Neto



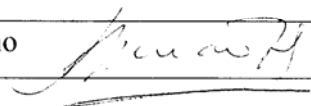
Professor (a) Doutor (a) Brigina Kemp



Professor (a) Doutor (a) Eliete Maria Silva



Professor (a) Doutor (a) Angélica Maria Bicudo Zeferino



Curso de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

**Data: 15/12/2009**

---



## **DEDICATÓRIA**

*A todas as famílias que contribuíram para a  
realização desse estudo*





## AGRADECIMENTOS

---

*À Profa. Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela, minha orientadora, pela oportunidade, confiança e apoio que foram fundamentais para a realização desse trabalho.*

*Ao Dr. André Moreno Morcillo, o "ser mais humano que já conheci", pela amizade, generosidade e disposição para me ensinar.*

*À Dra. Maria de Lurdes Zanolli e à Dra. Maria Ângela Reis de G. M. Antônio, companheiras de trabalho e "amigas-irmãs" de longa data, com quem aprendo muito sobre o trabalho e a vida.*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (Fapesp) por conceder financiamento para a pesquisa.*

*Ao Dr. Isaías Raw e à Dra. Hisako G. Higashi, do Instituto Butantan, responsáveis pela produção e fornecimento das vacinas que viabilizaram o estudo.*

*À Enfermeira Dra. Brigina Kemp, Coordenadora de Vigilância Epidemiológica, e aos colegas da Secretaria Municipal de Saúde de Campinas pela parceria.*

*Aos gestores e trabalhadores do Caism e da Maternidade de Campinas pela receptividade e apoio durante todo o período de seleção das crianças.*

*Às companheiras da Equipe de Campo: Silvana D. Severino, Eliana S. Rodrigues, Luciana Grizotto, Fernanda Cintra, Ana Paula de Moraes, Edna M. Paulo, Sueli S. Ramos, Maria Josefina B. Pereira, Eva M. dos Santos e Suzana P. Mendonça pelo compromisso e responsabilidade com o estudo.*



*Aos colegas do Ciped: Taís N. Mazzola, Milton C. de Souza, Simone B. C. Lima, Maria Helena Mazzola e Camila C. Vilela pelo trabalho conjunto e convivência.*

*Às Professoras Dra. Márcia Regina Nozawa e Dra. Maria Rita D. Cordeiro pelas contribuições no Exame de Qualificação.*

*À Vera Lemos e ao Rogério Faria pela ajuda na tradução para o inglês.*

*Ao Departamento de Pediatria pela oportunidade.*

*À Simone Ferreira e Tathiane Krakenbuhl, secretárias da Pós-Graduação, pela ajuda nos trâmites acadêmicos.*

*À minha mãe, a meus irmãos e irmãs pela torcida.*

*Ao Fernando, Bia e Dudu, minha família maravilhosa, que sempre me apoia e me "empurra pra frente".*

*Muito mais contribuíram para a realização desse trabalho. A todos, muito obrigada.*



*"Quem protege uma criança contra quaisquer formas de negligências,  
crueldade ou exploração viverá para sempre, através da vida  
nascente que salvou"*

***D. Paulo Evaristo Arns***



LISTA DE FIGURAS.....	xix
LISTA DE TABELAS.....	xxi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xxiii
RESUMO.....	xxvii
ABSTRACT.....	xxx
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>35</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>51</b>
2.1 Objetivo primário.....	53
2.2 Objetivo secundário .....	53
<b>3. MÉTODOS.....</b>	<b>55</b>
3.1 Desenho do estudo.....	57
3.2 Condução do estudo.....	57
3.3 Local de desenvolvimento do estudo .....	57
3.4 População e período de abrangência .....	58
3.5 Critérios de inclusão .....	59
3.6 Critérios de não-inclusão .....	59
3.7 Critérios de exclusão durante o estudo .....	60
3.8 Tamanho da amostra.....	60
3.9 Seleção dos participantes.....	60
3.10 Randomização e mascaramento .....	61
3.11 Alocação das crianças nos grupos .....	62
3.12 Vacinação .....	62
3.12.1 Vacinas utilizadas.....	62
3.12.2 Esquema de vacinação .....	63
3.12.3 Administração das vacinas.....	64
3.12.4 Armazenamento e transporte das vacinas .....	65
3.13 Critérios de cumprimento do protocolo.....	66
3.14 Instrumentos de coleta de dados.....	66





3.15	Análise dos dados .....	67
3.15.1	Análise demográfica .....	67
3.15.2	Análise estatística .....	67
3.16	Procedimentos laboratoriais .....	68
3.16.1	Coletas de amostras de sangue.....	68
3.16.2	Entrega de resultados de sorologias e encaminhamentos.....	69
3.17	Monitorização de eventos adversos pós-vacinação .....	69
3.18	Operacionalização do trabalho de campo .....	70
3.18.1	Equipe de campo .....	70
3.18.2	Atividades preliminares ao trabalho de campo.....	70
3.18.3	Desenvolvimento do trabalho de campo .....	71
3.18.4	Visitas domiciliares .....	74
3.19	Aspectos éticos.....	75
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>77</b>
4.1	Participantes do estudo .....	79
4.2	Exclusão do estudo e perdas de seguimento .....	79
4.3	Peso e comprimento ao nascimento .....	80
4.4	Idade no momento da segunda e terceira doses e intervalo entre doses .....	81
4.5	Avaliação da resposta imunogênica .....	82
4.6	Eventos adversos .....	85
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>87</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>97</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>101</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>113</b>
	ANEXO 1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	115
	ANEXO 2 Instrumentos de coleta de dados .....	117
	ANEXO 3 Ficha de admissão no CAISM.....	123
	ANEXO 4 Parecer do Comitê de Ética e Pesquisada Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP .....	125
	ANEXO 5 Bula da vacina BCG + Hepatite B liofilizada .....	127
	ANEXO 6 Artigo publicado .....	129



## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1. Esquema de desenvolvimento do estudo: Grupo I - Vacinas Combinadas e Grupo II - Vacinas Separadas .....	64
Figura 2. Número de crianças selecionadas, de crianças que concluíram o estudo e motivos de abandono .....	79
Figura 3 - Distribuição dos títulos de anti-HBs (mUI/mL) dos lactentes vacinados ao nascimento com as vacinas BCG e Butang <sup>®</sup> , combinadas ou separadas, após a segunda dose da vacina Butang <sup>®</sup> .....	83
Figura 4 - Distribuição dos títulos de anti-HBs (mUI/mL) dos lactentes vacinados ao nascimento com as vacinas BCG e Butang <sup>®</sup> , combinadas ou separadas, após a terceira dose da vacina Butang <sup>®</sup> .....	84



## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1 - Distribuição do peso (gramas) e comprimento (centímetros) dos lactentes vacinados ao nascimento com as vacinas BCG e Butang <sup>®</sup> , combinadas ou separadas .....	80
Tabela 2 - Distribuição da idade (dias) dos lactentes no momento da segunda e da terceira doses da vacina Butang <sup>®</sup> .....	81
Tabela 3 - Distribuição do tempo decorrido (dias) entre a administração da primeira e segunda e entre a primeira e a terceira dose da vacina Butang <sup>®</sup> e entre a terceira dose e a segunda coleta de amostra de sangue. ....	82
Tabela 4 - Distribuição de títulos de anti-HBs (mUI/mL) dos lactentes vacinados ao nascimento com as vacinas BCG e Butang <sup>®</sup> , combinadas ou separadas, após a segunda dose da vacina Butang <sup>®</sup> .....	83
Tabela 5 - Distribuição de títulos de anti-HBs (mUI/mL) dos lactentes vacinados ao nascimento com as vacinas BCG e Butang <sup>®</sup> , combinadas ou separadas, após a terceira dose da vacina Butang <sup>®</sup> .....	85



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

<b>AIDS</b>	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
<b>BCG</b>	Vacina de <i>Bacillus Calmette-Guérin</i>
<b>Caism</b>	Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
<b>CD</b>	Célula dendrítica
<b>Cenadi</b>	Central Nacional de Armazenamento e Distribuição de Imunobiológicos
<b>Ciped</b>	Centro de Investigação em Pediatria
<b>CoVisa</b>	Coordenadoria de Vigilância à Saúde
<b>CRIE</b>	Centro de Referência de Imunobiológicos Especiais
<b>CS</b>	Centro de Saúde
<b>DTP</b>	Difteria, Tétano e Pertussis
<b>EAI</b>	Eventos Adversos pós-Imunizações
<b>HB</b>	Hepatite B
<b>Hib</b>	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>IB</b>	Instituto Butantan
<b>ID</b>	Via Intradérmica
<b>IDH</b>	Índice de Desenvolvimento Humano
<b>IM</b>	Via Intramuscular
<b>INCQS</b>	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>Pasni</b>	Programa de Autossuficiência Nacional em Imunobiológicos
<b>PIB</b>	Produto Interno Bruto
<b>PNI</b>	Programa Nacional de Imunizações
<b>PPD</b>	Purified Protein Derivate





<b>RN</b>	Recém-nascido
<b>SCR</b>	Sarampo, Caxumba e Rubéola
<b>SMS</b>	Secretaria Municipal de Saúde
<b>SS</b>	Secretaria de Saúde
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde
<b>TB</b>	Tuberculose
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>Unicamp</b>	Universidade Estadual de Campinas
<b>VHB</b>	Vacina contra a Hepatite B



**Introdução:** A possibilidade de combinar vacinas sem causar interferência com a segurança e a eficácia contribui para reduzir os custos, melhorar as dificuldades logísticas e para a adesão da população aos esquemas de imunização propostos. Com isso, o controle de doenças imunopreveníveis, objetivo do Programa Nacional de Imunizações, poderá ser facilitado. **Objetivos:** Avaliar a imunogenicidade e a segurança da vacina recombinante contra a hepatite b (Butang<sup>®</sup>) combinada com a vacina BCG, produzidas pelo Instituto Butantan (SP-Brasil). **Métodos:** Realizou-se um ensaio clínico aberto e randomizado comparando a vacina Butang<sup>®</sup> (HbsAg recombinante 10 µg; hidróxido de alumínio 0,625 mg; timerosal 0,05 mg; qsp 0,5ml) administrada separada ou combinada com a BCG (BCG em suspensão - cepa Moreau - Rio de Janeiro - 0,1mg; glutamato de sódio 1,1mg; NaCl 0,85%; qsp 0,1ml). Foram selecionados 552 recém-nascidos saudáveis, cujas mães eram HbsAg, HIV e sífilis negativas, que foram alocados aleatoriamente em dois grupos: Grupo I: Butang<sup>®</sup> combinada com a BCG por via intradérmica (ID) nas primeiras 24 horas de nascimento e Butang<sup>®</sup> por via intramuscular (IM) com um e seis meses de vida e Grupo II: uma dose de BCG ID e uma dose de Butang<sup>®</sup> IM nas primeiras 24 horas, após o nascimento, e Butang<sup>®</sup> IM com um e seis meses de vida. Foram colhidas amostras de sangue imediatamente antes da terceira dose de Butang<sup>®</sup> e aproximadamente 30 dias após, e realizadas análises quantitativas de anti-HBs (mIU/ml) usando AxSYM Ausab<sup>®</sup> ABBOTT GmbH Diagnostika (Laboratories, Park IL, USA). Os dados foram analisados utilizando-se o programa SPSS v.11, Chicago IL, USA. **Resultados:** Das 552 crianças selecionadas, 498 cumpriram o protocolo do estudo. Dessas, 245 (116 do sexo masculino e 129 do sexo feminino) pertenciam ao Grupo I e 253 (146 do sexo masculino e 107 do sexo feminino) ao Grupo II. A estratégia de



campo, adotada nesse ensaio, garantiu pouca interferência na rotina de vida das famílias, no seguimento pediátrico e na vacinação da criança e permitiu uma adesão de 90,2% dos participantes. Não foram observados eventos adversos. Foram encontrados títulos de anti-HBs  $\geq 10$  mUI/mL em 99,6% dos vacinados do Grupo I e 99,2% do Grupo II após a terceira dose da Butang<sup>®</sup>. O intervalo de confiança da diferença entre as proporções de soroproteção mostrou que a vacina combinada não foi inferior às vacinas aplicadas separadamente. Conclusão: A vacina combinada mostrou adequada imunogenicidade e segurança, respaldando o seu uso em recém-nascidos.

**Palavras-chave:** Ensaio clínico controlado, Imunização, Hepatite B - Vacina. Vacinas, Hepatite B, Programas de imunização, Serviços de saúde para crianças.



## ABSTRACT

---

Background: the possibility of combining vaccines without affecting their safety and efficacy might reduce costs, overcome logistic difficulties and increase population acceptance to immunization schedules. As a consequence, preventable-vaccine diseases might be controlled. Objectives: to evaluate immunogenicity and safety of recombinant Hepatitis B vaccine (Butang<sup>®</sup>) combined with BCG vaccine, both produced by Instituto Butantan (Brazil). Methods: a randomized non-inferiority study was conducted to compare immunogenicity and safety of the Butang<sup>®</sup> (recombinant HbsAg 10 µg; aluminium hydroxide 0.625 mg; thimerosal 0.05 mg; qsp 0.5 mL) administered alone or combined with BCG (BCG suspension Moreau - Rio de Janeiro strain 0.1 mg; sodium glutamate 1.1 mg; NaCL 0.85%; qsp 0.1 mL). Five hundred and fifty two healthy newborn children from negative HbsAg, HIV and syphilis mothers were split in two groups, according to the following treatments applied up to 24 h after birth: Group I: Butang<sup>®</sup> combined with BCG administered intradermally and Group II: Butang<sup>®</sup> administered intramuscularly and BCG intradermally. Both groups received subsequent doses of Butang<sup>®</sup> at one and six months of age. Blood samples were collected immediately before applying the third dose of Butang<sup>®</sup> and 30 days after, in order to perform anti-HBs (mIU/mL) quantitative analysis using AxSYM Ausab<sup>®</sup> ABBOTT GmbH Diagnostika (Laboratories, Park IL, USA). Data were analyzed by computer software named SPSS v.11, Chicago IL, USA. The subsequent Butang<sup>®</sup> applications and blood samples were taken in participants' home. Results: No adverse events occurred during experimental period. The field strategy used in this clinical trial allowed adoption by 90.2% of the participants and caused little interference in families' daily routine, pediatric appointments and children's vaccine. Out of 552 randomized





children, 498 completed the study protocol, in which 245 (116 males and 129 females) were allocated in Group I and 253 (146 males and 107 females) in Group II. Anti-HBs titers  $\geq 10$  mUI/mL were found in 99% of both groups. The confidence interval of proportion difference in seroprotection was within the range to define equivalence between combined and alone vaccine application. Conclusion: Combined Butang<sup>®</sup> with BCG vaccine administration showed similar safety and efficacy, as compared to alone vaccine application in newborns.

**Key words:** Clinical trial. Immunization. Hepatitis vaccines. Vaccines. Hepatitis B. Immunization program.



# 1. INTRODUÇÃO





O Programa Nacional de Imunizações (PNI) foi instituído no Brasil em 1973 e regulamentado em 1975 (Lei Federal nº 6.259 de 30/10/1975), pela necessidade de coordenação das atividades de vacinação que, embora desenvolvidas tanto pelos governos municipais e estaduais como pelo federal, eram isoladas, descontínuas, de caráter episódico e com cobertura reduzida (Brasil, 2001a; Ponte, 2003).

O PNI tinha como objetivo prioritário promover o controle do sarampo, da difteria, do tétano, da coqueluche e da poliomielite e manter a erradicação da varíola. Foram estabelecidas as normas técnicas do PNI e da notificação de doenças, definidas as vacinas básicas obrigatórias para crianças menores de um ano de idade, iniciados os cuidados com a manipulação, estoque e distribuição de imunobiológicos e realizadas capacitações das equipes (Temporão et al., 2005).

No início da década de 1980, iniciaram-se os investimentos do governo no parque produtor de vacinas brasileiro e na rede de frio, com a criação do Programa de Autossuficiência Nacional em Imunobiológicos (Pasni), do Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde (INCQS) e da Central Nacional de Armazenamento e Distribuição de Imunobiológicos (Cenadi), com o objetivo de tornar o Brasil independente da importação de soros e vacinas e pela necessidade de garantir a qualidade e a segurança desses produtos nas atividades de vacinação. Os investimentos do Pasni foram destinados ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos/Fiocruz/Rio de Janeiro), ao Instituto Butantan/São Paulo, ao Instituto Vital Brazil/RJ, ao Instituto de Tecnologia do Paraná (Tecpar/PR), à Fundação Ezequiel Dias (Funed/Minas Gerais), à Fundação Ataulpho de Paiva/RJ e ao Instituto de Pesquisas Biológicas (IPB/Rio Grande do Sul) (Ponte, 2003; Temporão et al., 2005).

Nessa mesma época, foram instituídos os Dias Nacionais de Vacinação contra a Poliomielite, em duas campanhas anuais, para todas as crianças menores de cinco anos de idade, com a vacina oral trivalente. A poliomielite teve o último caso registrado no país em 1989 e o Brasil recebeu o certificado de erradicação dessa doença em 1995. No final da década, foi introduzida, nas áreas de alta endemicidade do país, a vacina recombinante da Hepatite B (VHB), em substituição ao produto derivado de sangue humano, que era usado nessa época (Temporão et al., 2005).

Nos anos 1990, o Brasil elaborou o plano de eliminação do tétano neonatal e o de erradicação do sarampo, criou os Centros de Referências para Imunobiológicos Especiais (CRIEs) que disponibilizam, na rede pública, produtos especiais para indivíduos portadores de condições clínicas específicas, estabeleceu o Sistema de Vigilância de Eventos Adversos Pós-vacinais e o Sistema de Informação e Avaliação do PNI e introduziu a vacina do *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), a vacina quádrupla bacteriana (DTP+Hib contra difteria, tétano, coqueluche e *Haemophilus influenzae* tipo b), a tríplice viral (SRC contra sarampo, rubéola e caxumba) e a vacina contra a influenza e a antipneumocócica (disponibilizadas à população a partir de 65 anos de idade) (Temporão et al., 2005).

#### Os objetivos prioritários do PNI são

contribuir para a manutenção da erradicação da febre amarela urbana, da poliomielite e do sarampo; zerar os casos de tétano neonatal; manter o controle da tuberculose em suas formas graves, da difteria, do tétano acidental, da coqueluche, da febre amarela silvestre e da raiva humana; alcançar e manter controle da influenza, da infecção pneumocócica e suas complicações, das infecções por *Haemophilus influenzae tipo b*, da rubéola e da síndrome da rubéola congênita, da hepatite b e da caxumba; contribuir para o controle de doenças imunopreveníveis e suas complicações em parcela populacional portadora de condições clínicas específicas, objeto dos CRIEs; e para o controle de surtos ocasionais de

Em 2006, o PNI oferecia 44 produtos entre vacinas, soros heterólogos e imunoglobulinas, nos postos de vacinação, nos CRIEs e em unidades hospitalares e de pronto atendimento, sendo que 74% deles foram adquiridos em laboratórios nacionais (Temporão et al., 2005).

A Hepatite B (HB) é uma doença imunoprevenível e de notificação compulsória que se constitui um importante problema de saúde pública mundial. Estima-se que 45% da população mundial vivam em áreas onde a infecção crônica pelo vírus da HB é altamente endêmica (> 7% da população com HBsAg+), 43% em regiões de endemicidade intermediária (2 a 7%) e 12% em locais com baixa endemicidade (< 2%). No mundo, dois bilhões de pessoas mostram evidências sorológicas de infecção pelo vírus da HB, sendo que 360 milhões desenvolvem doença crônica com risco de doenças do fígado, como cirrose e carcinoma hepatocelular, resultando em 500 a 700 mil mortes por ano (WHO, 2001; Shepard et al., 2006).

Nas regiões de alta endemicidade, a maioria das infecções são adquiridas por transmissão perinatal ou antes dos cinco anos, por contato domiciliar, quando o risco de desenvolver infecção crônica é maior do que em todas as outras faixas etárias.

O Brasil apresenta um padrão intermediário de infecção pelo vírus da HB (2,1% da população com HBsAg+ e 7,9% com anticorpos anti-HBc), com diferenças entre suas regiões: alta taxa de endemicidade em Manaus, na região Norte (21% de anti-HBc), taxas intermediárias em Porto Alegre no Sul e no Rio de



Janeiro no Sudeste (7,6% e 5,5%, respectivamente) e baixa em Fortaleza no Nordeste (1,2%). A alta soroprevalência foi associada ao baixo nível socioeconômico da população e foram detectados anticorpos anti-HBc em 3,1% das crianças menores de um ano de idade, sugerindo a transmissão vertical. Além disso, a soroprevalência foi significativamente mais alta em homens do que em mulheres e em maiores de 16 anos, sugerindo transmissão sexual e uso de drogas intravenosas (Silveira et al., 1999; Clemens et al., 2000, Tanaka, 2000; Paraná e Almeida, 2005).

Entre as medidas para o controle da HB e de suas complicações, a vacinação tem se mostrado de grande impacto. Nos Estados Unidos, após a introdução da vacina, houve uma redução de casos agudos de HB de 9,2/100.000, em 1981, para 2,8 em 1999 (Ferreira e Silveira, 2006). Outros países também apresentaram redução acentuada na prevalência de HB crônica, com a vacinação rotineira de crianças, como em Taiwan (de 10% para 1,1%), na Gâmbia (de 12% a 0,6%) e na Indonésia (de 6,2% para 1,9%), entre outros (WHO, 2001). No Brasil, 11 anos após a introdução da vacina numa região do Amazonas, os vacinados encontravam-se em risco quatro vezes menor de apresentar marcadores de infecção pelo vírus da HB que os não-vacinados e houve redução de pelo menos cinco vezes na taxa de portadores de HBsAg na comunidade (Braga et al., 2004).

A primeira vacina para prevenir a HB, licenciada no início dos anos 1980, era derivada de plasma de indivíduos com infecção crônica e, embora segura e efetiva, não foi bem aceita pela possibilidade de transmissão do vírus da HB ou de outros patógenos que se transmitem através do sangue (Brasil, 2000). Posteriormente, foi desenvolvida a vacina a partir de tecnologia de DNA recombinante, produzida pela inserção de um plasmídeo contendo o gene do

antígeno de superfície do vírus da HB em células de um fungo. O HBsAg, após purificação por métodos físico-químicos, é adsorvido em hidróxido de alumínio e algumas formulações contêm timerosal como preservativo (Ferreira e Silveira, 2006).

O esquema vacinal recomendado de três doses induz a formação de anticorpos protetores (anti-HBs  $\geq$  10 mUI/mL) em mais de 95% de crianças e adolescentes saudáveis e 90% de adultos jovens. A partir de 40 anos, a eficácia é menor que 90% e o tabagismo, a obesidade, as doenças crônicas e as imunológicas também interferem na boa resposta da vacina (Mast et al., 2004). Quando administrada entre 12 a 24 horas após o nascimento, tem se mostrado altamente efetiva na prevenção da HB aguda e crônica em lactentes, cujas mães são positivas para HBsAg e HBeAg (WHO,2001; Shepard et al.,2006).

Quanto à segurança, observa-se que as reações mais comuns à vacina são leves e transitórias. Estima-se que mais de um bilhão de pessoas já tenham sido vacinadas no mundo e as queixas mais frequentemente relatadas, entre crianças e adultos, são as locais como dor, endurecimento e rubor, e as sistêmicas como febre, fadiga, tontura e irritabilidade. Reação de hipersensibilidade pode ocorrer excepcionalmente e púrpura trombocitopênica idiopática, raramente (Mast et al., 2004; São Paulo, 2006). Estudos epidemiológicos não encontraram associação entre a VHB e síndrome da morte súbita do lactente ou outras causas de morte no primeiro ano de vida, diabetes mellitus, doenças desmielinizantes ou esclerose múltipla (Ascherio et al.,2001; Shepard et al.,2006).

A estratégia inicial, que recomendava a vacinação somente a grupos e regiões de risco, não mostrou grande impacto na redução da doença e de suas consequências, o que levou a OMS, nos anos 1990, a recomendar a inclusão de

todos os lactentes nos programas de vacinação contra a HB. A partir daí, a vacina vem sendo incorporada, gradativamente, nos calendários vacinais de diversos países e, em 2006, 164 deles adotavam a vacinação universal na infância (Shepard et al., 2006, WHO on-line<sup>1</sup>, 2008).

No Brasil, a vacina foi introduzida em 1989 no Amazonas e, em 1992, foi incorporada ao calendário vacinal de crianças em áreas de alta prevalência como Amazonas, Santa Catarina e Espírito Santo e recomendada para grupos de risco em vários estados brasileiros (Braga et al., 2004). A partir de 1998, seguindo a orientação da OMS, a VHB foi disponibilizada para todos os menores de um ano de idade em todo o país e, a partir de 2001, para pessoas até 19 anos de idade e para grupos priorizados de qualquer idade como hemofílicos, hemodialisados, doentes que necessitam da utilização de sangue ou outros produtos sanguíneos, profissionais de saúde, comunicantes domiciliares de portadores, reclusos, prostitutas e homossexuais masculinos, entre outros (Brasil, 2001b).

Inicialmente, o PNI importava a VHB produzida por laboratórios estrangeiros, mas, a partir de 1995, o Instituto Butantan (IB) iniciou o desenvolvimento e a produção dessa vacina, como parte de uma política de incentivo à indústria brasileira de vacinas, objetivando a diminuição de custos e da vulnerabilidade às incertezas do mercado (Martins et al., 2004).

A VHB, produzida pelo IB (Butang<sup>®</sup>), desenvolvida em cooperação com a N.G. Biotecnologia Ltda, utiliza a tecnologia de DNA recombinante. A vacina continha 20 µg/mL de HbsAg (em 1 mL), altamente purificado, produzido em levedura *Hansenulla polymorpha*, 1,25 mg do adjuvante hidróxido de alumínio e 0,05 mg de timerosal (Ioshimoto et al., 1999; Martins et al., 2004).

---

<sup>1</sup> [http://www.who.int/immunization\\_delivery/new\\_vaccines/hepb/en/index4.html](http://www.who.int/immunization_delivery/new_vaccines/hepb/en/index4.html)

Resultados obtidos em estudo com grupo de voluntários adultos que receberam três doses de Butang<sup>®</sup> (10 µg/dose) mostraram que a vacina foi considerada satisfatória, tanto em imunogenicidade, quanto em reatogenicidade (Costa et al., 1997).

Em estudo realizado por Ioshimoto et al. (1999), com dois grupos de adultos que receberam dois diferentes esquemas vacinais com Butang<sup>®</sup> (Grupo I: zero, um, três meses e Grupo II: zero, um, seis meses com vacinas formuladas com 10 µg e 20 µg de antígeno/dose), foi demonstrado que, em comparação com a vacina Engerix B da GlaxoSmithKline (esquema zero, um, seis meses com 20 µg/dose), a soroconversão da Butang<sup>®</sup> foi equivalente e apresentou baixa reatogenicidade, mas que a dose de 20 µg foi mais efetiva que a de 10 µg.

Baldy et al. (2004) avaliaram a imunogenicidade de três VHB (a brasileira e duas coreanas, todas contendo 10 µg/dose), administradas em adolescentes em três doses (zero, um e cinco meses) e verificaram que a imunogenicidade e a segurança foram altas e equivalentes à da vacina Engerix B.

A imunogenicidade e a segurança da Butang<sup>®</sup> foram também avaliadas em um estudo de equivalência, prospectivo, multicêntrico, duplo-cego, comparando-as com a vacina Engerix B. Esse estudo, que envolveu 2.754 voluntários de zero a 40 anos, demonstrou que a VHB do IB, era equivalente à Engerix B em crianças de um a 10 anos, e menos imunogênica, mas aceitável, para uso em recém-nascidos, adolescentes e adultos jovens (Martins et al., 2004).

A partir de 2003, a Butang<sup>®</sup> passou a ser aplicada na rotina do PNI, porém, somente para menores de 20 anos. Posteriormente, novo estudo com essa vacina reformulada (25 µg de HbsAg em 1 mL), em recém-nascidos e adultos com mais de 30 anos, concluído em 2006, demonstrou equivalência entre ela e a

Engerix B, o que possibilitou sua utilização em todas as faixas etárias a partir de 2008 (São Paulo, 2008).

Atualmente, o PNI recomenda o início do esquema vacinal logo após o nascimento (nas primeiras 12 horas), para evitar a transmissão vertical ou, o mais precocemente possível, na unidade neonatal ou no Centro de Saúde. O esquema deve ser completado com mais duas doses, sendo a segunda aplicada um mês após a primeira e, a terceira, seis meses após a primeira. A vacina deve ser administrada por via intramuscular (IM), no músculo vasto lateral da coxa direita e, a partir de dois anos de idade, no deltóide. A única contra-indicação à aplicação da vacina é a ocorrência de reação anafilática em dose anterior (Brasil, 2001b).

Em 2006, 60% das crianças do mundo e 97,4% das brasileiras menores de um ano foram vacinadas com três doses da VHB (WHO, 2007; Brasil, 2008a on-line<sup>2</sup>).

A vacina de *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) também integra o calendário do PNI como uma das medidas de controle da tuberculose (TB), juntamente com o diagnóstico e o tratamento dos casos e a quimioprofilaxia dos contactantes.

Tais medidas se justificam no fato de que a TB continua como um sério problema de saúde pública, sendo a maior causa de doença infecciosa e morte em adultos em todo o mundo, principalmente, em países da África e da Ásia. Segundo estimativas da OMS, em 2006, ocorreram 9,2 milhões de casos novos no mundo (139 casos por 100.000 habitantes), sendo 44% deles bacilíferos, com 1,7 milhões de mortes. Destes, 8% foram em portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV+) e 5% eram multirresistentes às drogas usadas para o tratamento (WHO, 2008).

---

<sup>2</sup><http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?pni/cnv/cpniuf.def>

O Brasil está entre os 22 países onde se concentram 80% das ocorrências de TB. Estima-se que, em 2006, ocorreram 92.000 casos novos (50 casos por 100.000 habitantes), dos quais 63% dos pacientes eram bacilíferos e ocorreram 7.600 mortes, colocando o país na 16<sup>a</sup> posição do *ranking* mundial (WHO, 2008). Observado por região em 2005, tem-se que os maiores coeficientes de incidência foram nas regiões Norte e Nordeste e a situação mais preocupante foi no estado do Rio de Janeiro (83,5/100.000) (Brasil, 2008b on-line<sup>3</sup>). Nas áreas metropolitanas, a concentração de populações com baixas condições de vida e a associação da TB com a Síndrome da Imunodeficiência Humana (Aids) contribuem para a ineficiência dos programas de controle da TB. (Hijar et al., 2001).

A vacina BCG foi obtida no início do século XX por Calmette e Guérin, a partir da atenuação do *Mycobacterium bovis*. Desde a década de 1920, vem sendo largamente utilizada em quase todo o mundo, sendo incorporada ao Programa Ampliado de Imunizações da OMS em 1974. A recomendação atual é de uma dose da vacina após o nascimento, por via intradérmica (ID), para todos os lactentes que vivem em países com alta prevalência de TB, que inclui a maioria dos países em desenvolvimento (Smith e Starke, 2004; Hussey et al., 2007). Alguns países que não adotam esta recomendação disponibilizam a vacina para faixas etárias maiores ou para grupos de alto risco, como profissionais de saúde em áreas endêmicas, crianças expostas a TB multirresistente, moradores sem teto, entre outros. (Pereira et al., 2007). Dados da OMS mostram cobertura vacinal de BCG acima de 90%, em 2005, para a maioria dos países que adotam a vacinação ao nascimento (WHO, 2007).

---

<sup>3</sup> <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?idb2005/d0202.def>

Apesar de ampla, essa vacinação em todo o mundo não tem mostrado impacto no controle da TB pulmonar. Desde a sua introdução, inúmeros trabalhos mostram resultados de eficácia bastante controversos, apresentando desde alto percentual de proteção a nenhum benefício (Smith e Starke, 2004). Essa variação da eficácia tem sido atribuída a diversos fatores, como diferenças nas cepas do BCG, idade e via de administração, características genéticas e nutricionais da população, diferenças de exposição a micobactérias ambientais, diferença na virulência da *M. tuberculosis* e alto risco de reinfecção. Além disso, são apontados também que as diferenças metodológicas entre os estudos podem ter influenciado nessa variação (Pereira et al., 2007).

Entretanto, diversas pesquisas mostraram que a BCG confere proteção, de pelo menos 80%, contra as formas graves de TB, como a TB miliar e a meningite tuberculosa (Smith e Starke, 2004; Hussey et al., 2007). Foi demonstrado também que a BCG é eficaz na proteção da hanseníase, que pode durar por pelo menos três décadas (Rodrigues et al., 2007; Düppre et al., 2008) e que houve redução na incidência de reações, nas deformidades e nas incapacidades provocadas por essa doença nos vacinados com BCG quando comparados com os não-vacinados (Ramadasan, et al., 2005). Além disso, em estudo realizado na Turquia, foi observado efeito protetor da BCG contra a infecção tuberculosa em crianças comunicantes domiciliares de doentes bacilíferos (Soysal et al., 2005) e resultados obtidos por Kristensen et al. (2000) indicaram que a vacina BCG está associada à redução da mortalidade de crianças em Guiné-Bissau.

Estudos recentes demonstraram que recém-nascidos, apesar da imaturidade de seu sistema imune, desenvolveram uma forte resposta Th1 quando

vacinados com BCG, que persistiu, por pelo menos um ano, indicando que essa vacina ativa células de memória. Além disso, a BCG administrada ao nascimento aumentou a resposta de células T e B de outras vacinas, sobretudo da VHB, uma das mais imunogênicas aplicadas na infância (Marchant et al., 1999; Ota et al., 2002). Isso sugere que, sob condições adequadas de estimulação, os linfócitos T podem ser instruídos a combater patógenos intracelulares (Marchant e Goldman, 2005). A resposta imune a vacinas é influenciada por vários fatores, como o tipo e a dose do antígeno e a via de administração da vacina. Micobactérias e *Bordetella pertussis* são potentes ativadores de células dendríticas (CD), o que pode explicar a resposta Th1 induzida pelo BCG. Essa resposta pode também ter sido promovida pela aplicação da vacina ID (Marchant et al., 1999; Marchant e Goldman, 2005), estimulando as células de Langerhans, que são CD imaturas encontradas como uma rede de malhas na camada epidérmica. Essas células capturam o antígeno e o transportam aos linfonodos regionais. Durante essa migração, as células de Langerhans se transformam em CD maduras com maior capacidade de apresentação do antígeno para os linfócitos T virgens, o que vai resultar numa forte resposta imune (Abbas e Lichtman, 2007).

No entanto, há ainda a necessidade de uma vacina que seja também eficaz no controle da TB pulmonar, o que tem incentivado o desenvolvimento de diversas pesquisas, que já mostram resultados bastante animadores.

A vacina BCG utilizada no Brasil contém *Mycobacterium bovis* atenuados com glutamato de sódio. A subcepa utilizada é a Moreau-Rio de Janeiro, mantida sob o sistema de lote semente no *Status Serum Institut* de Copenhague, na Dinamarca (Brasil, 2001b), considerada mais imunogênica e com menos eventos



adversos quando comparada com outras subcepas (Benévolo-de-Andrade et al., 2005).

O Ministério da Saúde recomenda uma dose da BCG ID o mais precocemente possível, de preferência nas maternidades, para recém-nascidos saudáveis com peso maior ou igual a 2.000g, nas crianças expostas ao HIV não infectadas e nas infectadas assintomáticas. Recomenda, ainda, adiar a vacinação naquelas com peso inferior a 2.000g e nas com afecções dermatológicas extensas em atividade. As crianças com diagnóstico de imunodeficiência primária ou secundária não devem receber a BCG. A vacina é também recomendada para profissionais de saúde não reatantes ao PPD, que trabalham em áreas de risco para TB e para a população indígena que não apresentar cicatriz vacinal. Para os comunicantes intradomiciliares de hanseníase, são recomendadas duas doses de BCG (Brasil, 2001a).

No Brasil, a cobertura vacinal da BCG em 2007 foi de 100% para menores de um ano (Brasil, 2008a on-line<sup>4</sup>).

Além da VHB e da BCG, o PNI, assim como os programas de vacinação da maioria dos países, recomenda diversas doses de vacinas a partir do nascimento. No Brasil, até os seis anos de idade, são necessárias pelo menos 11 injeções para o cumprimento do calendário vacinal e, com a possibilidade de incorporação de novas vacinas, podem ser indicadas de três a quatro injeções numa mesma visita ao serviço de saúde (American Academic Pediatrics, 1999; Brasil, 2001a).

Essas vacinas, em formulações separadas, podem incorrer em diversas dificuldades logísticas e econômicas, como aumento de custos devido ao maior

---

<sup>4</sup> <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?pni/cnv/cpniuf.def>

uso de seringas e agulhas, necessidade de mais espaço e equipamentos para estocagem, sobrecarga dos profissionais, dificuldade de aceitação pelos pais e sofrimento das crianças devido às múltiplas injeções (Arístegui et al, 2003; Decker MD et al, 2004).

Esses problemas têm estimulado o desenvolvimento e uso de vacinas injetáveis com múltiplos antígenos combinados em uma mesma seringa ou frasco (Decker et al., 2004). As vacinas combinadas que simplificam a administração do produto e o calendário vacinal, contribuem para aumentar a adesão da população, para reduzir o desconforto das crianças, para reduzir custos e para a expansão dos programas de vacinação (Ellis, 1999; Halsey, 2001; Arístegui et al, 2003). Além disso, a combinação possibilita a diminuição da quantidade de preservativos e outros produtos necessários na formulação da vacina, o que pode reduzir os riscos de eventos adversos (Halsey, 2001).

Com essa perspectiva e, considerando-se que a VHB e a BCG devem ser aplicadas ao nascimento, o IB realizou um experimento inicial, em camundongos, de uma combinação de BCG com 1 $\mu$ g de VHB, ambas preparadas pelo instituto, que demonstrou soroconversão e título médio geométrico para HB superior ao da vacina isolada. Esses resultados sugeriram a possibilidade do uso dessa combinação em recém-nascidos (Raw et al., 2000).

Para isso, essa nova formulação deve ser avaliada, objetivando assegurar imunogenicidade e segurança comparável entre essa vacina combinada e as aplicadas separadamente.



## **2. OBJETIVOS**





## **2.1 Objetivo primário**

Avaliar a imunogenicidade da vacina recombinante contra a HB produzida pelo IB (Butang<sup>®</sup>) combinada com a vacina BCG.

## **2.2 Objetivo secundário**

Avaliar a reatogenicidade e a segurança da Butang<sup>®</sup> e da BCG combinadas.



## 3. MÉTODOS







### **3.1 Desenho do estudo**

Trata-se de um ensaio clínico de fase II, randomizado, aberto, com dois grupos paralelos, com grupo controle ativo e de não-inferioridade, ou seja, que tem como hipótese que a imunogenicidade Butang<sup>®</sup> combinada com a BCG não é inferior à Butang<sup>®</sup> aplicada separadamente.

### **3.2 Condução do estudo**

O estudo foi coordenado, supervisionado e operacionalizado em três módulos: o de campo, coordenado e supervisionado por enfermeira, o de laboratório e o de banco de dados e análise estatística, por pesquisadores independentes.

### **3.3 Local de desenvolvimento do estudo**

O estudo foi realizado na cidade de Campinas, localizada na região noroeste do estado de São Paulo, Brasil, com cerca de um milhão de habitantes, Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) de 0,85 e coeficiente de mortalidade infantil de 10,7 por mil nascidos vivos. Quase 100% dos domicílios recebem água tratada e coleta de lixo e mais de 80% dispõem de rede de esgoto (Campinas, 2007)<sup>5</sup>.

Seu sistema público de saúde é organizado em cinco Distritos e composto por 61 Centros de Saúde (CS) e por serviços de nível secundário e terciário próprios, conveniados ou contratados. Os CSs, que são responsáveis pela

---

<sup>5</sup> <http://www.campinas.sp.gov.br/seplan/cidade/portcidade.htm>

atenção básica de saúde, são dimensionados para dar assistência a 20.000 habitantes de uma população adscrita definida e suas equipes são compostas por médicos, enfermeiros, dentistas e auxiliares de enfermagem e de consultório dentário (Campinas, 2009)<sup>6</sup>.

Os RNs foram selecionados na Maternidade de Campinas, onde ocorre a maioria dos partos do município de mulheres usuárias do SUS e de convênios, e no Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (Caism) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

### **3.4 População e período de abrangência**

A população alvo do estudo foi constituída por recém-nascidos (RNs) de mães residentes em Campinas, cujos partos ocorreram na Maternidade de Campinas ou no Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (Caism) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), entre 27 de fevereiro e 8 de junho de 2004. O trabalho de campo foi desenvolvido em 18 meses.

As crianças selecionadas receberam a BCG e a primeira dose da Butang<sup>®</sup> na Maternidade de Campinas e no Caism. A segunda e a terceira doses da Butang<sup>®</sup> e as coletas das amostras de sangue foram realizadas no domicílio de cada participante.

---

<sup>6</sup> [www.campinas.sp.gov.br/saude](http://www.campinas.sp.gov.br/saude)

### **3.5 Critérios de inclusão**

- Família residente em Campinas;
- RN filho de mãe com idade igual ou superior a 18 anos ou com autorização de seus responsáveis legais para participar do estudo;
- RN a termo, sem intercorrências neonatais;
- Aceitação da participação no estudo, por parte dos pais ou responsáveis pela criança, após a apresentação detalhada acerca dos objetivos, procedimentos, riscos e benefícios potenciais do estudo, com a leitura, discussão e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE - Anexo 1).

### **3.6 Critérios de não-inclusão**

- RN filho de mãe portadora do antígeno de superfície do vírus da HB (HbsAg+);
- RN filho de mãe portadora de sorologia positiva para HIV ou sífilis;
- RN com história familiar de TB;
- RN portador de malformação congênita, doença genética ou condição clínica grave;
- RN com peso de nascimento inferior a 2.000g e/ou com idade gestacional menor que 35 semanas;
- RN submetido à administração de imunoglobulina intravenosa ou transfusão sanguínea até a data da vacinação.

### **3.7 Critérios de exclusão durante o estudo**

- Evento adverso grave relacionado à vacina em estudo, após dose anterior;
- Aparecimento, durante o estudo, de algum fator que impossibilitasse o cumprimento do protocolo.

### **3.8 Tamanho da amostra**

Para o cálculo de tamanho da amostra, tomaram-se como referência as recomendações para cálculos de amostragem para vacinas combinadas e para estudos de não-inferioridade. Não-inferioridade foi definida como diferença não maior que 10 pontos percentuais ( $[p1 - p2] < - 10\%$ ) na proporção de soroproteção entre a vacina de estudo e a vacina de referência, com poder de 80% e nível de confiança de 95%, ( $\beta = 0,20$  e  $\alpha = 0,05$ ). Para análise da não-inferioridade, foram necessários 222 indivíduos, mais 20% das possíveis perdas de seguimento totalizando 267 crianças em cada grupo, e um total de 534 RNs (Horne, 2001).

### **3.9 Seleção dos participantes**

Em princípio, todos os RNs, cujos nascimentos ocorreram na Maternidade de Campinas e no Caism, foram elegíveis à participação no estudo, respeitados os critérios de inclusão e de não-inclusão. Embora não houvesse restrição aos usuários de convênios, por orientação dos administradores da Maternidade de Campinas e do Caism, o convite para a participação no estudo foi feito somente às usuárias do SUS.

As mães das crianças eram identificadas pela equipe de campo e convidadas para uma entrevista, na qual eram apresentados os objetivos do estudo, os procedimentos necessários para o seu desenvolvimento (entrevistas, vacinação, visitas domiciliares e coletas de sangue), a duração, os benefícios e os riscos.

Em seguida, era lido e discutido o Termo de Consentimento e aquelas que concordavam em participar assinavam o TCLE em duas vias, juntamente com o entrevistador, ficando uma arquivada no Ciped e a outra com os pais ou responsáveis.

### **3.10 Randomização e mascaramento**

O estudo foi aberto devido à apresentação das vacinas, que possibilitava aos pais e à equipe de campo, no momento da aplicação, ter conhecimento sobre qual vacina seria administrada no participante.

Por meio de sorteio aleatório, definiram-se os grupos de alocação correspondentes à vacina combinada e à separada, no qual o dia da semana foi considerado uma unidade amostral. O sorteio foi realizado por dois profissionais da equipe não envolvidos com o trabalho de campo. Até o término do estudo, os profissionais responsáveis pelas análises laboratoriais e pelas estatísticas não tiveram conhecimento da alocação dos participantes nos grupos.

### 3.11 Alocação das crianças nos grupos

A alocação da criança em um dos grupos era feita observando-se o sorteio prévio para aquele dia do mês.

### 3.12 Vacinação

#### 3.12.1 Vacinas utilizadas

Todas as vacinas foram produzidas pelo Instituto Butantan.

##### a) Vacina BCG (Lote: IB/BCG)

Disponibilizada em frascos de vidro âmbar na forma liofilizada de 10 doses e estocada em geladeira na temperatura entre 2° e 8°C. Após reconstituição em 1 mL de solução fisiológica 0,85%, continha por dose de 0,1 mL:

- BCG em suspensão (cepa Moreau): 0,1 mg
- Glutamato de sódio: 1,1 mg
- Solução fisiológica 0,85% q.s.p.: 0,1 mL

##### b) Vacina Butang<sup>®</sup> (Lote: 0308130B)

Disponibilizada na forma líquida em frascos de vidro transparente com 10 doses, armazenada em geladeira na temperatura entre 2° e 8°C. Continha em cada dose de 0,5 mL:

- Proteína de superfície do vírus de HB recombinante purificada: 10,0 µg
- Hidróxido de alumínio: 0,625 mg

- Timerosal: até 0,05 mg
- Solução fisiológica tamponada pH 7,0 q.s.p: 0,50 mL

**c) Vacina BCG/Butang<sup>®</sup> (Lote: IB0203)**

Disponibilizada em frascos de vidro âmbar na forma liofilizada de 10 doses e estocada em geladeira na temperatura entre 2° e 8°C. Após reconstituição em 1 mL de solução fisiológica 0,85%, continha por dose de 0,1mL:

- BCG em suspensão (cepa Moreau): 0,1 mg
- Glutamato de sódio: 1,1 mg
- Proteína de superfície do vírus de HB recombinante purificada: 10,0µg
- Solução fisiológica 0,85% q.s.p.: 0,1 mL

### **3.12.2 Esquema de vacinação**

**a) Grupo experimental**

- Primeira dose: BCG/Butang<sup>®</sup> ID nas primeiras 24 horas do nascimento.
- Segunda dose: Butang<sup>®</sup> IM com um mês de idade.
- Terceira dose: Butang<sup>®</sup> IM com seis meses de idade.

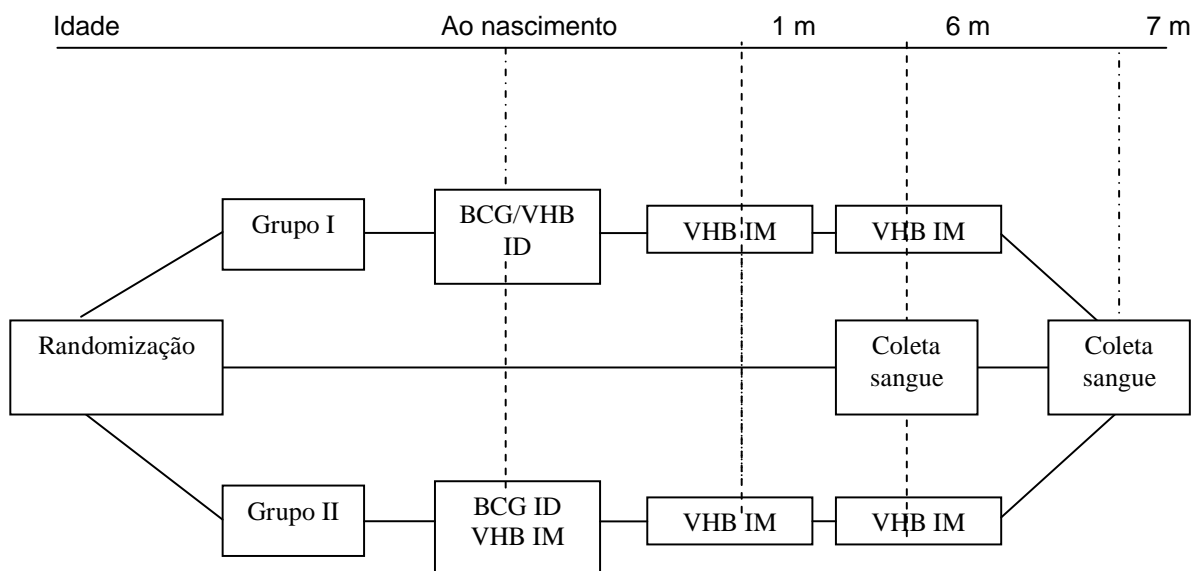
**b) Grupo controle**

- Primeira dose: BCG ID e Butang<sup>®</sup> IM nas primeiras 24 horas do nascimento.
- Segunda dose: Butang<sup>®</sup> IM com um mês de idade.



- Terceira dose: Butang<sup>®</sup> IM com seis meses de idade.

O esquema de vacinação para os grupos do estudo é apresentado na Figura 1.



**Figura 1.** Esquema de desenvolvimento do estudo: Grupo I - Vacinas Combinadas e Grupo II - Vacinas Separadas

### 3.12.3 Administração das vacinas

As vacinas foram administradas por vacinadores capacitados e com experiência quanto à técnica de administração de injeção IM em crianças. Para a aplicação das vacinas ID, foi realizada a capacitação dos vacinadores, conforme orientação do Informe Técnico "Treinamento na Técnica de Aplicação de BCG" (São Paulo, 2003)<sup>7</sup>.

A Butang<sup>®</sup> IM foi administrada na face ântero-lateral da coxa direita (terço médio do músculo vasto lateral), utilizando-se agulhas com 20 mm de comprimento por 0,55 mm de calibre. As vacinas BCG e BCG/Butang<sup>®</sup> ID foram

<sup>7</sup> [http://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc\\_tec/informebcg.pdf](http://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/informebcg.pdf)

administradas na inserção inferior do músculo deltóide do braço direito, utilizando-se agulhas com 13 mm de comprimento por 0,45 mm de calibre.

Todas as vacinas administradas foram registradas na ficha individual do participante e no Cartão de Imunização da Criança do PNI. Os pais ou responsáveis foram orientados para levar as crianças aos CSs, para que fossem administradas as outras vacinas previstas no calendário recomendado pelo PNI e para que as vacinas aplicadas pela equipe do estudo fossem registradas na ficha espelho da criança.

Foram confeccionadas etiquetas e coladas no Cartão de Imunização da Criança, chamando a atenção sobre sua participação no estudo, para evitar que ela fosse vacinada inadvertidamente com a VHB no CS.

#### **3.12.4 Armazenamento e transporte das vacinas**

Os frascos de vacinas enviados pelo IB foram estocados e conservados entre 2° e 8°C em geladeiras de uso exclusivo de vacinas, tanto no Laboratório de Imunologia do Ciped quanto nos locais de seleção dos participantes (Brasil, 2007a).

Durante todo o período do estudo, o transporte das vacinas do IB para o Ciped, do Ciped para os locais do estudo e, durante as visitas domiciliares, seguiram-se rigorosamente as normas de conservação de vacinas preconizadas pelo PNI (Brasil, 2007a).

### **3.13 Critérios de cumprimento do protocolo**

Foram considerados, na análise, todos os lactentes que completaram o seguinte protocolo:

- Aplicação da BCG e primeira dose da Butang<sup>®</sup>, separadas ou combinadas, com até 24 h de vida;
- Aplicação da segunda dose da Butang<sup>®</sup> com cerca de um mês de idade;
- Aplicação da terceira dose da Butang<sup>®</sup> com cerca de seis meses de idade;
- Coleta de amostra de sangue para sorologia de HB com cerca de sete meses de idade;
- Realização da dosagem de anticorpos para HB.

### **3.14 Instrumentos de coleta de dados**

Foram elaborados os seguintes instrumentos de coleta de dados (Anexo 2):

- Ficha de identificação dos pais
- Ficha de identificação do RN
- Ficha de registro de doses de vacina
- Ficha de eventos adversos à BCG
- Ficha de registro de visita domiciliar

### **3.15 Análise dos dados**

#### **3.15.1 Análise demográfica**

Foram apresentados dados relativos ao sexo, peso e comprimento ao nascimento de todos os participantes que aderiram ao protocolo.

Foram calculadas as médias, as medianas, as amplitudes e os desvios-padrão dos dados antropométricos dos RNs e das idades em que foram aplicadas as segundas e terceiras doses da Butang<sup>®</sup> e realizadas as coletas de sangue.

#### **3.15.2 Análise estatística**

Os dados foram analisados usando-se o software SPSS<sup>®</sup> for Windows 11.0<sup>8</sup> (Field, 2000).

#### **Avaliação da resposta imunogênica**

Para avaliação da resposta imunogênica, empregou-se como variável principal a comparação da proporção de indivíduos com título de anti-HBs  $\geq 10$  mUI/mL.

#### **Avaliação da não-inferioridade**

Para avaliação da não-inferioridade da vacina combinada, construiu-se o Intervalo de Confiança de 90% da diferença entre as proporções de soroproteção (IC90%), adotando-se 10% como a diferença importante ( $\Delta = - 10\%$ ). Sempre que

---

<sup>8</sup> SPSS Inc., Chicago, IL, USA, 2000.

o  $\Delta$  não estiver incluído na cauda inferior do IC90%, decide-se pela não-inferioridade (Blackwelder, 1995; Römel, 1998; Horne et al., 2001).

### **3.16 Procedimentos laboratoriais**

#### **3.16.1 Coletas de amostras de sangue**

Foram realizadas duas coletas de três mililitros de sangue periférico, imediatamente antes e cerca de 30 dias após a terceira dose da Butang<sup>®</sup>, utilizando-se *scalp* de 19 mm de comprimento e 0,64 mm de diâmetro. Para dosagem de antiHBs, o sangue foi colocado em tubo estéril com gel separador *vacutainer*, acondicionado em estante dentro de caixa térmica contendo gelo reciclável e transportado do domicílio do participante até o Laboratório de Imunologia do Ciped. Após centrifugação para separação do soro, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Imunologia do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.

As análises quantitativas de anti-HBs (em mIU/mL) foram realizadas pelos testes imunoenzimáticos (ELISA), utilizando reagente comercial padronizado (AXSYM AUSAB<sup>®</sup> ABBOTT GmbH Diagnostika - Laboratories, Park IL, USA). A soroproteção foi definida como títulos iguais ou acima de 10 mUI/mL (Mast et al, 2005). Os títulos foram classificados nas seguintes categorias: não-respondedores (anti-HBs < 10 mIU/mL), respondedores muito fracos (10 |- 50 mIU/mL), respondedores fracos (50 |- 100 mIU/mL), bons respondedores (100 |- 1000 mIU/mL) e muito bons respondedores ( $\geq$  1000 mIU/mL). Uma alíquota de todas as amostras coletadas foi armazenada no laboratório do Ciped a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### **3.16.2 Entrega de resultados de sorologias e encaminhamentos**

Os resultados das sorologias de HB foram comunicados por carta, endereçada aos pais ou responsáveis pelo participante. Para as crianças, cujos títulos de anticorpos foram inferiores a 10 mUI/mL, foi feita uma quarta dose de Butang<sup>®</sup> e, um mês após, colhida uma amostra de sangue para nova dosagem de anti-HBs.

### **3.17 Monitorização de eventos adversos pós-vacinação**

Evento adverso moderado foi definido como aquele que necessita de avaliação médica e exames complementares e/ou tratamento médico, mas não se inclui na categoria grave. Evento adverso grave, como aquele que resulte em hospitalização por mais de 12 horas, em disfunção ou incapacidade significativa e/ou persistente, em óbito ou em risco de morte (Brasil, 2007b).

Os pais foram orientados a comunicar, por telefone, à coordenadora de campo qualquer evento indesejável, local ou sistêmico e a procurar o Pronto-Socorro do Hospital de Clínicas da Unicamp, quando necessário, onde a criança seria acompanhada por um dos médicos da equipe do estudo e receberia atendimento pela equipe do serviço.

Durante as visitas domiciliares para administração da segunda dose e da terceira dose da Butang<sup>®</sup> e da segunda coleta de sangue, os pais ou responsáveis foram questionados sobre intercorrências no período, que poderiam se relacionar com a vacina aplicada anteriormente. O local da aplicação ID (BCG ou BCG/Butang<sup>®</sup>) era examinado e registrados os sinais do estágio de inflamação.

Esperava-se que, com um mês de idade, a lesão estivesse no estágio de pústula e, com seis meses, completamente cicatrizada, com a cicatriz vacinal visível.

### **3.18 Operacionalização do trabalho de campo**

#### **3.18.1 Equipe de campo**

- Coordenação e supervisão: uma enfermeira.
- Seleção, entrevista e vacinação durante quatro meses: uma enfermeira e uma técnica de enfermagem - 20 horas semanais cada (Maternidade de Campinas) e duas enfermeiras - 20 horas semanais cada (Caism).
- Visitas domiciliares durante 18 meses para vacinação, coleta de dados sobre eventos adversos e coletas de sangue: três a quatro auxiliares de enfermagem - 20 h semanais cada.
- Agendamento de retornos: uma estudante - 30 h semanais.
- Transporte: serviço particular contratado.

#### **3.18.2 Atividades preliminares ao trabalho de campo**

Antes do início do trabalho de campo, foram apresentados os objetivos e feitos esclarecimentos sobre todas as etapas do desenvolvimento do estudo aos gestores da Secretaria Municipal de Saúde (SMS), da Maternidade de Campinas e do Caism. Os gestores dos hospitais e da SMS divulgaram as informações entre os trabalhadores da saúde, os quais contribuíram na orientação dos pais sobre os

procedimentos do estudo, no preenchimento de alguns formulários da pesquisa e no apoio aos profissionais de campo.

A capacitação dos profissionais de campo, selecionados entre os trabalhadores dos hospitais e dos CSs, envolveu a orientação sobre o projeto, leitura e entendimento dos formulários, treinamento para coleta de dados e para a administração das vacinas.

Para a identificação inicial das crianças elegíveis para o estudo, foi confeccionado um formulário para o Caism, que deveria ser preenchido quando da admissão da parturiente (Anexo 3). Na Maternidade, era solicitada para a mãe a autorização para a aplicação de vacinas no RN ao nascimento.

### **3.18.3 Desenvolvimento do trabalho de campo**

Nas primeiras 24 h após o parto, as profissionais de campo verificavam se o RN poderia ser incluído no estudo, baseado nos dados de nascimento (idade gestacional, peso do RN), nos resultados de sorologias da mãe (do cartão de pré-natal), nas ocorrências durante o parto (do prontuário da mãe) e no estado de saúde do RN (do prontuário da criança), considerando os critérios de inclusão e não-inclusão. Se a criança preenchesse esses critérios, fazia-se uma entrevista com a mãe, quando eram abordados os seguintes aspectos:

- a importância epidemiológica das doenças evitáveis pelas vacinas em estudo;
- quais as vacinas usadas até o momento no controle dessas doenças;
- a importância da produção nacional e da combinação de vacinas;



- os objetivos do estudo;
- a segurança da criança: que os eventos adversos seriam monitorados e que haveria retaguarda médica disponível para atendimento de possíveis complicações ou para esclarecimentos;
- que as vacinas utilizadas no estudo já são usadas na rotina do PNI e que os riscos para a criança, inerentes ao uso de vacinas, são muito menores do que o das doenças correspondentes;
- que as vacinas são controladas, armazenadas e transportadas conforme as normas do PNI, assegurando sua qualidade;
- a necessidade de alocar a criança, por sorteio, em um dos diferentes grupos;
- a necessidade de coleta de sangue;
- o acompanhamento pediátrico e as outras vacinas do calendário básico que deveriam ser feitos no CS onde a família está adscrita;
- e que todas as informações obtidas pelo estudo seriam confidenciais e a participação seria voluntária, podendo ser interrompida a qualquer momento sem penalidades ou perda de benefícios aos quais tenha direito.

Após a entrevista, com a concordância da participação da criança no estudo, era oferecido o TCLE para ser assinado.

Em seguida, era informado à mãe em qual grupo seu filho estava alocado, quais vacinas seriam administradas, as possíveis reações adversas e a evolução da reação inflamatória no local da aplicação da BCG. Era também preenchida a

Ficha de Identificação com as informações da mãe e, posteriormente, completada com os dados do prontuário da mãe e da criança.

Finalmente, eram administradas as vacinas, conforme o protocolo do estudo. Combinava-se com a mãe sobre a informação de possíveis reações e sobre a visita domiciliar para a próxima dose da Butang<sup>®</sup>, agendada para quando a criança estivesse com cerca de 30 dias de vida. As vacinas eram registradas na Ficha de Identificação e no Cartão da Criança, onde era também colocado o adesivo de identificação de participante da pesquisa.

Todos os prontuários dos participantes eram guardados no Ciped e, após cada contato, eram conferidos pela Coordenadora, que checava todos os instrumentos de coleta de dados, buscando campos não preenchidos, inconsistências ou dados incompletos. Caso necessário, entrava-se em contato com a família para complementação ou correção das informações.

Durante a visita para a segunda dose, os pais ou responsáveis eram questionados sobre a saúde da criança, ocorrências médicas, medicamentos utilizados nos 30 dias anteriores e reações adversas após a primeira dose das vacinas. A reação local ao BCG era examinada e era anotado o estágio em que se encontrava. Se não houvesse qualquer impedimento, a Butang<sup>®</sup> era administrada, o familiar era orientado quanto às reações adversas e lembrado sobre a próxima visita aos seis meses de idade para a terceira dose de vacina e para a coleta da primeira amostra de sangue. A vacina administrada era registrada no Cartão da Criança e na Ficha de Identificação.

A família era novamente lembrada da terceira dose de vacina e da coleta de sangue em dias anteriores à data da visita domiciliar. Caso os pais solicitassem que os procedimentos fossem realizados na instituição em que a criança estivesse

frequentando, solicitava-se que deixassem autorização por escrito com os responsáveis do local.

Repetiam-se os mesmos passos da visita anterior e, antes da administração da terceira dose de Butang<sup>®</sup>, eram colhidos três mL de sangue de veia periférica para a dosagem de anticorpos para HB. Após, era administrada a vacina, feitas as orientações e programada a visita de encerramento, quando seria feita a coleta da segunda amostra de sangue e encerrada a participação da criança nessa etapa da pesquisa. As anotações eram feitas no Cartão da Criança e na Ficha de Identificação e a profissional de campo verificava se todas as outras doses previstas no calendário vacinal tinham sido feitas no CS. Em caso de atraso, os pais eram orientados a levar a criança para atualização das vacinas.

Na última visita aos sete meses de idade, eram repetidos os questionamentos sobre saúde, ocorrências e eventos adversos e colhida a segunda amostra de sangue. Os pais eram esclarecidos sobre o encaminhamento dos resultados dos exames e sobre a necessidade de repetir a vacinação e a coleta, no caso de não haver resposta de anticorpos protetora.

#### **3.18.4 Visitas domiciliares**

A opção por continuar os procedimentos da pesquisa no domicílio teve como objetivos minimizar as perdas, não interferir na rotina de vida da família, no vínculo da família com a equipe dos CSs, no esquema vacinal e no acompanhamento de saúde da criança.

Para a realização desses procedimentos, as crianças foram agrupadas por Distritos de Saúde, o que permitiu um melhor aproveitamento das visitas

domiciliares. Dois dias antes da data agendada, os pais eram contatados por telefone, para lembrá-los sobre a visita. Procurou-se sempre realizá-la no horário mais conveniente e no local indicado pela família.

Para facilitar a localização das famílias, foram anotadas informações detalhadas dos pais (nome completo, apelidos, endereço residencial e de trabalho, com pontos de referência), telefones (residencial, celular, comercial), instituição que a criança iria frequentar e telefones de parentes próximos e contatos.

As auxiliares de campo foram orientadas a retornar nos domicílios das crianças quantas vezes fossem necessárias para cumprir o estabelecido para aquela data. Foram realizadas 1.800 visitas a famílias moradoras em todas as regiões do município e em cidades da região metropolitana de Campinas, perfazendo um total de cerca de 45.000 Km. Com isso, foi possível reduzir as perdas de seguimento, que, em 67% dos casos, ocorreram por mudanças das famílias para outros municípios.

### **3.19 Aspectos éticos**

Todos os procedimentos desse estudo obedeceram às recomendações para pesquisas biomédicas envolvendo humanos conforme recomendação da Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996 do Conselho Nacional de Saúde. Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp (Parecer 135/2002 ) (Anexo 4) e teve apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-Fapesp (Processo 02/05666-2).



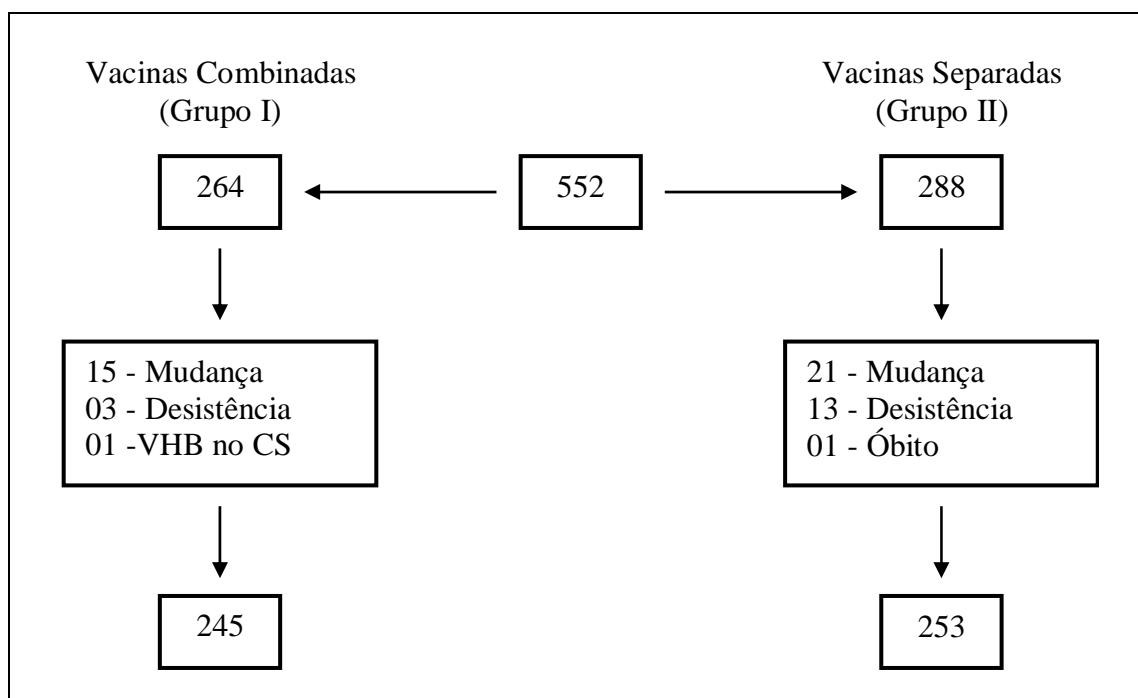
## **4. RESULTADOS**





#### 4.1 Participantes do estudo

Dos 552 RNs inicialmente selecionados, 498 lactentes cumpriram o protocolo do estudo. Destes, 245 (116 do sexo masculino e 129 do sexo feminino) foram vacinados, ao nascimento, com as vacinas BCG e Butang<sup>®</sup> combinadas (Grupo I) e 253 (146 do sexo masculino e 107 do sexo feminino) com as vacinas BCG e Butang<sup>®</sup> separadas (Grupo II) (Figura 2).



**Figura 2.** Número de crianças selecionadas, de crianças que concluíram o estudo e motivos de abandono.

#### 4.2 Exclusão do estudo e perdas de seguimento

Foram excluídos do estudo um lactente do Grupo I por ter tomado VHB no Centro de Saúde e um pertencente ao Grupo II que foi a óbito aos dois meses de idade por bronquite aguda não especificada, insuficiência respiratória aguda e broncopneumonia. Com relação às perdas, verificou-se que 15 crianças do Grupo



I e 21 do Grupo II abandonaram o estudo por mudança de cidade, enquanto que três responsáveis por lactentes do Grupo I e 13 do Grupo II desistiram de continuar na pesquisa. Considerando o total de participantes selecionados, a perda de seguimento foi de 9,8% (Figura 2).

### 4.3 Peso e comprimento ao nascimento

A média do peso e do comprimento ao nascimento das crianças do Grupo I foi de 3.299 g e 49,1 cm, respectivamente. No Grupo II, foi de 3.331 g e 49,2 cm, respectivamente. Esses resultados, apresentados na Tabela 1, mostram uma distribuição balanceada entre os sujeitos dos dois grupos.

**Tabela 1** - Distribuição do peso (gramas) e comprimento (centímetros) dos lactentes vacinados ao nascimento com as vacinas BCG e Butang<sup>®</sup>, combinadas ou separadas

	<b>N</b>	<b>Média</b>	<b>DP<sup>(1)</sup></b>	<b>Mínimo</b>	<b>Mediana</b>	<b>Máximo</b>
<b>Peso</b>						
Grupo I	245	3.279	454	2.185	3.220	4.770
Grupo II	253	3.331	416	2.155	3.310	4.755
<b>Comprimento</b>						
Grupo I	245	49,1	1,8	45,0	49,0	53,5
Grupo II	253	49,2	1,9	44,5	49,5	53,4

(1) – DP: Desvio padrão

#### 4.4 Idade no momento da segunda e terceira doses e intervalo entre doses

A Tabela 2 mostra as médias e os desvios-padrão das idades dos lactentes na segunda e terceira doses da vacina. O intervalo entre a administração da primeira e da segunda dose variou de 23 a 61 dias, com média de  $32 \pm 4$  dias em ambos os grupos e, entre a aplicação da primeira e terceira dose, de 173 a 243 dias para os dois grupos, com média de  $187 \pm 7$  dias. O intervalo entre a aplicação da terceira dose e a coleta da segunda amostra de sangue variou entre 27 a 107 dias com média de  $38 \pm 10$  dias (Tabela 3). Esses resultados mostram que as vacinas foram realizadas nas datas preconizadas pelo PNI e as coletas de sangue de acordo com o cronograma do estudo.

**Tabela 2** - Distribuição da idade (dias) dos lactentes no momento da segunda e da terceira doses da vacina Butang®.

	<b>N</b>	<b>Média</b>	<b>DP<sup>(1)</sup></b>	<b>Mínimo</b>	<b>Mediana</b>	<b>Máximo</b>
Idade na 2ª dose						
Grupo I	245	33,1	4,5	24	33	61
Grupo II	253	32,2	3,8	23	32	49
Idade na 3ª dose						
Grupo I	245	188,1	7,0	178	186	244
Grupo II	253	187,4	6,9	173	186	228

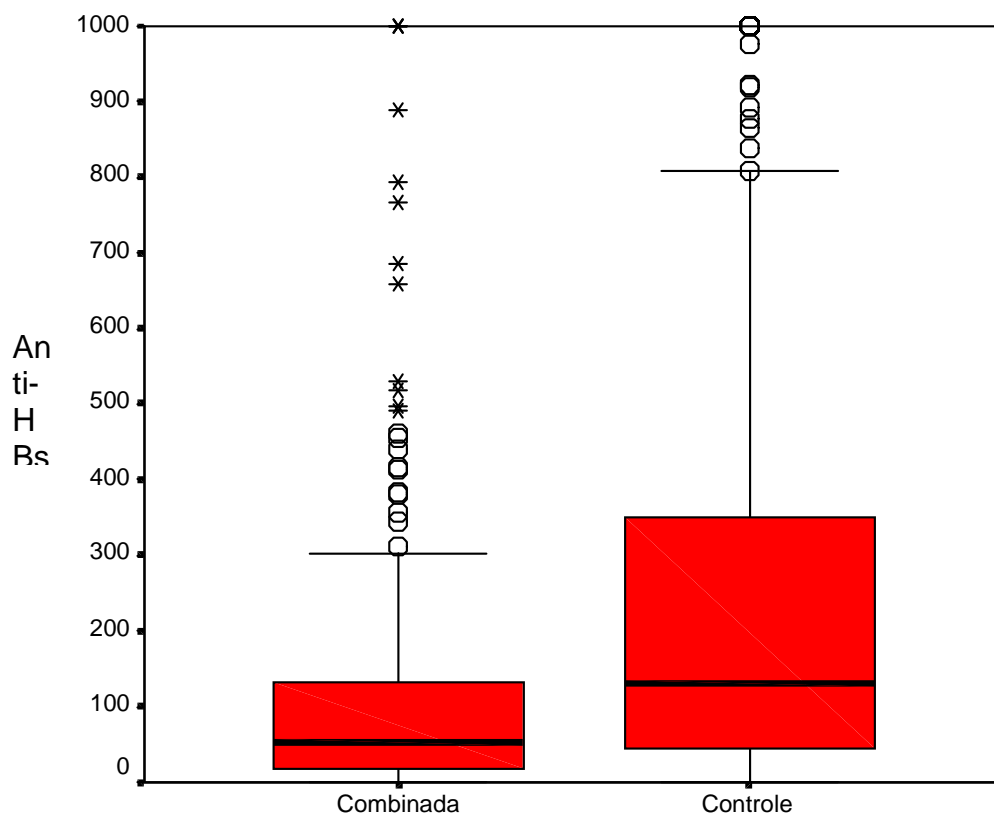
**Tabela 3** - Distribuição do tempo decorrido (dias) entre a administração da primeira e segunda e entre a primeira e a terceira dose da vacina Butang<sup>®</sup> e entre a terceira dose e a segunda coleta de amostra de sangue.

	<b>N</b>	<b>Média</b>	<b>DP<sup>(1)</sup></b>	<b>Mínimo</b>	<b>Mediana</b>	<b>Máximo</b>
Tempo entre as doses 1 e 2						
Grupo I	245	32,4	4,4	23	32	61
Grupo II	253	31,6	3,9	23	31	48
Tempo entre as doses 1 e 3						
Grupo I	245	187,5	7,0	177	186	243
Grupo II	253	186,8	6,9	173	186	228
Tempo entre dose 3 e 2 <sup>a</sup> coleta						
Grupo I	245	38	10	30	34	88
Grupo II	253	38	11	27	34	107

(1) – DP : Desvio padrão

#### 4.5 Avaliação da resposta imunogênica

A Figura 3 mostra a distribuição dos títulos de anti-HBs de ambos os grupos e a Tabela 4, as taxas de soroconversão de anti-HBs no soro de amostras de sangue dos lactentes, colhidas imediatamente antes da aplicação da terceira dose de Butang<sup>®</sup>. Observou-se que no Grupo I, 83,1% das crianças obtiveram títulos maiores que 10 mUI/mL, enquanto que, entre aquelas do Grupo II, isso ocorreu em 91,9%. A diferença entre o Grupo I e o Grupo II é de - 8,8% [IC90%: - 13,7% a -3,9%]. Como o limite inferior do IC90% inclui o  $\Delta = -10\%$ , podemos concluir que, nesse momento, com esse ponto de corte, as vacinas BCG e Butang<sup>®</sup> combinadas são inferiores às vacinas aplicadas separadamente.

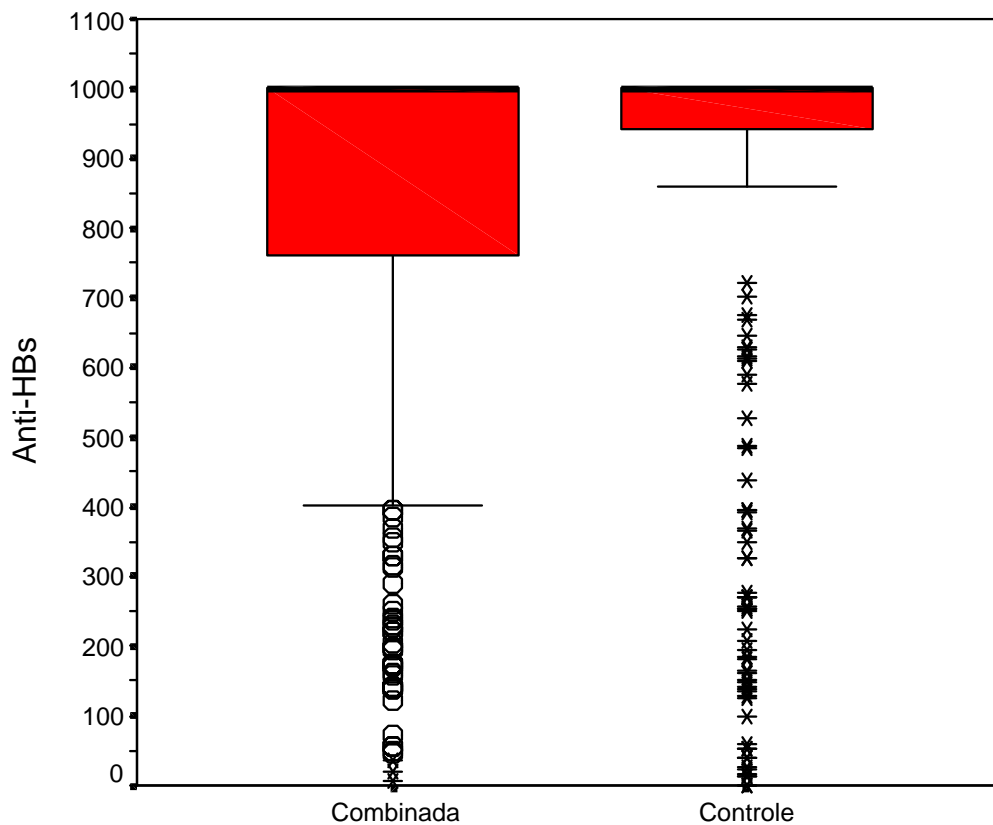


**Figura 3** - Distribuição dos títulos de anti-HBs (mUI/mL) dos lactentes vacinados ao nascimento com as vacinas BCG e Butang<sup>®</sup>, combinadas ou separadas, após a segunda dose da vacina Butang<sup>®</sup>

**Tabela 4** - Distribuição de títulos de anti-HBs (mUI/mL) dos lactentes vacinados ao nascimento com as vacinas BCG e Butang<sup>®</sup>, combinadas ou separadas, após a segunda dose da vacina Butang<sup>®</sup>

		Anti-HBs (mUI/mL)				
		< 10	10   - 50	50   - 100	100   - 1000	≥ 1000
Grupo I (n=237)	N	40	77	44	73	3
	%	16,9	32,5	18,6	30,8	1,3
Grupo II (n=248)	N	20	46	44	114	24
	%	8,1	18,5	17,7	46,0	9,7

A Figura 4 mostra a distribuição dos títulos de anti-HBs após a terceira dose da Butang<sup>®</sup>. As taxas de soroconversão de anti-HBs no soro das amostras de sangue mostraram que, no grupo das vacinas combinadas, 99,6% das crianças obtiveram títulos  $\geq 10$  mUI/mL, enquanto que entre as crianças vacinadas com as vacinas separadas o percentual foi de 99,2. A diferença entre as combinadas e as separadas é de 0,4% [IC90%: -0,8% a 1,5%]. Como o limite inferior do IC90% não inclui o  $\Delta = -10\%$ , podemos concluir que, com esse ponto de corte, a vacina BCG e Butang<sup>®</sup> combinadas não são inferiores às vacinas aplicadas separadamente (Tabela 5).



**Figura 4** - Distribuição dos títulos de anti-HBs (mUI/mL) dos lactentes vacinados ao nascimento com as vacinas BCG e Butang<sup>®</sup>, combinadas ou separadas, após a terceira dose da vacina Butang<sup>®</sup>

**Tabela 5** - Distribuição de títulos de anti-HBs (mUI/mL) dos lactentes vacinados ao nascimento com as vacinas BCG e Butang<sup>®</sup>, combinadas ou separadas, após a terceira dose da vacina Butang<sup>®</sup>

		Anti-HBs (mUI/mL)				
		< 10	10  - 50	50  - 100	100  - 1000	≥ 1000
Grupo I (n=245)	N	1	4	3	61	176
	%	0,4	1,6	1,2	24,9	71,8
Grupo II (n=253)	N	2	7	4	55	185
	%	0,8	2,8	1,6	21,7	73,1

#### 4.6 Eventos adversos

Os pais ou responsáveis pelos participantes do estudo não informaram nenhum evento adverso grave relacionado com a Butang<sup>®</sup>.

Dois participantes (um do Grupo I e um do Grupo II) desenvolveram úlcera maior que um centímetro no local da aplicação da vacina BCG. Após a terceira dose, a criança do Grupo I obteve título de anti-HBs  $\geq 1.000$  mUI/mL e, a do Grupo II, 162,6 mUI/mL. Com exceção de uma, todas as crianças, desenvolveram cicatriz permanente no local de aplicação da vacina BCG.



## 5. DISCUSSÃO







Diversas combinações de vacinas contendo o antígeno da HB têm sido estudadas e aprovadas. Pesquisas mostraram que é possível combinar a VHB com a da Hepatite A, da Difteria, do Pertussis total ou acelular, do Tétano, do *Haemophilus influenzae tipo b* e do poliovírus inativado. Essas combinações, aplicadas por via IM, apresentaram imunogenicidade satisfatória para todos os antígenos e eventos adversos leves, do mesmo modo que quando aplicadas separadamente (Thoelen, 1999; Czeschinski, 2000; Santos, 2002; Dodd, 2003; Mallet, 2004; Zepp, 2004; Pichichero, 2007).

Esse é o primeiro estudo que demonstrou que a VHB combinada com a BCG e aplicada por via ID como primeira dose, ao nascimento, é imunogênica e segura. Os resultados dessa pesquisa mostraram que as vacinas combinadas não foram inferiores às aplicadas separadamente e que, aproximadamente um mês após a terceira dose da VHB, 99,5% das crianças, que receberam as combinadas e 99,2%, as separadas, obtiveram títulos de anti-Hbs  $\geq 10$  mUI/mL. Dessas, 97,1% no Grupo I e 94,8% no Grupo II foram boas ou muito boas respondedoras e somente três crianças não ficaram protegidas após o esquema vacinal com três doses. Esses resultados foram ainda melhores que os obtidos por Martins et al. (2004) em que, após três doses da Butang<sup>®</sup> IM, 93,7% das crianças apresentaram títulos protetores.

Várias pesquisas sobre a imunogenicidade e segurança da VHB aplicada por via ID em crianças e adultos mostram resultados contraditórios. Algumas concluíram que a VHB ID em baixas doses induz à imunidade menor que a aplicada por via IM (Turchi, 1997; Boccato 1999; Gomber, 2004), enquanto Baldy (2003) mostrou que, embora não seja tão imunogênica, houve alta proporção de títulos protetores (Baldy, 2003). Há também estudos demonstrando que a VHB ID

em baixas doses manteve altos títulos de anti-HBs após vários anos do esquema vacinal de três doses (Egemen, 1998; Henderson, 2000; Kurugöl, 2001; Elisbão, 2003; Ghabouli, 2004).

Pesquisa realizada na Turquia com 200 lactentes e pré-escolares saudáveis vacinados com três doses de VHB recombinante francesa (2 µg), por via ID, mostrou que 97% deles desenvolveram títulos de anticorpos  $\geq 10$  mUI/mL e que, após cinco anos, 87% mantiveram títulos protetores. Além disso, não foi verificado nenhum caso de HB aguda ou crônica entre as crianças. Aqueles com anti-HBs  $< 10$ , após receberem uma dose adicional de 10 µg da VHB IM, apresentaram um rápido aumento nos níveis de anticorpos ( $> 1000$  mUI/mL), evidenciando a presença de memória imunológica (Kurugöl, 2001).

Adultos vacinados intradermicamente com três doses (zero, um, seis meses) de uma VHB belga recombinante (2 µg) e que apresentaram soroconversão não desenvolveram HB aguda ou crônica. Após oito anos do esquema vacinal, 82,4% deles ainda mantinham títulos protetores de anti-HBs e os com títulos abaixo de 100 mUI/mL receberam mais uma dose de 2 µg de VHB ID. Após um mês, observou-se soroconversão nos não-respondedores e aumento dos títulos de anticorpos nos respondedores fracos, demonstrando persistente proteção contra a doença e desenvolvimento de memória imunológica (Elisbão, 2003).

Os resultados de Coursaget et al. (1992) sobre administração simultânea de VHB IM e BCG ID, ao nascimento, não interferiram na cicatriz da BCG nem nos títulos de anti-HBS, como também não foram observadas reações adversas.

Noutro estudo, a produção de anti-HBs foi significativamente maior nas crianças vacinadas com BCG e VHB ao nascimento, do que naquelas que não receberam a BCG. Esse efeito foi aparente já aos dois meses de idade e apresentou seu valor máximo após as três doses da VHB. Ao contrário, a BCG aplicada ao mesmo tempo que a segunda dose da VHB aos dois meses não influenciou a resposta de anticorpos da VHB. Esses resultados demonstraram que a BCG, quando administrada ao nascimento, aumenta significativamente a resposta de células T e B efectoras para outras vacinas (Ota et al, 2002).

As CDs residentes na epiderme têm várias funções na resposta imune. São eficientes na indução de células TCD8<sup>+</sup> citotóxica com maior avidéz, são ativadoras de células TCD4<sup>+</sup> virgens, induzem a produção de IFN $\gamma$  (Th1) como também de IL-4, IL-5 e IL-13 (Th2) e são ativadoras da proliferação e diferenciação de Linfócitos T e B de memória. As CDs intersticiais da derme são particularmente eficientes na indução da diferenciação das células B virgens em células plasmáticas que secretam imunoglobulina M (IgM) e de células TCD4<sup>+</sup> que interagem com as células B para a produção de IgG (Ueno et al., 2007).

A expectativa desse ensaio foi que a combinação da Butang<sup>®</sup> com a BCG ID resultaria numa resposta imunológica protetora para HB, tanto pela proximidade com as CDs, quanto pela habilidade da BCG em instruir resposta de padrão Th1.

Não foi objetivo desse estudo demonstrar a resposta imune celular da Butang<sup>®</sup>. No entanto, em estudo realizado por Mazzola et al. (2007), com uma subamostra de lactentes desse grupo, utilizando ensaio de proliferação de linfócitos baseado em citometria de fluxo, verificou-se que a proliferação de Linfócitos TCD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e  $\gamma\delta^+$  e a concentração de IL-10, IL-12, IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$  BCG-específicas foram similares para ambos os grupos. Assim, infere-se que a

combinação BCG/Butang<sup>®</sup> foi tão imunogênica quanto a dessas vacinas administradas separadamente.

Apesar dos benefícios indiscutíveis das vacinas no controle de doenças, eventos adversos podem ocorrer após a aplicação das mesmas. De modo geral, são locais e sistêmicos leves, ocorrendo, excepcionalmente, eventos moderados e graves, que devem ser notificados e monitorados (Brasil, 2007b).

O sistema de vigilância de EAI mostrou que, assim como descrito na literatura para a BCG e VHB aplicadas separadamente (Brasil, 2007b), essas vacinas combinadas se mostraram altamente seguras, não havendo registro de quaisquer eventos adversos. No local da aplicação da vacina BCG, dois participantes (um do Grupo I e um do Grupo II) desenvolveram úlcera maior que um centímetro, que evoluiu naturalmente para cicatrização, não havendo necessidade de uso de medicação específica. Após a terceira dose da Butang<sup>®</sup>, essas crianças estavam protegidas, apresentando títulos de anti-HBs  $\geq 1.000$  mUI/mL e 162,6 mUI/mL (Grupo I e Grupo II, respectivamente). A cicatriz no local de aplicação da vacina, encontrada em cerca de 95% dos vacinados com BCG (Brasil, 2007b), ocorreu em todas as crianças do estudo, com exceção de uma que, após os seis meses de idade, foi encaminhada ao CS para revacinação, conforme as normas do PNI (Brasil, 2001). A ausência da cicatriz vacinal, não comprometeu a resposta à Butang<sup>®</sup>, pois essa criança obteve título de anti-HBs = 806,1 mUI/mL.

Embora não tenham sido relatados EAI, em nenhum dos grupos, sabe-se que o hidróxido de alumínio, apesar de ser o único adjuvante permitido para uso em humanos e ser excelente para manter o antígeno no tecido, pode ter ação neurotóxica e desencadear reações locais e sistêmicas de variados graus como

dor, vermelhidão, inchaço e febre (Françoís et al, 2005). Portanto, outra vantagem da combinação das vacinas é a eliminação desse adjuvante na primeira dose, podendo contribuir, ainda mais, para a diminuição de efeitos indesejados.

A estratégia de campo adotada nesse ensaio garantiu pouca interferência na rotina de vida das famílias, no seguimento pediátrico e na vacinação da criança e permitiu uma adesão de 90,2% dos participantes.

Embora haja dificuldades na realização desse tipo de estudo, seja pelas perdas de acompanhamento dos sujeitos ou pelos altos custos, verificou-se que este foi bem sucedido, entre outros fatores, pela parceria entre o grupo de pesquisadores e os gestores e trabalhadores da Secretaria Municipal de Saúde e da Maternidade de Campinas, que participaram apoiando, esclarecendo e divulgando o projeto, cedendo espaço físico e permitindo a inclusão das atividades da pesquisa na rotina dos serviços.

A participação de profissionais dos próprios locais onde o estudo foi desenvolvido foi de grande importância, pois o conhecimento da rotina dos serviços e o vínculo com a população usuária facilitaram a seleção e o acompanhamento dos participantes.

Perdas de acompanhamento em estudos prospectivos são inevitáveis, mesmo naqueles adequadamente planejados e bem desenvolvidos. Ainda não há um critério universal aceitável para perdas. Para estudos clínicos de intervenção terapêutica com novas drogas, existe a sugestão de que perdas menores que 5% não são preocupantes, enquanto que as maiores que 20% podem incorrer em sérios problemas de validade interna do estudo (Feltrell et al., 2008). Além do comprometimento e atraso na obtenção dos resultados, grandes perdas de

seguimento levam também ao desperdício de recursos e consequente elevação do custo das pesquisas.

Janson et al., (2001) entrevistaram participantes de um grande estudo multicêntrico e verificaram que os que abandonaram o protocolo referiram como motivos a interferência com o trabalho, a perda de tempo, os formulários difíceis de serem preenchidos e a dificuldade em reagendar as visitas devido à falta de flexibilidade da equipe do estudo. As razões para completar o protocolo foram a remuneração, o compromisso com a equipe e a crença na importância do estudo.

As perdas ocorridas em alguns estudos clínicos com vacinas do PNI foram variáveis (de 0 a 54%), tendo como causas a ocorrência de doenças nos participantes, EAI, mudança de cidade, desistência de continuar no estudo, dificuldades de localização da família, ter recebido vacina fora do estudo, violação do critério de inclusão/exclusão, entre outras (Clemens et al., 2003; Baldy et al., 2004; Martins et al., 2004, Isolani et al., 2006; Oliveira et al., 2006; Costa et al., 2007; Martins et al., 2008). Em estudos desenvolvidos em CSs, as falhas de seguimento foram nulas ou bastante reduzidas, mesmo naquele com 1.000 participantes acompanhados por pelo menos sete meses. Provavelmente, a facilitação de acesso dos participantes aos serviços e a maior proximidade da equipe de campo com as famílias garantiram esse sucesso (Isolani et al., 2006; Martins et al., 2008).

Nesse estudo, adotaram-se diversos procedimentos visando minimizar as perdas. Além de buscar garantir a compreensão dos familiares sobre o objeto, os produtos e os procedimentos do estudo, procurou-se respeitar as particularidades da rotina de vida de cada família.

Com informações detalhadas sobre endereços e telefones próprios, de vizinhos, parentes e cuidadores, referências dos locais de moradia, do trabalho do pai e da mãe, instituição que a criança iria frequentar, além da persistência dos profissionais de campo para cumprir as atividades programadas, as perdas de seguimento foram de somente 9,8%.

Os contatos telefônicos frequentes com os familiares, as visitas, a administração das vacinas e as coletas de sangue realizadas nos domicílios também ajudaram no contorno das perdas, que, em 67%, dos casos ocorreram por mudanças das famílias para outros municípios.

A participação da coordenadora de campo em todas as etapas da pesquisa, integrando os diversos grupos participantes (das famílias, da SMS, dos hospitais, de campo, de laboratório e de banco de dados e estatística) foi fundamental para o cumprimento dos objetivos do estudo.

A vacinação é, sem dúvida, uma das medidas sanitárias mais eficazes na prevenção de doenças de relevância (Ehreth, 2003; Ponte, 2003) e o desenvolvimento autóctone de vacinas e o aperfeiçoamento dos produtos já utilizados no país, pelos laboratórios produtores nacionais, dentro dos padrões de qualidade nacionais e internacionais, estão entre as medidas indispensáveis para dar suporte às políticas do PNI. Assim, além dos laboratórios produtores, as universidades e os institutos de pesquisa devem estar envolvidos para a

geração de conhecimentos estratégicos, essencial para a manutenção da competência na área; formulação e execução de políticas públicas; geração de oportunidades de desenvolvimento econômico e social (Brasil, 2005, p.204).



O presente estudo permite concluir que a Butang<sup>®</sup> combinada com a BCG e administrada por via ID como primeira dose, induz à resposta de anticorpos para HB, similar à das vacinas aplicadas separadamente e apresenta o mesmo perfil de segurança. A combinação dessas vacinas poderá contribuir para a diminuição dos custos de produção, para a simplificação do calendário vacinal, para a diminuição do número de injeções, para aumentar a aceitação dos pais e para o aumento da cobertura vacinal.

## **6. CONCLUSÕES**





Os resultados sugeriram que:

- a vacina Butang<sup>®</sup> sem adjuvante combinada à BCG, administrada por via ID em recém-nascido, como primeira dose, mostrou imunogenicidade similar à da Butang<sup>®</sup> com adjuvante (hidróxido de alumínio) aplicada por via IM;
- a vacina Butang<sup>®</sup> sem adjuvante e a vacina BCG combinadas e administradas por via ID em recém-nascido, como primeira dose, são seguras, pois não provocaram nenhum evento adverso.



## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**





Abbas AK, Lichtman AH. Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imunológico. 2a ed. Rio de Janeiro: Ed. Elsevier; 2007.354p.

American Academy of Pediatrics. Combination vaccines for childhood immunization: recommendations of Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), the American Academy of pediatrics (AAP), and the American Academy of Family Physicians. Pediatrics 1999; 103(5):1064-76.

Arístegui J, Usonis V, Coovadia H, Reidemann S, Win KM, Gatchalian S, Bock HL. Facilitating the WHO Expanded Program of Immunization: the clinical profile of a combined diphtheria, tetanus, pertussis, hepatitis b and Haemophilus influenzae type b vaccine. Int J Infect Dis 2003; 7:143-51.

Ascherio A, Zhang SM, Héran MA, Olek MJ, Coplan PM, Brodovickz K et al. Hepatitis B vaccination and the risk of multiple sclerosis. N Engl J Med 2001; 344(5):327-32.

Baldy JLS, Elisbão MCM, Anzai ET, Pontello R, Reiche EMV, Zaha-Inouye MM et al. Vacina intradérmica de adultos com três baixas doses (2µg) de vacina recombinante contra hepatite b. I. Taxa de soroconversão e efeitos adversos. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98(8):1101-7.

Baldy JLS, Lima GZ, Morimoto HK, Reiche EMV, Matsuo T, Mattos ED e Sudan LCP. Immunogenicity of three recombinant Hepatitis B vaccines administered to students in three doses containing half the antigen amount routinely used for adult vaccination. Rev. Inst. Med. Trop S. Paulo 2004; 46(2):103-7.

Benévolo-de-Andrade TC, Monteiro-Maia R, Cosgrove C, Castello-Branco LRR. BCG Moreau Rio de Janeiro - An oral vaccine against tuberculosis - Review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005; 100(5):459-65.

Blackwelder WC. Similarity/equivalence trials for combination vaccines. Annals New York Academy of Sciences 1995; 754:329-46.



Bocato RSBS. Avaliação da resposta imunológica à vacina contra a hepatite b aplicada pelas vias intradérmica ou intramuscular em profissionais da saúde de Hospital Universitário: seguimento de cinco anos. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 1999; 32(1):75-7.

Braga WSM, Brasil LM, Souza RAB, Melo MS, Rosas MD, Castilho MC et al. Prevalência da infecção pelos vírus da hepatite B (VHB) e da hepatite Delta (VHD) em Lábrea, Rio Purus, Estado do Amazonas. Epidemiologia e Serviços de Saúde 2004; 13(1):35-46.

Brasil. Ministério da Saúde - Fundação Nacional da Saúde. Manual de procedimentos para vacinação. 279p. Brasília (DF); 2001a.

Brasil. Ministério da Saúde - Fundação Nacional da Saúde. Manual de normas de vacinação. 58p. Brasília (DF); 2001b.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Imunizações - 30 anos. 212p. Brasília (DF); 2005.

Brasil. Ministério da Saúde - Fundação Nacional da Saúde - Manual de rede de frio. 129p. Brasília (DF); 2007a.

Brasil. Ministério da Saúde - Fundação Nacional da Saúde - Manual de eventos adversos pós-imunizações. 279p. Brasília (DF); 2007b.

Brasil. Ministério da Saúde. Cobertura vacinal. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?pn/cnv/cpniuf.def>. Acesso em 2008a.

Campinas. Secretaria do Planejamento e Desenvolvimento Urbano. Campinas em números. Disponível em:

<http://www.campinas.sp.gov.br/seplan/cidade/portcidade.htm>. Acesso em 2007.

Campinas. Secretaria Municipal de Saúde. SUS em Campinas. Disponível em: <http://www.campinas.sp.gov.br/saúde>. Acesso em 2009.

Clemens AS, Fonseca JC, Azevedo T, Cavalcanti A, Silveira T, Castilho MC et al. Soroprevalência de Hepatite A e Hepatite B em quatro centros no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2000; 33(1):1-10.

Clemens SC, Azevedo T e Homma A. Feasibility study of the immunogenicity and safety of a novel DTPw/Hib (PRP-T) Brazilian combination compared to a licensed vaccine in healthy children at 2, 4 and 6 months of age. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2003; 36(3):321-30.

Costa AA, Inenami M, Juarez E, Llacén D, Raw I. Preliminary report of the use on adults of a recombinant yeast-derived hepatitis B vaccine manufactured by Instituto Butantan. *Rev. Inst. Med. Trop S. Paulo* 1997; 39(1):39-42.

Costa WA, Cunha RS, Bolzan VL, Silva ACA, Caporale GM, Chaves LB, Oselka GW, Junqueira DA et al. Immunogenicity and safety of a new Vero cell rabies vaccine produced using serum-free medium. *Vaccine* 2007; 25:8140-5.

Coursaget P, Relyveld E, Brizard A, Frenkiel MP, Fritzell B, Teulières L et al. Simultaneous injection of hepatitis B vaccine with BCG and killed poliovirus vaccine. *Vaccine* 1992;10(5):319-21.

Czeschinski PA, Binding N, Witting U. Hepatitis A and Hepatitis B vaccinations: immunogenicity of combined vaccine and of simultaneously or separately applied single vaccines. *Vaccine* 2000; 18(11-12):1074-80.

Decker MD, Edwards KM, Bogaerts HH. Combination vaccines. In: Plotkin AS, Orenstein WA. *Vaccines* 4th ed. Pennsylvania: Saunders; 2004. p.825-861.

Dodd D. Benefits of combination vaccines: effective vaccination on a simplified schedule. *The American Journal of Managed Care* 2003; 9:S6-12.

Düppre NC, Camacho LAB, Da Cunha SS, Struchiner CJ, Sales AM, Nery JAC et al. Effectiveness of BCG vaccination among leprosy contacts: a cohort study. *Royal Society of Tropical Medicine of Hygiene* 2008; 102:631-8.

Egemen A, Aksit S, Kurugöl Z, Erensoy S, Bilgiç A, Akilli M. Low-dose intradermal versus intramuscular administration of recombinant hepatitis B vaccine: a comparison of immunogenicity in infants and preschool children. *Vaccine* 1998; 16(16):1511-5.

Ehreth J. The global value of vaccination. *Vaccine* 2003; 21:596-600.

Elisbão MCM, Baldy JLS, Bonametti AM, Reiche EMV, Morimoto HK, Pontello R et al. Intradermal vaccination of adults with three low doses (2µg) of recombinant hepatitis b vaccine. II. Persistence of immunity and induction of immunologic memory. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98(8):1109-13.

Ellis RW. Development of a combination vaccines. *Vaccine* 1999; 17(13-14):1635-42.

Feltrell MS, Kennedy K, Singhal A, Martin RM, Ness A, Hadders-Algra M et al. How much loss to follow-up is acceptable in long-term randomised trials and prospective studies? *Arch. Dis. Child* 2008; 93:458-61.

Ferreira CT, Silveira TR. Viral hepatitis prevention by immunization. *Jornal de Pediatria* 2006; 82(3):S55-66.

Field A. *Discovering statistics using SPSS for windows: advanced techniques for the beginner*. London: Ed. Sage Publications; 2000. p.163-204.

François G, Duclos P, Margolis H, Lavanchy D, Siegrist CA, Meheus A et al. Vaccine safety controversies and the future of vaccine programs. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 2005; 24(11):953-61.

Ghabouli MJ, Sabouri AH, Shoeibi N, Bajestan SN, Baradaran N. High seroprotection rate induced by intradermal administration of a recombinant hepatitis b vaccine in young healthy adults: comparison with standard intramuscular vaccination. *European Journal of Epidemiology* 2004; 19:871-5.

Gomber S, Sharma R, Ramachandran VG. Immunogenicity of low dose intradermal hepatitis b vaccine and its comparison with standard dose intramuscular vaccination. *Indian Pediatrics* 2004; 41:922-6.

Halsey NA. Safety of combination vaccines: perception versus reality. *Pediatr Infect Dis J* 2001; 20(11):S40-4.

Henderson EA, Louie TJ, Ramotar K, Ledgerwood D, Hope KM, Kennedy A. Comparison of higher-dose intradermal hepatitis b vaccination of healthcare workers. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000; 21:264-9.

Hijjar MA, Oliveira MJPR, Teixeira GM. A tuberculose no Brasil e no mundo. *Boletim de Pneumologia Sanitária* 2001; 9(2):9-16.

Horne AD. The statistical analysis of immunogenicity data in vaccine trials. *Annals New York Academy of Sciences* 1995; 754: 321-28.

Horne AD, Lachenbruch PA, Getson PR, Hsu HS. Analysis of studies to evaluate immune response to combination vaccines. *Clinical Infectious Diseases*, 2001; 33 (suppl 4): S306-11.

Hussey G, Hawkrigde T, Hanekom W. Childhood tuberculosis: old and new vaccines. *Paediatric Respiratory Reviews* 2007; 8:148-54.

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

Isolani AP, Sversuti CS, Sell AM e Moliterno RA. Protection against hepatitis B recombinant vaccine in newborn children in South Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101(5):551-4.

Janson SL, Alioto ME, Boushey HA. Attrition and retention of ethnically diverse subjects in a multicenter randomized controlled research trial. *Controlled Clinical Trials* 2001; 22:236S-43S.

Kristensen I, Peter A, Jensen H. Routine vaccinations and child survival: follow up study in Guinea-Bissau, West Africa. *BMJ* 2000; 321:1435-39.

Kurugöl Z, Erensoy S, Aksit S, Egemen A, Bilgiç A. Low-dose intradermal administration of recombinant hepatitis b vaccine in children: 5-year follow-up study. *Vaccine* 2001; 19(28-29):3936-9.

Mallet E, Belohradsky BH, Lagos R, Gothefors L, Camier P, Carrière JP et al. A liquid hexavalent combined vaccine against diphtheria, tetanus, pertussis, poliomyelitis, *Haemophilus influenzae* type B and hepatitis B: review of immunogenicity and safety. *Vaccine* 2004; 22(11-12):1343-57.

Marchant A, Goetghebuer T, Ota MO, Wolfe I, Ceesay SJ, De Groot D et al. Newborns develop a Th1-type immune response to *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin vaccination. *The Journal of Immunology* 1999; 163:2249-55

Marchant A, Goldman M. T cell-mediated immune responses in humans newborns: ready to learn? *Clinical and Experimental Immunology* 2005; 141:10-8.

Martins RM, Bensabath G, Arraes LC, Oliveira MLA, Miguel JC, Barbosa GG et al. Multicenter study and safety of two Recombinant Vaccines against Hepatitis B. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99(8):865-71.

Martins RM, Camacho LAB, Marcovistz R, Noronha TG, Maia MLS, Santos EM et al. Immunogenicity, reactogenicity and consistency of production of a Brazilian combined vaccine against diphtheria, tetanus, pertussis and *Haemophilus influenzae* type b. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; 103(7):711-8.

Mast E, Mahoney F, Kane MA, Margolis HS. Hepatitis b vaccine. In: Plotkin AS, Orenstein WA. *Vaccines* 4th ed. Pennsylvania: Saunders; 2004. p.299-337.

Mast EE, Margolis HS, Fiore AE, Brink EW, Goldstein ST, Wang SA, Moyer LA, Bell BP, Alter MJ. A comprehensive immunization strategy to eliminate transmission of hepatitis B virus infection in the United States: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) part 1: immunization of infants, children, and adolescents. *Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR Recomm Rep.* 2005; 54(RR-16):1-31.

Mazzola TN, Da Silva MT, Moreno YM, Lima SC, Carniel EF, Morcillo AM et al. Robust gamma delta+ T cell expansion in infants immunized at birth with BCG vaccine. *Vaccine* 2007; 25(34):6313-20.

Oliveira MDS, Martins RMB, Matos MA, Ferreira RC, Dias MA, Carneiro MAS et al. Seroepidemiology of hepatitis B virus infection and high rates of response to hepatitis B virus Butang® vaccine in adolescents from low income families in Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101(3):251-6.

Ota MOC, Vekemans J, Schlegel-Haueter SE, Fielding K, Sanneh M, Kidd M et al. Influence of Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guérin on antibody and cytokine responses to human neonatal vaccination. *The Journal of Immunology* 2002; 168:919-25.

Paraná R, Almeida D. HBV epidemiology in Latin America. *Journal of Clinical Virology* 2005 34(1):S130-3

Pereira SM, Dantas OMS, Ximenes R, Barreto ML. Vacina BCG contra tuberculose: efeito protetor e políticas de vacinação. *Rev Saúde Pública* 2007; 41(S1):59-66.

Pichichero ME, Bernstein H, Blatter MM, Schuerman L, Chevart B, Holmes SJ. Immunogenicity and safety of a combination diphtheria, tetanus toxoid, acellular pertussis, hepatitis B and inactivated poliovirus vaccine coadministered with a 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine. *The Journal of Pediatrics* 2007; 151(1):43-9.

Ponte CF. Vacinação, controle de qualidade e produção de vacinas no Brasil a partir de 1960. História, Ciências e Saúde - Biomanguinhos, 2003; 10(supl2):619-53.

Ramadasan P, Das AL, Patra AK. Effects of BCG vaccination on evolution of Leprosy. MJAFI 2005; 61(1):26-8.

Raw I, Ioshimoto LM, Granowsky N. BCG-Hepatitis B. A possible vaccine combination. Supported by Pronex-CNPq. Instituto Butantan-São Paulo, Brazil 2000.

Rodrigues LC, Kerr-Pontes LRS, Frietas MVC, Barreto ML. Long lasting BCG protection against leprosy. Vaccine 2007; 25:6842-4.

Römel J – Therapeutic equivalence investigations: statistical considerations. Statistics in Medicine. 1998; 17:1703-14.

Santos JI, Martin A, De Leon T, Rivera L, Gaitán MEG, Del Rio C et al. DTPw-HB and Hib primary and booster vaccination: combined versus separate administration to Latin American children. Vaccine 2002; 20:1887-93.

São Paulo. (Estado). Secretaria do Estado da Saúde. Treinamento na Técnica de Aplicação de BCG. Disponível em:  
[ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc\\_tec/informebcg.pdf](ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/informebcg.pdf). Acesso em 2003.

São Paulo. (Estado). Secretaria do Estado da Saúde. Divisão de Imunização. Divisão de Hepatites. Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". Coordenadoria de Controle de Doenças. Vacina contra Hepatite B. Rev Saúde Pública 2006; 40(6):1137-40.

São Paulo (Estado). Secretaria do Estado da Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". Coordenadoria de Controle de Doenças. Ofício Circ. Imuni N° 12/08. 2008.

Shepard CW, Simard EP, Finelli L, Fiore AE, Bell BP. Hepatitis B virus infection: epidemiology and vaccination. *Epidemiol Rev.* 2006; 28:112-25.

Silveira TR, Fonseca JC, Rivera L, Fay OH, Tapia R, Santos JI et al. Hepatitis B seroprevalence in Latin América. *Rev Panam Salud Publica* 1999; 6(6):378-83.

Smith KC, Starke JR. Bacille Calmette-Guérin Vaccine. In: Plotkin AS, Orenstein WA. *Vaccines* 4th ed. Pennsylvania: Saunders; 2004. p.179-209.

Soysal AS, Millington KA, Bakir M, Dosanjh D, Aslan Y, Deeks JJ et al. Effect of BCG vaccination on risk of Mycobacterium tuberculosis infection in children with household tuberculosis contact: a prospective community-based study. *The Lancet* 2005; 366:1443-51.

Tanaka J. Hepatitis B epidemiology in Latin América. *Vaccine* 2000; 18:S17-19.

Temporão JG, Nascimento MVL, Maia MLS. Programa Nacional de Imunizações (PNI): história, avaliação e perspectivas. Buss PM, Temporão JG, Carneiro JR. In: *Vacinas, Soros & Imunizações no Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2005.p.101-23.

Thoelen S, Van Damme P, Leentvaar-Kuypers A, Leroux-Roels G, Bruguera M, Frei PC et al. The first combined vaccine against hepatitis A and B: an overview. *Vaccine* 1999; 17(13-14):1657-62.

Turchi MD, Martelli CMT, Ferraz ML, Silva AE, Cardoso DDP, Martelli P et al. Immunogenicity of low-dose intramuscular and intradermal vaccination with recombinant hepatitis b vaccine. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 1997;39(1):15-9.

Ueno H, Klechevsky E, Morita R, Asford C, Cao T, Matsui T et al. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunological Reviews* 2007; 219:118-42.

World Health Organization. Department of Vaccines and Biologicals. Introduction of Hepatitis B vaccine into childhood immunization services. Geneva: 2001. 48p.



World Health Organization. Immunization Summary: the 2007 edition: a statistical reference containing data through 2005. Geneva: 2007. 234p.

World Health Organization. Global tuberculosis control: Surveillance, planing, finance: Who report 2008. Geneva: 2008. 304p.

World Health Organization. Disponível em:

[http://www.who.int/immunization\\_delivery/new\\_vaccines/hepb/en/index4.html](http://www.who.int/immunization_delivery/new_vaccines/hepb/en/index4.html)

Acesso em 2008.

Zepp F, Knuf M, Heininger U, Janh K, Coolard A, Habermehl P et al. Safety, reactogenicity and immunogenicity of a combined hexavalent tetanus, diphteria, acellular pertussis, hepatitis B, inactivated poliovirus vaccine and Haemophilus influenzae typoe b conjugate vaccine, for primary immunization of infants. Vaccine 2004; 22(17-18):2226-33.

## **8. ANEXOS**





## ANEXO 1

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

#### **Avaliação da imunogenicidade e segurança da vacina combinada BCG e Hepatite B do Instituto Butantan na criança.**

#### **Pesquisadores responsáveis pelo estudo**

- Enfermeira Emília de Faria Carniel; Professores Doutores: Abimael Aranha Neto, André Moreno Morcillo, Maria de Lourdes Zanolli; Maria Angela Antônio; Marcos Tadeu Nolasco da Silva e Maria Marluce dos Santos Vilela

**A hepatite B e a tuberculose** são doenças transmissíveis com alta incidência no Brasil. A hepatite B pode levar à cirrose hepática e ao câncer do fígado. Na criança, a tuberculose pode se disseminar, causando meningite e outras doenças graves no rim, nos ossos e nas articulações.

**A hepatite B** pode ser prevenida por uma vacina recombinante de elevada segurança e eficácia que é aplicada por via intramuscular em 3 doses nas idades de recém-nascido, com um mês e seis meses de vida. Essa vacina está incluída na linha de produção do Instituto Butantan desde 1999 sendo reconhecida como segura e eficaz em adultos.

**As formas graves e disseminadas de tuberculose** podem ser prevenidas pela vacina BCG intradérmica que é aplicada em dose única no recém-nascido.

O objetivo do estudo é verificar se no recém-nascido a aplicação **por via intradérmica da BCG combinada com a vacina contra Hepatite B** tem a mesma eficácia e segurança das vacinas BCG por via intradérmica e a Hepatite B por via intramuscular, aplicadas, separadamente, conforme recomendação do Programa Nacional de Imunizações.

A participação do seu filho no estudo implicará na aplicação das vacinas determinadas pelo sorteio (combinadas ou separadas) e de mais duas doses da vacina contra hepatite B, por via intramuscular, com um mês e com seis meses de vida e, em duas coletas de quatro mililitros de sangue de veia periférica, antes e após completar o esquema de vacinação. No sangue, serão testados os anticorpos para hepatite B.

A participação no estudo é voluntária e pode ser interrompida a qualquer momento sem nenhuma penalidade. Contudo, o esquema de imunização deverá ser completado sem interrupção, pois a vacina contra hepatite B só funciona quando se aplicam as três doses.

Os pesquisadores estarão disponíveis a qualquer momento para esclarecimento de dúvidas e poderão ser contatados através dos telefones (19) 3788 7353 ou 9601 1705.

Nestes termos, concordo com a participação minha e do meu (minha) filho (a) no estudo.

Campinas, ..... , ..... , 2002

Nome da mãe:.....

Nome da criança: .....

Assinatura da mãe: .....

Nome do pesquisador .....

Assinatura do pesquisador.....

**ANEXO 2**  
**Instrumentos de coleta de dados**

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Ficha \_\_\_\_\_CS \_\_\_\_\_  
Caso ( ) \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Controle: ( )  
CAISM: ( ) \_\_\_\_\_ Maternidade de Campinas ( )

▪ Nome Mãe: \_\_\_\_\_ Prontuário: \_\_\_\_\_  
Apelido: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Estado civil: com companheiro ( ) sem companheiro ( )  
Escolaridade da Mãe (em anos de estudo concluídos): \_\_\_\_\_  
Ocupação do Mãe: \_\_\_\_\_

▪ Nome Pai: \_\_\_\_\_  
Apelido: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_  
Escolaridade do Pai (até que ano frequentou): \_\_\_\_\_  
Ocupação do Pai: \_\_\_\_\_

▪ Endereço: \_\_\_\_\_  
Referência: \_\_\_\_\_  
Bairro: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_  
Fone: \_\_\_\_\_ Celular: \_\_\_\_\_ Outros: \_\_\_\_\_  
Contato para recado \_\_\_\_\_

▪ Duração gestação (em semanas): \_\_\_\_\_  
▪ Tipo parto: \_\_\_\_\_  
▪ Nº consultas pré-natal: \_\_\_\_\_  
▪ Intercorrências gestacionais: \_\_\_\_\_  
▪ História pessoal: Hepatite: sim: ( ) não: ( ) Qual: \_\_\_\_\_  
Tuberculose: sim: ( ) não: ( ) Quando: \_\_\_\_\_  
▪ Tuberculose no domicílio: sim: ( ) não: ( ) Quem: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ É bacilífero: sim: ( ) não: ( )

	HIV	Hepatite B	Lues			
1ª coleta						
2ª coleta						

Recém-Nascido

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Ficha \_\_\_\_\_

Caso ( ) Controle ( )

CAISM ( ) Maternidade de Campinas ( )

Nome RN \_\_\_\_\_ Prontuário \_\_\_\_\_

- Data de Nascimento : \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Sexo: Masculino ( ) Feminino ( )
- Apgar \_\_\_\_\_ Peso ao nascer \_\_\_\_\_ Comprimento \_\_\_\_\_ PC \_\_\_\_\_
- PT \_\_\_\_\_ Capurro \_\_\_\_\_

### CARTEIRA DE VACINAÇÃO

	BCG/HepB	BCG	HepB	DPT	Sabin	Hib	Sarampo	SCR	Outras
1ª dose									
2ª dose	_____	_____							
3ª dose	_____	_____							

**RETORNO**      Ficha: \_\_\_\_\_

	1º retorno _/_/_	2º retorno _/_/_	3º retorno _/_/_	4º retorno _/_/_	5º retorno _/_/_	6º retorno _/_/_
Queixa						
Alimentação						
Intercorrências com diagnóstico médico						
Medicações usadas entre os retornos						
Medicações em uso						
Conduta						



**CRONOGRAMA PARA CONTROLE DE RETORNO**

Ficha: \_\_\_\_\_

	1ª dose (Maternidade)	2ª dose (30 dias)	3ª dose (180 dias)
<b>Data</b>			
<b>Hepatite B</b>			
<b>BCG</b>			
<b>BCG/ Hepatite B</b>			

**COMPLICAÇÕES**

Associada (BCG/BUTANG)  Hepatite B	1ª dose (Maternidade)	2ª dose (30 dias)	3ª dose (180 dias)
<b>Febre Alta</b>			
<b>Dor local</b>			
<b>Eritema</b>			
<b>Abscesso</b>			

Observações:        [ 0 ] - sem complicações    [ 1 ] - com complicações

---



---



---



---



---

**BCG :**            [ 0 ] - sem complicações    [ 1 ] - com complicações

Observações:

---



---



---



---

# REAÇÕES DA VACINA BCG

Ficha: \_\_\_\_\_

EVENTOS ESPERADOS	1ª visita Idade : .....	2ª visita Idade : .....	3ª visita Idade : .....	4ª visita Idade : .....
<b>Mácula avermelhada</b>	( ) sim :..... mm ( ) não	( ) sim :..... mm ( ) não	( ) sim :..... mm ( ) não	( ) sim :..... mm ( ) não
<b>Pústula</b>	( ) sim ( ) não	( ) sim ( ) não	( ) sim ( ) não	( ) sim ( ) não
<b>Crosta</b>	( ) sim ( ) não	( ) sim ( ) não	( ) sim ( ) não	( ) sim ( ) não
<b>Úlcera</b>	( ) sim :..... mm ( ) não	( ) sim :..... mm ( ) não	( ) sim :..... mm ( ) não	( ) sim :..... mm ( ) não
<b>Cicatriz</b>	( ) sim :..... mm ( ) não	( ) sim :..... mm ( ) não	( ) sim :..... mm ( ) não	( ) sim :..... mm ( ) não
<b>Enfartamento ganglionar até 3 mm</b>	( ) Axilar ( ) supraclavicular ( ) infraclavicular ( ) Único ( ) Múltiplo	( ) Axilar ( ) supraclavicular ( ) infraclavicular ( ) Único ( ) Múltiplo	( ) Axilar ( ) supraclavicular ( ) infraclavicular ( ) Único ( ) Múltiplo	( ) Axilar ( ) supraclavicular ( ) infraclavicular ( ) Único ( ) Múltiplo
<b>Linfadenopatia regional não supurada &gt; 3 mm</b>	( ) sim ( ) não	( ) sim ( ) não	( ) sim ( ) não	( ) sim ( ) não

**REAÇÕES DA VACINA BCG**    Ficha: \_\_\_\_\_

<b>EVENTOS ADVERSOS</b>	<b>1a visita Idade : .....</b>	<b>2a visita Idade : .....</b>	<b>3a visita Idade : .....</b>	<b>4a visita Idade : .....</b>
Úlcera diâmetro > 1 cm				
Abcesso subcutâneo frio				
Abcesso subcutâneo quente				
Linfadenopatia regional supurada				
Cicatriz queiloide				
Reação lupoides				
Lesões localizadas de pele				
Lesões osteoarticulares				
Lesões em linfonodos, em órgãos do tórax e abdome				
Lesões generalizadas				

**ANEXO 3**  
**Ficha de admissão no CAISM**

**PREENCHER SOMENTE DE DOMINGO À QUINTA FEIRA**

**Avaliação da Imunogenicidade e Segurança da Vacina Combinada  
BCG e Hepatite B do Instituto Butantan, na Criança**

**PESQUISADORES:** Enf. Emília de Faria Carniel; Profs. Drs.: Abimael Aranha Netto; André Moreno Morcillo; Maria Ângela R G M Antonio; Maria de Lurdes Zanolli; Marcos Tadeu N. da Silva; Maria Marluce dos Santos Vilela.

Nome da mãe: \_\_\_\_\_

Residente em Campinas	( ) sim	<input checked="" type="checkbox"/> não
Sorologia para Hepatite B	( ) negativa	<input checked="" type="checkbox"/> positiva
Sorologia para HIV	( ) negativa	<input checked="" type="checkbox"/> positiva
Sorologia para sífilis	( ) negativa	<input checked="" type="checkbox"/> positiva
Parto a termo	( ) sim	<input checked="" type="checkbox"/> não
Tuberculose ativa	<input checked="" type="checkbox"/> sim	( ) não

Obs: estarão fora dos critérios de inclusão da pesquisa as crianças cujas mães tiverem pelo menos um item assinalado na coluna escura.

Projeto vacina ( )      Rotina Caism ( )



**ANEXO 4**  
**Parecer do Comitê de Ética e Pesquisada Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP**



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

✉ Caixa Postal 6111  
13083-970 Campinas, SP  
☎ (0\_\_19) 3788-8936  
fax (0\_\_19) 3788-8925  
✉ [cep@head.fcm.unicamp.br](mailto:cep@head.fcm.unicamp.br)

CEP, 21/05/02  
(Grupo II)

**PARECER PROJETO: Nº 135/2002**

**I-IDENTIFICAÇÃO:**

**PROJETO: “AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE E SEGURANÇA DA VACINA COMBINADA BCG E HEPATITE B DO INSTITUTO BUTANTAN, NA CRIANÇA”**

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Maria Marluce dos Santos Vilela

**INSTITUIÇÃO:** CIPED/FCM/UNICAMP

**APRESENTAÇÃO AO CEP:** 12/03/2002

**II - OBJETIVOS**

Avaliar, através da soroconversão, a eficácia da vacina recombinante contra hepatite B do instituto Butantan (BUTA-NG 10 ug/o,05 ml ) administrada de forma combinada na mesma seringa , com a vacina BCG (Instituto Butantan 0,05 mg/0,5ml).

**III - SUMÁRIO**

Será administrado por via intradérmica a combinação das duas vacinas em 160 recém-nascidos a termo, filhos de mães HbsAg, sífilis e HIV-1 negativas. A segunda e terceira doses da vacina contra hepatite B serão aplicadas por via intramuscular com 30 dias e aos 6 meses de vida, respectivamente. haverá um grupo controle de 160 crianças que serão imunizadas de acordo com o esquema corrente recomendado pelo Ministério da saúde. Os anticorpos da hepatite B serão investigados pelo ELISA.

**IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES**

Trata-se de um projeto de teste de combinação de vacinas. O projeto está bem estruturado com critérios de exclusão e inclusão bem delimitados. Os benefícios são claros e os riscos mínimos. O termo e consentimento é bem completo e claro. Todo o procedimento encontra-se bem esclarecido.

## V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e 251/97, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

## VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

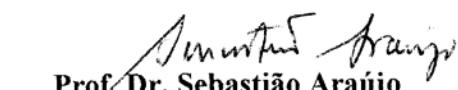
Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

**Atenção: Projetos de Grupo I serão encaminhados à CONEP e só poderão ser iniciados após Parecer aprovatório desta.**

## VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na V Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 21 de maio de 2002.

  
**Prof. Dr. Sebastião Araújo**  
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP

# ANEXO 5

## Bula da vacina BCG + Hepatite B liofilizada



SECRETARIA  
DE ESTADO  
DA SAÚDE

VACINA BCG + HEPATITE B  
LIOFILIZADA



### FORMA FARMACÊUTICA E APRESENTAÇÃO

A VACINA BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) + HEPATITE B é preparada com bacilos vivos da cepa Moreau atenuada de *Mycobacterium bovis*, cujo lote-mãe foi fornecido pelo Statens Seruminstitut de Copenhague, Dinamarca e mantido no Instituto Butantan como lote-semente, e da suspensão injetável de antígeno de superfície do vírus (HBsAg), produzida através de expressão do antígeno na cepa de levedura modificada geneticamente.

A vacina é apresentada liofilizada em frasco-ampola contendo 10 doses de 0,1 mL, acompanhada com ampolas com 1 mL de diluente (solução fisiológica a 0,85%)

### USO PEDIÁTRICO

### COMPOSIÇÃO

Cada dose de 0,1 mL, após reconstituição contém:

- BCG em suspensão.....	0,1 mg
- Glutamato de sódio.....	1,1 mg
- Proteína de superfície do vírus da hepatite B recombinante purificada.....	10,0 µg
- Solução fisiológica 0,85% q.s.p.....	0,1 mL

### INFORMAÇÕES AO PACIENTE

O PRAZO DE VALIDADE e o NÚMERO DO LOTE estão indicados na embalagem. Não utilizar a vacina após o vencimento. Uma vez aberto o frasco-ampola, a VACINA BCG + HEPATITE B deve ser usada dentro do período de 8 (oito) horas, se conservada em geladeira entre 2°C e 8°C, protegida da luz solar direta. O frasco-ampola deve ser agitado antes da aplicação. A vacina é administrada em dose única de 0,1 mL, aplicada por via intradérmica na região deltóide (braço). A vacinação contra a tuberculose e hepatite B deve ser feita em crianças de até 1 mês de idade e sempre sob orientação médica. Para a vacinação contra a Hepatite B devem ser administradas duas doses de reforço (vide POSOLOGIA). As contra-indicações desta vacinação são raras, no entanto o médico assistente deverá ser informado sobre doenças ou sintomas detectados no paciente antes e após à vacinação (vide CONTRA-INDICAÇÕES E EFEITOS COLATERAIS).

### RECOMENDAÇÕES

- CONSERVAR A VACINA BCG + HEPATITE B ENTRE 2°C E 8°C. NÃO CONGELAR
- A VACINA BCG + HEPATITE B DEVE SER GUARDADA FORA DO ALCANCE DAS CRIANÇAS
- RESTOS DA VACINA RECONSTITUÍDA DEVEM SER INATIVADOS PELO CALOR (FERVURA) E DESPREZADOS NO FINAL DE UM DIA DE TRABALHO
- NA OCORRÊNCIA DE EFEITOS COLATERAIS INFORMAR IMEDIATAMENTE AO MÉDICO
- NÃO UTILIZAR REMÉDIO SEM O CONHECIMENTO DO SEU MÉDICO. PODE SER PERIGOSO PARA A SAÚDE

### INFORMAÇÕES TÉCNICAS

#### INDICAÇÃO

A VACINA BCG + HEPATITE B é indicada para a profilaxia da tuberculose e imunização ativa contra infecção do vírus da Hepatite B. É administrada em dose única para crianças de até 1 mês de idade por tratar-se de faixa etária muito susceptível à doença. A seleção de cepas de *Mycobacterium bovis* atenuadas, como a Moreau usada pelo Instituto Butantan assegura a preparação de vacina de imunogenicidade sólida e duradoura com a aplicação de uma única dose. O BCG induz no indivíduo vacinado imunidade celular do tipo hipersensibilidade retardada e humoral. Tratando-se de uma vacina constituída de organismos vivos atenuados, a sua eficácia depende, além de outras características, da manutenção da viabilidade adequada do microorganismo durante o período de validade, condição esta que é conseguida pela técnica de liofilização do produto. A VACINA BCG + HEPATITE B não irá proteger contra infecção causada por vírus da hepatite A, C e E. Como a hepatite D (causada pelo agente delta) não ocorre na ausência da infecção por vírus da hepatite B, é esperado que a hepatite D seja evitada pela vacinação com este produto.

#### ORIENTAÇÃO PARA RECONSTITUIÇÃO E USO DA VACINA

- Com uma seringa esterilizada e seca, aspirar 1 mL do diluente e colocar inicialmente 0,5 mL deixando escorrer pela parede do frasco-ampola, para umedecer a vacina liofilizada;
- Em seguida colocar o restante do diluente;
- Agitar lentamente, para evitar a formação de espuma, até obter uma solução homogênea.

#### CONTRA-INDICAÇÕES \*

- Imunodeficiência congênita ou adquirida, incluindo crianças infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH) que apresentam sintomas da doença;
- Embora não constituam contra-indicações absolutas, recomenda-se adiar a vacinação com a VACINA BCG + HEPATITE B em recém-nascidos com peso inferior a 2.000 g e em presença de afecções dermatológicas extensas em atividade;
- Mal nutridas;
- A administração de outras vacinas vivas deve ser feita após 1 mês da aplicação da VACINA BCG + HEPATITE B.

\*(De acordo com MANUAL DE NORMAS DE VACINAÇÃO - MINISTÉRIO DA SAÚDE - FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, Junho, 2001)





SECRETARIA  
DE ESTADO  
DA SAÚDE

VACINA BCG + HEPATITE B  
LIOFILIZADA



**INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS**

A vacinação deve ser protelada em crianças que estiverem usando corticóides ou outros imunossupressores. Todavia, o médico deve ser informado do uso de outros medicamentos.

**REAÇÕES E EFEITOS COLATERAIS**

A vacinação pela VACINA BCG + HEPATITE B não provoca reações gerais, como febre e mal estar. Alguns dias após a vacinação, surge no local da aplicação um nódulo, que pode evoluir para úlcera e crosta, que regride espontaneamente, em média entre a sexta e a décima semana após a aplicação, deixando uma pequena cicatriz. Não são necessários cuidados especiais ou curativos.

**POSOLOGIA**

VACINA BCG + HEPATITE B é administrado em dose única de 0,1 mL, via intradérmica. Não é necessária a aplicação de reforço da VACINA BCG. A vacina é aplicada com seringa tipo tuberculina, na região do deltóide, ao nível da inserção inferior deste músculo e de preferência no braço direito. O material para aplicação da VACINA BCG + HEPATITE B é padronizado e deve ser exclusivo para este uso.

Deve ser administrada 2 doses de reforço da VACINA RECOMBINANTE CONTRA HEPATITE B, conforme o esquema:

- segunda dose: um mês depois da vacinação com a VACINA BCG + HEPATITE B;
- terceira dose: 6 meses a partir da primeira dose.

A criança não estará devidamente protegida contra a Hepatite B enquanto não for completada a vacinação básica (1ª dose BCG + Hepatite B, 2ª e 3ª doses de Hepatite B).

**CONSERVAÇÃO**

A VACINA BCG + HEPATITE B Liofilizada ou reconstituída deve ser conservada em temperatura entre 2°C e 8°C, protegida da luz solar direta para evitar a inativação dos microrganismos. A luz artificial não causa danos. **NÃO DEVE SER CONGELADA.**

**APRESENTAÇÃO**

Multidose: frasco-ampola âmbar com 10 doses, acompanhado de ampola de 1 mL do diluente (solução fisiológica 0,85%).

**PRAZO DE VALIDADE**

O prazo de validade da VACINA BCG + HEPATITE B Liofilizada é de 12 meses, mantida as condições de refrigeração entre 2°C e 8°C.

**FARMACÊUTICO RESPONSÁVEL**

Dra. Ivone Kazuko Yamaguchi  
CRF-SP nº 6057

**INSTITUTO BUTANTAN**

Av. Vital Brasil, 1500 - Butantã  
CEP 05503-900 - São Paulo - Brasil  
C.N.P.J.: 61.821.344/0001-56  
Indústria Brasileira


Serviço de Atendimento ao Consumidor  
tel. (011) 3726-3816

## ANEXO 6 Artigo publicado

Vaccine (2008) 26, 647–652



available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

 ScienceDirect

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vaccine](http://www.elsevier.com/locate/vaccine)



# Immunogenicity and safety of combined intradermal recombinant Hepatitis B with BCG vaccines at birth<sup>☆,☆☆</sup>

E.F. Carniel<sup>a,1</sup>, A.M. Morcillo<sup>a,1</sup>, M.H. Blotta<sup>b,2</sup>, M.T.N. Da Silva<sup>a,3</sup>,  
T.N. Mazzola<sup>a,4</sup>, M.A.R.G.M. Antonio<sup>a,1</sup>, M.L. Zanolli<sup>a,1</sup>,  
A. Aranha Netto<sup>a,1</sup>, H.G. Higashi<sup>c,5</sup>, I. Raw<sup>c,5</sup>, M.M.S. Vilela<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Center for Investigation in Pediatrics, Pediatrics Department, State University of Campinas Medical School, Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Campinas, São Paulo, CEP 13083-887, Brazil

<sup>b</sup> Department of Clinical Pathology, State University of Campinas Medical School, Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Campinas, São Paulo, CEP 13083-887, Brazil

<sup>c</sup> Butantan Institute, Rua Vital Brasil, 1500 São Paulo, CEP 05503-900, Brazil

Received 27 September 2007; received in revised form 16 November 2007; accepted 19 November 2007  
Available online 26 December 2007

### KEYWORDS

Combined vaccines;  
Hepatitis B vaccines;  
Humoral immunity

**Summary** This randomized, prospective, non-inferiority study aimed to quantify anti-HBs titers induced by recombinant Hepatitis B vaccine from healthy infants vaccinated with combined Hepatitis B and Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccines (HbsAg 10 µg plus BCG suspension 0.1 mg) and compare them to titers obtained with separated vaccines.

<sup>☆</sup> Preliminary results of these findings were presented at the New Approaches to Vaccine Development—from bench to the field, Berlin, Germany, 8–10 September 2005.

<sup>☆☆</sup> All of the authors declare that the paper "Immunogenicity and Safety of Combined Intradermal Recombinant Hepatitis B with BCG Vaccines at birth." was not submitted for consideration elsewhere.

\* Corresponding author. Tel.: +55 19 35218963; fax: +55 19 35218972.

E-mail addresses: [carniel@fcm.unicamp.br](mailto:carniel@fcm.unicamp.br) (E.F. Carniel), [morcillo@fcm.unicamp.br](mailto:morcillo@fcm.unicamp.br) (A.M. Morcillo), [heblotta@fcm.unicamp.br](mailto:heblotta@fcm.unicamp.br) (M.H. Blotta), [nolasco@fcm.unicamp.br](mailto:nolasco@fcm.unicamp.br) (M.T.N. Da Silva), [tanmazzola@yahoo.com.br](mailto:tanmazzola@yahoo.com.br) (T.N. Mazzola), [anze@fcm.unicamp.br](mailto:anze@fcm.unicamp.br) (M.A.R.G.M. Antonio), [zanolli@fcm.unicamp.br](mailto:zanolli@fcm.unicamp.br) (M.L. Zanolli), [abimael@fcm.unicamp.br](mailto:abimael@fcm.unicamp.br) (A.A. Netto), [hisa@butantan.gov.br](mailto:hisa@butantan.gov.br) (H.G. Higashi), [iraw@butantan.gov.br](mailto:iraw@butantan.gov.br) (I. Raw), [marlucevilela@terra.com.br](mailto:marlucevilela@terra.com.br), [marluce@fcm.unicamp.br](mailto:marluce@fcm.unicamp.br) (M.M.S. Vilela).

<sup>1</sup> Tel.: +55 19 35218973; fax: +55 19 35218972.

<sup>2</sup> Tel.: +55 19 35219453; fax: +55 19 35219434.

<sup>3</sup> Tel.: +55 19 35218979; fax: +55 19 35218972.

<sup>4</sup> Tel.: +55 19 35218989; fax: +55 19 35218972.

<sup>5</sup> Tel.: +55 11 37262139; fax: +55 11 37261505.

0264-410X/\$ – see front matter © 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.vaccine.2007.11.048



Infants were immunized at birth either with combined intradermal (ID) BCG and Hepatitis B or ID BCG alone and intramuscular (IM) Hepatitis B. Both groups received IM Hepatitis B at 1 and 6 months of age. After the third dose anti-HBs titers  $\geq 10$  IU/mL were observed in 99% of vaccinees and  $\geq 1000$  IU/mL in 71%. There were no adverse events in both groups. Combination of HbsAg with BCG as first dose did not modify the profile of the humoral immune response for Hepatitis B indicating safety and immunogenicity of this vaccine in newborn.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## Introduction

The high prevalence of Hepatitis B virus (HBV) infection in Brazil (7.9%) has been associated with lower socioeconomic class, with rates of 21% in Manaus (Amazon Basin, north), 7.5% in Porto Alegre (south), 5.5% in Rio de Janeiro (southeast). Lower seroprevalence rates were reported in northeast urban areas, as in the city of Fortaleza (1.2%). The anti-HBc antibody has been detected in children younger than 1 year, suggesting vertical transmission. Also, anti-HBc detection was significantly higher in adult men than in adult women and children suggesting sexual and transmission through intravenous drug use [1,2]. Since 1998 the Brazilian National Immunization Program (NIP) has incorporated neonatal Hepatitis B vaccination into the routine infant immunization schedule as recommended by World Health Organization in 1991 [3]. This program was expanded in 2001 to include adolescents up to 19 years as routine and catch-up immunization. This strategy was proved economically feasible with the recombinant yeast-derived Hepatitis B vaccine Butang<sup>®</sup> manufactured by Instituto Butantan, São Paulo, Brazil, which possesses widely confirmed immunogenicity when applied at birth, one and six months of age [4,5].

Hepatitis B vaccines are composed of highly purified preparations of recombinant Hepatitis B surface antigen (HbsAg) obtained from yeast cells and induce a vigorous antibody response in early life. This response correlates with the protective efficacy of Hepatitis B vaccine against virus vertical transmission [6]. Although vaccine-induced neutralizing antibodies play an important role in protecting young infants from infection, the control of viral replication also involves helper T lymphocytes [7]. In adults and older children, Hepatitis B vaccine activates HbsAg-specific T cells producing both type 1 and 2 cytokines [8–10].

BCG vaccine is recommended at birth in Brazil and remains the only tuberculosis vaccine available for field usage. Evaluation of BCG vaccine immunogenicity demonstrated that human newborns make strong Th1 responses to BCG detectable as long as one year suggesting immunological memory. Moreover, it has been shown that BCG may be a useful Th1 inducing adjuvant at birth in humans and mice [11–13]. It markedly increases the primary immune response to Hepatitis B vaccine in newborns and may have influence on infant memory responses [14]. This could be related to the potent antigen presenting cell-activating properties of BCG and/or to its persistence during the maturation of the immune system.

Because immunization at birth generally primes to subsequent vaccine doses, new combinations of vaccines are an important public health endeavor. Recombinant Hepati-

tis B (Butang<sup>®</sup>) combined with BCG was recently developed by Instituto Butantan of São Paulo, Brazil, and its evaluation in newborn infants has become necessary, in order to check the effects on immunogenicity and safety of these antigen mixtures. In this study Hepatitis B was administered in three doses and only the first was intradermal and combined. Our main goal was to examine whether a Hepatitis B and BCG combined vaccine could prime similar antibody responses to Hepatitis B vaccine injected alone.

## Materials and methods

### Study participants and vaccination

This randomized controlled clinical trial was conducted between October 2004 and December 2005. A total of 548 healthy newborns from Campinas Maternity were included. The preterm (gestational age  $\leq 37$  weeks) and the low birth weight newborns (weight  $< 2500$  g), with congenital or genetic defects or whose mothers were younger than 18 years or had Hepatitis B carrier status, infants with family history of tuberculosis, syphilis or human immunodeficiency virus infection were excluded. Infants were randomized into two groups.

The type of vaccine administered was revealed to the entire research team only at the preparation of this report, but vaccinators and vaccine recipients' parents were aware of which vaccine was being injected since the beginning of the study.

Within 24 h after birth, infants from Group I received combined intradermal BCG and Hepatitis B, which was prepared as follows: a solution of purified recombinant HbsAg protein (100  $\mu$ g) and BCG Moreau Rio de Janeiro strain suspension (1 mg) were mixed in 4 mL vials containing 2% sodium glutamate as stabilizer and lyophilized. Immediately before administration the vaccine was reconstituted in 1 mL of 0.85% NaCl solution, without preservative. Each 0.1 mL dose contained 0.1 mg of BCG and 10  $\mu$ g of HbsAg. The combined vaccine was available in amber glass vials with 10 lyophilized doses, 0.1 mL each. Within 24 h after birth, children from Group II received intradermal BCG (0.1 mg lyophilized BCG Moreau strain in 0.85% NaCl with 1.1 mg sodium glutamate), stored in amber glass vials with 10 doses of 0.1 mL each, and intramuscular Hepatitis B vaccine (Butang<sup>®</sup>, 10  $\mu$ g HbsAg with 0.625 mg aluminum hydroxide and 0.05 mg thimerosal), available in glass vials of 10-dose liquid solution, 0.5 mL each. Both groups received the second and third doses of intramuscular Hepatitis B vaccine (Butang<sup>®</sup>) into the anterolateral area of the thigh, at one and six months of age, respectively. All vaccines were produced by Instituto Butan-

tan. The study protocol was approved by Committee for Ethics in Research from UNICAMP, São Paulo, Brazil. Written informed consent was obtained from each infant's parent or legal guardian.

### Blood collection

Three milliliters of peripheral blood were collected in serum-separating tubes and used to evaluate immune responses to Hepatitis B vaccination immediately before the third dose and 30 days after. For ethical reasons, it was not possible to assess immune response of children at same age not vaccinated with Hepatitis B.

### Adverse event monitoring

Parents were asked to notify the study staff immediately by phone of any unexpected or severe reactions and also to measure local reactions (redness and swelling) and temperatures daily. A standardized questionnaire was used to collect information about any occurrence related to vaccination using scripted questions and definitions. After the first dose, parents' compliance to adverse events monitoring was assessed by phone interview. At the second and third doses of Hepatitis B vaccine and blood sampling, compliance was assessed by the study nurses during home visits.

### Quantitative determination of anti-HBs

Quantitative determination of anti-HBs (mIU/mL) was performed blindly on serum samples using microparticle enzyme immunoassay (MEIA) AXSYM AUSAB® (ABBOTT Laboratories, ABBOTT Park IL, USA). The AXSYM AUSAB® analytical sensitivity is defined by the limit of blank of 0.10 mIU/mL, a limit of detection of 0.30 mIU/mL, and a limit of quantitation of 2.50 mIU/mL. The assay has been demonstrated to be linear (within 20%) up to a concentration of 500 mIU/mL using dilutions of the WHO Standard with known concentrations. Reliability of the measurements was assessed by the intraclass correlation coefficient (ICC) stratified by sample origin and include lower and upper limit.

### Statistical considerations

All analyses were done with SPSS® for Windows (Version 7.5.1, USA).

Two variables were considered for anti-HBs quantitative evaluation after the second and third doses: percentage of vaccinees achieving seroprotection defined as anti-HBs  $\geq 10$  mIU/mL and anti-HBs titers in mIU/mL.

To evaluate the non-inferiority of combined Hepatitis B vaccine, the differences in the proportions of seroprotection (separated and combined vaccines) and 90% confidence intervals (IC 90%) were calculated, as recommended for non-inferiority studies [15]. Differences equal or lower than 10% were accepted as the limit for defining non-inferiority of combined Butang® [15–17]. The null hypothesis of non-inferiority of combined Hepatitis B vaccine was accepted when the lower limit of the confidence interval was not lower than -10%.

**Table 1** Distribution of infants vaccinated at birth with combined (Group I) or separated (Group II) Hepatitis B and BCG<sup>a</sup> vaccines by age (in days) at second and third doses of Hepatitis B vaccine and at blood sampling

Time	Group	Number of vaccinees	Age (days) mean $\pm$ S.D. <sup>b</sup>
Second dose	I	245	33.1 $\pm$ 4.5
	II	253	32.2 $\pm$ 3.8
First blood sampling	I	237	188.0 $\pm$ 7.0
	II	248	187.5 $\pm$ 7.0
Third dose	I	245	188.1 $\pm$ 7.0
	II	253	187.4 $\pm$ 6.9
Second blood sampling	I	245	226.1 $\pm$ 12.6
	II	253	224.8 $\pm$ 12.2

<sup>a</sup> Bacillus Calmette-Guérin.

<sup>b</sup> Standard deviation.

To evaluate the anti-HBs titers, the values were transformed into decimal logarithm and then the mean and the limits of 95% IC were determined. Thereafter, the anti-logarithm and the corresponding 95% IC were calculated. For comparison of the logarithm of the titers, Student's *t*-test was applied for independent samples [18].

## Results

### Study participants

Out of 548 newborns initially selected, 498 infants participated of the entire study distributed as follows: 245 infants in Group I (116 male and 129 female) and 253 infants in Group II (146 male and 107 female).

Table 1 shows the mean and standard deviation values of the infants' age at the second and third vaccine dose. The interval between administration of the first and second dose ranged from 23 to 61 days with a mean of  $32 \pm 4.1$  days for both vaccine type groups. The interval between application of the first and third dose ranged from 173 to 243 days for both vaccine type groups with a mean of  $187 \pm 7$  days. The interval between application of the third dose and collection of the second blood sample for the serological tests ranged from 28 to 45 days for both vaccine type groups.

### Anti-HBs titers

Table 3 shows anti-HBs titers in serum of infants about one month after administration of the third dose of combined or separated vaccines. A similar frequency of non-responders (anti-HBs <10 mIU/mL), very poor responders (anti-HBs 10–50 mIU/mL), poor responders (50–100 mIU/mL), good responders (anti-HBs 100–1000 mIU/mL) and very good responders (anti-HBs  $\geq 1000$  mIU/mL) was observed for both vaccine groups.

The seroconversion rates of serum anti-HBs after application of the second and third doses are shown in Tables 2 and 3.

**Table 2** Distribution of anti-HBs (mIU/mL) from infants vaccinated at birth with combined (Group I) or separated (Group II) Hepatitis B and BCG<sup>a</sup> vaccines, after the second dose of Hepatitis B

Number and percentages of vaccinees		Anti-HBs (mIU/mL)				
		<10	10–50	50–100	100–1000	≥1000
Group I	237	40	77	44	73	3
	%	16.9	32.5	18.6	30.8	1.3
Group II	248	20	46	44	114	24
	%	8.1	18.5	17.7	46.0	9.7

<sup>a</sup> Bacillus Calmette-Guérin.

### Adverse events

The parents and legal guardians of the vaccinees did not report any systemic adverse effects after each Hepatitis B vaccine dose. None of the participants withdrew from the study because of vaccine-related adverse events. Two participants (one of Group I and one of Group II) have developed ulceration of 1.5 cm at the site of the intradermal combined or separated BCG vaccine. After the third dose of Hepatitis B vaccine, the Group I child had anti-HBs titers ≥1000 IU/mL and the Group II child 162.6 IU/mL. Except for one, all of the participants have developed a permanent scar at the BCG injection site.

### Discussion

Intramuscular combined vaccines against Hepatitis B are currently in use in different countries [19,20], but this study is the first to demonstrate that intradermal Hepatitis B combined with BCG at birth is safe and immunogenic as the primer dose. Our results showed non-inferiority between combined (Group I) or separated (Group II) Hepatitis B and BCG vaccines. Anti-HBs titers ≥10 IU/mL observed in 99.5% of seven-month-old infants vaccinated with combined as compared to 99.2% vaccinated with separated Hepatitis B and BCG vaccines lead us to assume that a combination of priming with both vaccines may be considered for replacing conventional separated BCG and Hepatitis B vaccination of newborns followed by boost with intramuscular aluminum Hepatitis B vaccine. Satisfactory immunogenicity of three doses of intramuscular Butang<sup>®</sup> vaccine was previously confirmed, as 100% of the vaccinees reached protective titers [21].

Our surveillance system for adverse events following immunization was able to detect an excellent primer safety profile of Hepatitis B vaccine in the newborn immune system when given intradermally combined with BCG. Adverse events of BCG vaccines were observed in two children who developed a local ulcer that left a characteristic scar.

Adults vaccinated intradermally with three doses (0, 1 and 6 months) of 2 µg of Belgian Hepatitis B recombinant antigen, tested eight years after, maintained high titers of Anti-HbsAg [22]. The substitution of aluminum adjuvant by BCG in the first dose of Hepatitis B vaccine elicited a high immunogenicity similar to the aluminum-adsorbed Hepatitis B vaccine. Although aluminum as such is considered neurotoxic for humans and although aluminum-adsorbed vaccines elicit a number of local reactions of varying degree (e.g., redness, itching) and low-grade fever [23], in our study the aluminum hydroxide has not been associated with any serious adverse events.

The functional interaction between dendritic cells (DC) and γδ T cell in the presence of bacterial infection such as BCG increases the functional maturation of DC augmenting the Th1 immune response in naïve CD4 T cells [24]. γδ T cells predominate in epithelial tissues (skin, genitourinary, respiratory and intestinal tracts), have features of both innate and adaptive immunity, are capable of ingesting, processing and presenting peptide antigens to stimulate CD4+ and + subsets αβ T-cell responses [25,26]. This network possibly comprises the immature and naïve innate and adaptive human neonate skin immunity [27–29]. Of note, the lymphocyte recirculation and homing allow the immunological connection between mucosa and skin by the skin peripheral lymph node axis and the mucosa-associated lymphatic tissues [30]. Likewise, postnatal exposure to environmental microbial products, vaccination and human milk might

**Table 3** Distribution of anti-HBs (mIU/mL) from infants vaccinated at birth with combined (Group I) or separated (Group II) Hepatitis B and BCG<sup>a</sup> vaccines, after the third dose of Hepatitis B

Number and percentages of vaccinees		Anti-HBs (mIU/mL)				
		<10	10–50	50–100	100–1000	≥1000
Group I	245	1	4	3	61	176
	%	0.4	1.6	1.2	24.9	71.8
Group II	253	2	7	4	55	185
	%	0.8	2.8	1.6	21.7	73.1

<sup>a</sup> Bacillus Calmette-Guérin.

accelerate this age-dependent maturation process of the immune response [28,29,31].

Our expectation with this combined Hepatitis B and BCG vaccines was to approach the innate immune response to BCG to improve the protection for Hepatitis B vaccine by enhancing the ability to prime a Th1 response. Unfortunately we did not get enough blood volume from the infants to perform simultaneously the evaluation of the Hepatitis B and BCG cellular immune responses. Based on antibody levels we detected similar responses for both vaccine type groups.

Recently it was demonstrated that the administration of BCG at the time of Hepatitis B vaccine priming at birth markedly increased the cytokine (IL-13), proliferative, as well as antibody response to HBV [14]. Thus, BCG may have influenced T and B cell responses to unrelated vaccine antigens that are administered at the same injection site either simultaneously or even several weeks later [13]. So, under some circumstances, human neonates also seem able to develop mature TH-cell responses, ranging from deficient or deviant to fully mature, depending on the conditions of antigen exposure [29].

In a previous paper we used a flow cytometry-based lymphocyte proliferation assay with live BCG that allowed the characterization of cytokine production and the detection of specific subpopulation expansion in response to mycobacterial antigens and helped to detect responses which are not detected with purified proteins [32]. Although we did not assess HBV-specific T cell proliferation nor HBV-specific cytokine production, since there was similar CD4+, CD8+ and  $\gamma\delta$ + T cell BCG-specific proliferation and BCG-specific IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  concentrations in both groups of vaccination [32], it is reasonable to assume that the combined Hepatitis B and BCG was as immunogenic as Hepatitis B and BCG vaccines inoculated alone, but simultaneously.

In humans, early events occurring after BCG vaccination are poorly characterized. The concept we know today is that the bacilli are taken up by epidermal Langerhans cells, dermal macrophages and dendritic cells where they block acidification of the acid-dependent enzymes of the phagosome, avoiding their death and digestion. Mycobacterial urease helps maintain a higher pH, thereby reducing the flow of antigens to the surface of the macrophage, where they are presented to T cells. Antigens that are processed in the phagosome normally gain access to MHC class II molecules, and thus, BCG primes CD4+ T cells. But for antigens to bind class I molecules (and thus activate CD8+ cells), they must be processed in the cytoplasm of the infected cell, and so BCG fails to elicit an optimal CD8+Tcell response [33]. The efficacy of BCG may rely in part on the maintenance of both an antigen and a mixture of effector and memory cells [34]. Though a comparable systemic IgG response was obtained for combined Hepatitis B and separated intramuscular injection, production of specific anti-HbsAg antibodies (IgG) confirmed the activation of T cells upon intradermal immunization. High level of antibody response after boosting indicates the presence of memory-B and T-cell population evoked by primary immunization.

The Hepatitis B virus is the most common cause of chronic hepatitis, cirrhosis, liver failure and hepatocellular carcinoma worldwide. Effective and safe vaccines against HBV have been available since 1976. Vertical transmission has thus become the most important route of transmission in

children, even though they can be infected by contaminated needles or, rarely, by horizontal transmission within the household. The efficacy of immunization reaches 100% in children born to HbeAg negative mothers with low DNA levels, but 5–10% of children born to HbeAg positive mothers will become HbsAg positive [35]. Perinatal HBV transmission can be greatly reduced by proper immunoprophylaxis of exposed neonates. Unsatisfactory vaccine coverage and incomplete or delayed vaccine administration are still major problems.

Vaccination remains a major tool as a preventive strategy to fight infectious diseases, and the safety of vaccines and its monitoring are essential components of national immunization programs [23]. At present, our data allow one to conclude that intradermal Hepatitis B combined with BCG vaccine, when compared to separated vaccines, elicited a similar antibody response and safety profile. These results may allow a change in the current immunization program in Brazil, decreasing the number of injections, increasing parent compliance, improving timely vaccination and reducing cost.

## Brief outline

This is the first study comparing intradermal combined Hepatitis B and BCG to intramuscular Hepatitis B and intradermal BCG vaccination at birth. The results suggested that the combined BCG and Hepatitis B vaccine was as immunogenic as hepatitis B vaccine inoculated alone.

## Acknowledgements

We thank all the parents who consented their children participation in this clinical trial. This project was supported by grant number 2002/05666-2 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), São Paulo, Brazil.

## References

- [1] Tanaka J. Hepatitis B epidemiology in Latin America. *Vaccine* 2000;18:517–9.
- [2] Silveira TR, da Fonseca JC, Rivera L, Fay OH, Tapia R, Santos JL, et al. Hepatitis B seroprevalence in Latin America. *Rev Panam Salud Publica* 1999;6(6):378–83.
- [3] Hallauer J. VHPB: summary of strategies and recommendations. *Vaccine* 1995;13(S1):S61–3.
- [4] Baldy JL, de Lima GZ, Morimoto HK, Reiche EM, Matsuo T, de Mattos ED, et al. Immunogenicity of three recombinant hepatitis B vaccines administered to students in three doses containing half the antigen amount routinely used for adult vaccination. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2004;46(2):103–7.
- [5] Martins RM, Bensabath G, Arraes LC, Oliveira M, de L, Miguel JC, et al. Multicenter study on the immunogenicity and safety of two recombinant vaccines against hepatitis B. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004;99(8):865–71.
- [6] Mahoney FJ, Kane M. Hepatitis B vaccine. In: Plotkin AS, Orenstein WA, editors. *Vaccines*. Philadelphia: WB Saunders; 1999. p. 158–82.
- [7] Guidotti LG, Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol* 2001;19:65–91.

- [8] Honorati MC, Dolzani P, Mariani E, Piacentini A, Lisignoli G, Ferrari C, et al. Epitope specificity of Th0/Th2 CD4+ T-lymphocyte clones induced by vaccination with rHBsAg vaccine. *Gastroenterology* 1997;112(6):2017–27.
- [9] Böcher WO, Herzog-Hauff S, Schlaak J, Meyer Zum Büschenfelde KH, Löhr HF. Kinetics of hepatitis B surface antigen-specific immune responses in acute and chronic hepatitis B or after HBs vaccination: stimulation of the in vitro antibody response by interferon gamma. *Hepatology* 1999;29(1):238–44.
- [10] Barrios C, Brawand P, Berney M, Brandt C, Lambert PH, Siegrist CA. Neonatal and early life immune responses to various forms of vaccine antigens qualitatively differ from adult responses: predominance of a Th2-biased pattern which persists after adult boosting. *Eur J Immunol* 1996;26(7):1489–96.
- [11] Marchant A, Goetghebuer T, Ota MO, Wolfe I, Ceesay SJ, De Groot D, et al. Newborns develop a Th1-type immune response to *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin vaccination. *J Immunol* 1999;163(4):2249–55.
- [12] Vekemans J, Amedei A, Ota MO, D'Elisio MM, Goetghebuer T, Ismaili J, et al. Neonatal bacillus Calmette-Guérin vaccination induces adult-like IFN-gamma production by CD4+ T lymphocytes. *Eur J Immunol* 2001;31(5):1531–5.
- [13] Ota MO, Vekemans J, Schlegel-Haueter SE, Fielding K, Sanneh M, Kidd M, et al. Influence of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin on antibody and cytokine responses to human neonatal vaccination. *J Immunol* 2002;168(2):919–25.
- [14] Ota MO, Vekemans J, Schlegel-Haueter SE, Fielding K, Whittle H, Lambert PH, et al. Hepatitis B immunisation induces higher antibody and memory Th2 responses in new-borns than in adults. *Vaccine* 2004;22(3-4):511–9.
- [15] Blackwelder WC. Similarity/equivalence trials for combination vaccines. *Ann NY Acad Sci* 1995;754:321–8.
- [16] Röhm J. Therapeutic equivalence investigations: statistical considerations. *Stat Med* 1998;17(15–16):1703–14.
- [17] Horne AD, Lachenbruch PA, Getson PR, Hsu HS. Analysis of studies to evaluate immune response to combination vaccines. *Clin Infect Dis* 2001;33(5):S306–11.
- [18] Horne AD. The statistical analysis of immunogenicity data in vaccine trials. *Ann NY Acad Sci* 1995;754:329–46.
- [19] Gabutti G, Bona G, Dentico P, Bamfi F, Hardt K, Majori S, et al. Immunogenicity and reactivity following primary immunisation with a combined DTaP-HBV vaccine and a *Haemophilus influenzae* type b vaccine administered by separate or mixed injection. *Clin Drug Investig* 2005;25(5):315–23.
- [20] Pichichero ME, Bernstein H, Blatter MM, Schuerman L, Cheuvart B, Holmes SJ, et al. Immunogenicity and safety of a combination diphtheria, tetanus toxoid, acellular pertussis, hepatitis B, and inactivated poliovirus vaccine coadministered with a 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and a *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. *J Pediatr* 2007;151(1):43–9.
- [21] Isolani AP, Sversuti CS, Sell AM, Moliterno RA. Protection against hepatitis B by the Butang recombinant vaccine in newborn children in South Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006;101(5):551–3.
- [22] Elisbao M, do C, Baldy JL, Bonametti AM, Reiche EM, Morimoto HK, et al. Intradermal vaccination of adults with three low doses (2 micrograms) of recombinant hepatitis B vaccine. II. Persistence of immunity and induction of immunologic memory. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003;98(8):1109–13.
- [23] Francois G, Duclos P, Margolis H, Lavanchy D, Siegrist CA, Meheus A, et al. Vaccine safety controversies and the future of vaccination programs. *Pediatr Infect Dis J* 2005;24(11):953–61.
- [24] Martino A, Casetti R, Poccia F. Enhancement of BCG-induced Th1 immune response through V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell activation with non-peptidic drugs. *Vaccine* 2007;25(6):1023–9.
- [25] Girardi M. Immunosurveillance and immunoregulation by gamma delta T cells. *J Invest Dermatol* 2006;126(1):25–31.
- [26] Shrestha N, Ida JA, Lubinski AS, Pallin M, Kaplan G, Haslett PA. Regulation of acquired immunity by gamma delta T-cell/dendritic-cell interactions. *Ann NY Acad Sci* 2005;1062:79–94.
- [27] Larson AA, Dinulos JG. Cutaneous bacterial infections in the newborn. *Curr Opin Pediatr* 2005;17:481–5.
- [28] Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol* 2007;7(5):379–90.
- [29] Adkins B, Leclerc C, Marshall-Clarke S. Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nat Rev Immunol* 2004;4(7):553–64.
- [30] Salmi M, Jalkanen S. Lymphocyte homing to the gut: attraction, adhesion, and commitment. *Immunol Rev* 2005;206:100–13.
- [31] Marchant A, Goldman M. T cell-mediated immune responses in human newborns: ready to learn? *Clin Exp Immunol* 2005;141(1):10–8.
- [32] Mazzola TN, Da Silva MT, Moreno YM, Lima SC, Carniel EF, Morcillo AM, et al. Robust  $\gamma\delta^+$  T cell expansion in infants immunized at birth with BCG vaccine. *Vaccine* 2007;25(34):6313–20.
- [33] Kaplan G. Rational vaccine development—a new trend in tuberculosis control. *N Engl J Med* 2005;353(15):1624–5.
- [34] Foulds KE, Wu CY, Seder RA. Th1 memory: implications for vaccine development. *Immunol Rev* 2006;211:58–66.
- [35] Tovo PA, Lazier L, Versace A. Hepatitis B virus and hepatitis C virus infections in children. *Curr Opin Infect Dis* 2005;18(3):261–6.

**CN**  
**EDITORAÇÃO**  
F. (19)9188.8666



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)