

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

ANA LUIZA NETO JUNQUEIRA

**ENSAIO CLÍNICO CONTROLADO E RANDOMIZADO PARA
AVALIAR A IMUNOGENICIDADE E REATOGENICIDADE DA
VACINA CONTRA HEPATITE B (BUTANG®), APLICADA EM
RECÉM-NASCIDOS NA REGIÃO VENTRO GLUTEA OU VASTO
LATERAL DA COXA**

**Goiânia
2009**

ANA LUIZA NETO JUNQUEIRA

**ENSAIO CLÍNICO CONTROLADO E RANDOMIZADO PARA
AVALIAR A IMUNOGENICIDADE E REATOGENICIDADE DA
VACINA CONTRA HEPATITE B (BUTANG®) APLICADA EM
RECÉM-NASCIDOS NA REGIÃO VENTRO GLUTEA OU
VASTO LATERAL DA COXA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Dra. Sheila Araújo Teles

**Goiânia
2009**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
da Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluna: Ana Luiza Neto Junqueira

Orientadora: Professora Dra. Sheila Araújo Teles

Membros:

1. Professora Dra. Sheila Araujo Teles

2. Professor Dr. Paulo Roberto Sucasas da Costa

3. Professora Dra. Márcia Maria Tavares Machado

4. Professora Dra. Regina Maria Bringel Martins

5. Professora Dra. Ruth Minamisava

Ou

6. Professora Dra. Sandra Maria Brunini de Souza

7. Professora Dra. Janaína Valadares Guimarães

Data: 13/08/2009

Dedico este trabalho ao meu esposo Antônio, que esteve em todos os momentos me apoiando, incondicionalmente;

Aos meus filhos Luiz Antonio, Lucas José e Leandro, por tudo que representam em minha vida;

Aos meus pais Satyro e Maria pelas lições de vida, amor, união e desprendimento;

À Dra. Sheila Araújo Teles que me possibilitou realizar este trabalho, que tanto almejava, acreditando e confiando em mim.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por iluminar meu caminho e por tudo que tem me oferecido;

À Professora Dra. Sheila Araújo Teles, orientadora, colega e amiga de todos os momentos. Agradeço por ela ser tão destemida e não hesitar em traçar novos caminhos, com sabedoria, conhecimento e segurança, oferecendo-me esta oportunidade única e imensurável em minha vida pessoal e profissional. Minha eterna gratidão;

Ao Professor Dr. Celmo Celeno Porto coordenador do curso de pós graduação em Ciências da Saúde da UFG;

À Secretária do Curso de Pós Graduação em Ciências da Saúde da UFG, Sra. Valdecina Quirino;

Ao Professor Dr. Marcelo Medeiros, Diretor da Faculdade de Enfermagem/UFG, pelo apoio e incentivo à qualificação docente;

Às mães que confiaram e abriram as portas de suas residências, para trabalharmos com seus bebês e, em especial àquelas que se deslocaram de outras cidades, não medindo esforços para manterem suas crianças neste trabalho;

À Divisão de Imunização da Secretaria da Saúde do Município de Goiânia, pelo apoio e suporte técnico em todo o processo da vacinação, em especial às enfermeiras Professora Aminadab Rodrigues Rodarte, e, Maria das Dores Ribeiro e toda a equipe técnica.

Aos funcionários das Maternidades Nossa Senhora de Lourdes, Goiânia Leste, Vila Nova e Hospital São Lucas que colaboraram com as informações durante a coleta de dados;

Ao Distrito Sanitário Leste da Secretaria Municipal da Saúde do Município de Goiânia, pelo apoio a esta pesquisa, orientando e disponibilizando as estruturas de saúde desta região;

À enfermeira mestra Viviane, companheira diária na coleta dos dados, pela alegria, responsabilidade e disposição, fazendo nossa tarefa mais leve, agradeço pela tolerância nos momentos mais críticos;

À equipe do Núcleo de DST/Aids da Faculdade de Enfermagem da Universidade Federal de Goiás (NUCLAIDs), que trabalharam neste projeto, Cíntia Caroline V. Pereira, Christiane M. Souza, Débora F.M. de Castro, Divânia D. S. França, , Érica dos S. Queiroz, Fernanda Camargo, Grécia C. Pessoni, Juliane W , Karlla Antonieta A. Caetano, Kamilla V.F. Alexandre, Letícia R. Silva, Lorraine A, Ludmila A. Costa, Nativa Helena A. Del-Rios e Priscila dos Santos Junqueira, contribuição ímpar a esta pesquisa, tarefa difícil, que fizeram com grande competência e responsabilidade. Meu reconhecimento e gratidão;

Ao Laboratório de Virologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG, na pessoa da Professora Dra. Regina Maria Bringel Martins pelo apoio técnico para análise da sorologia;

Ao Laboratório do Hospital das Clínicas da UFG, na pessoa da biomédica Isolina Maria Xavier Rodrigues pela realização dos testes quantitativos do anti-HBs;

Aos colegas da disciplina Introdução à Saúde Coletiva da Faculdade de Medicina/UFG, Professores: Elaine Maria Xavier Seronni e Sandro Rogério, pela compreensão e colaboração.

Aos colegas da Faculdade de Enfermagem/UFG, em especial aos Professores: Dra. Márcia Maria de Souza, Dra. Sandra Maria Brunini Souza e Marcos André de Matos, pelo carinho, incentivo e compreensão dispensados durante este trabalho;

Ao meu esposo e filhos que me apoiaram nos momentos que precisei;

Aos meus pais Satyro e Maria, e todos da família que compreenderam minhas ausências no decorrer deste trabalho;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Vírus da hepatite B	14
1.1.1 Subtipos e genótipos	17
1.2 Epidemiologia da Infecção pelo HBV	18
1.3 Diagnóstico laboratorial	19
1.4 Aspectos clínicos e tratamento da hepatite B	21
1.5 Vacina contra hepatite B	23
1.6 Vacina contra hepatite B em RN	27
1.6.1 Administração intramuscular da vacina contra hepatite B em crianças	29
1.7 Justificativa	34
2. OBJETIVOS	36
2.1 Objetivo Geral	36
2.2 Objetivos específicos	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 Delineamento	37
3.2 População alvo	37
3.3 Amostra	38
3.3.1 Critérios de inclusão	38
3.3.2 Critérios de exclusão	39

3.3.3 Variáveis do estudo	39
3.3.3.1 Desfecho da resposta vacinal	39
3.3.3.2 Desfecho da reatogenicidade vacinal	39
3.3.4 Variáveis de predição referentes aos RN	39
3.3.5 Variáveis de predição referentes às mães	40
3.4 Recrutamento	40
3.5 Randomização	41
3.6 Entrevista	41
3.7 Comitê de ética, Registro International e Financiamento	42
3.8 Transporte e conservação dos imunógenos	42
3.9 Vacinação contra o HBV	43
3.9.1 Procedimento para a administração da vacina	43
3.9.2 Procedimento para a administração da vacina na região ventro glútea	43
3.9.3 Procedimento para a administração da vacina na região Vasto lateral da coxa	44
3.9.4 Vacinação da 2ª e 3ª dose em domicílio	45
3.10 Avaliação da reatogenicidade	45
3.11 Coleta das amostras sanguíneas	46
3.11.1 Coleta das amostras sanguíneas das crianças	46
3.11.2 Coleta das amostras sanguíneas das mães	46
3.11.3 Transporte e conservação do sangue	47
3.12 Ensaio sorológicos	47
3.12.1 Detecção quantitativa do anti-HBs	47
3.12.2 Detecção qualitativa do anti-HBs	48
3.12.3 Detecção qualitativa do anti-HBc	48

3.13 Análise dos dados	49
4. RESULTADOS	50
4.1 Características dos RN e das mães	52
4.2 Resposta vacinal	55
4.3 Reatogenicidade vacinal	63
4.4 Anti-HBs maternos e resposta vacinal em RN	65
5. DISCUSSÃO	66
6. CONCLUSÕES	71
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
APÊNDICES	88
Apêndice A - Questionário	89
Apêndice B - Questionário visita I	91
Apêndice C - Questionário visita II	92
Apêndice D - Questionário visita III	93
ANEXOS	94
Anexo A - Carta de Aprovação do Comitê de ética	
Anexo B - Registro do IRSCTN	
Anexo C - Artigo para publicação	

FIGURAS e TABELAS

Figura 1	Desenho esquemático do HBV	15
Figura 2	Micrografia eletrônica do vírus da hepatite B (HBV) e subpartículas virais	16
Figura 3	Perfil sorológico da hepatite B aguda	20
Figura 4	Perfil sorológico da hepatite B crônica	20
Figura 5	Países que introduziram a vacina contra o HBV no programa Nacional de Vacinação	25
Figura 6	Vacina aplicada no músculo vasto lateral da coxa	31
Figura 7	Localização da região ventro glútea	32
Figura 8	Mapa de Goiânia-GO, divisão territorial por Distrito Sanitário	38
Figura 9	Administração da vacina na região ventro glútea	44
Figura 10	Administração da vacina na região vasto lateral da coxa	45
Figura 11	Fluxograma do estudo realizado em 580 recém-nascidos vacinados com a Butang® nas regiões ventro glútea (VG) e vasto lateral da coxa (VLC) em Goiânia-GO, 2007-2008	51
Figura 12	Tipo de resposta vacinal contra hepatite B em lactentes que receberam a vacina Butang® nas regiões ventro glútea (VG) e vasto lateral da coxa (VLC) em Goiânia-GO, 2007-2008	57
Figura 13	Resposta vacinal contra hepatite B em lactentes, de acordo com a situação vacinal das mães, Goiânia-GO, 2007-2008	65
Tabela 1	Características dos 474 lactentes que concluíram o estudo, de acordo com o protocolo, Goiânia-GO, 2007-2008	53

Tabela 2	Características das puérperas, cujos filhos receberam à vacina contra hepatite B na região ventro glútea ou vasto lateral da coxa, Goiânia-GO, 2007-2008	54
Tabela 3	Análise, pelo protocolo, da resposta à vacina Butang [®] aplicada em lactentes na região vasto lateral da coxa ou ventro glútea, Goiânia-GO, 2007-2008	55
Tabela 4	Análise, por intenção de tratar, da resposta à vacina Butang [®] em lactentes vacinados na região VG e VLC em Goiânia-GO, 2007-2008	56
Tabela 5.	Média geométrica dos títulos (GMT) de anti-HBs em lactentes respondedores à Butang [®] , segundo local de aplicação, Goiânia-GO, 2007-2008	58
Tabela 6	Características dos lactentes de acordo com o tipo de resposta e local da aplicação da vacina Butang [®] , Goiânia – GO, 2007-2008	60
Tabela 7	Características dos lactentes não respondedores a vacina Butang [®] em Goiânia-GO, 2007-2008	62
Tabela 8	Comparação da reatogenicidade da vacina Butang [®] após cada dose aplicada na região ventro glútea e vasto lateral da coxa em lactentes vacinados em Goiânia-Goiás, 2007-2008	64

RESUMO

Este estudo trata-se do primeiro ensaio clínico randomizado controlado, para avaliação da imunogenicidade e reatogenicidade da vacina Butang[®] em recém-nascidos a termo, que receberam a primeira dose da vacina nas primeiras doze horas de vida, comparando duas regiões de aplicação do imunógeno: ventre glútea (VG) e vasto lateral da coxa (VLC). A resposta à Butang[®] foi avaliada em 224 RN vacinados na região VG e 250 na VLC. Os dois grupos foram semelhantes quanto ao sexo, peso, intervalo de tempo entre as doses da vacina e características maternas. Ao comparar a imunogenicidade da Butang[®], verificou-se que a proporção de crianças que desenvolveu títulos protetores de anti-HBs após a vacinação na região VG foi de 97,8% (IC 95%: 94,8-99,3) com média geométrica dos títulos (GMT) de anti-HBs de 427,5 mUI/mL (IC 95%: 344,9–530,0), sendo semelhante às vacinadas na região VLC (97,6%; IC 95%: 94,8–99,1; GMT: 572,0 mUI/mL; IC 95%: 471,1–694,6), evidenciando, portanto, esses locais como apropriados para a administração do imunógeno. Onze RN não responderam à Butang[®] com títulos protetores, sendo que cinco foram vacinados na região VG e seis na VLC. A maioria dessas crianças era do sexo masculino, um fator que parece interferir na resposta vacinal contra hepatite B. Em geral, observou-se uma proporção maior de reações locais e febre de acordo com o número de doses recebidas. Além disso, após a terceira dose da vacina, a proporção de endureção foi menor (4,0 vs. 11,4) em crianças vacinadas na região VG do que nas vacinadas na VLC ($p < 0,05$). Não foi observada qualquer associação entre títulos de anti-HBs maternos e resposta vacinal dos seus conceptos. As evidências deste estudo mostram que a região VG é um local seguro e imunogênico para a administração da vacina contra hepatite B em lactentes.

Palavras chave: vacina contra hepatite B, recém-nascido, lactentes, ventre glútea e vasto lateral da coxa.

ABSTRACT

This study is the first randomized controlled clinical trial for assessing the immunogenicity and reatogenicity of the Butang[®] vaccine in full term newborns, who were given the first vaccine dose within the first 12 hours of life, comparing two regions of application for the vaccine: anterolateral thigh (ALT) and ventrogluteal (VG). Butang[®] response was assessed in 224 newborns who were given the vaccine in the VG region and 250 in the ALT one. Both groups were similar regarding gender, weight, timing interval between doses of the vaccine and maternal characteristics. When comparing Butang[®] immunogenicity, we verified that the proportion of babies who developed anti-HBs protecting titres after three vaccine doses in the VG region was of 97.8% (IC 95%: 94.8–99.3) with geometric mean titer (GMT) of 427.5 mUI/mL (IC 95%: 344.9–530.0), similar to those who were given in the ALT region (97.6%; IC 95%: 94.8–99.1; GMT: 572.0 mUI/mL; IC 95%: 471.1–694.6), which provides evidence that this place is appropriate for hepatitis B vaccination. Eleven newborns did not respond to Butang[®], being six of them vaccinated in the VG region and five in the ALT. The most of them were male, one factor which seems to interfere with hepatitis B vaccine response. We verified an increasing proportion of local reactions and fever according to the number of doses given. In addition, after the third dose the proportion of induration (4.0 vs. 11.4) was higher among babies who were given the vaccine in the ALT region when compared to those who were given in the VG region ($p < 0,05$). No association was observed concerning maternal anti-HBs titres and newborn vaccine response. The evidences of this study showed that the VG region is a safe and immunogenic site to hepatitis B vaccine administration in newborns.

Key words: hepatitis B vaccine, newborn, infant, ventrogluteal, anterolateral thigh muscle.

1. INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da hepatite B é uma das doenças mais comuns em todo o mundo, sendo responsável por aproximadamente um milhão de óbitos a cada ano. Estima-se em mais de dois bilhões o número de pessoas que foram expostas ao HBV e mais de 350 milhões de portadores crônicos do HBV, que apresentam, ainda, risco de desenvolver cirrose e carcinoma hepatocelular (DIENSTAG, 2008; LIAW; CHU, 2009).

1.1 VIRUS DA HEPATITE B

O HBV é um vírus hepatotrópico, classificado na família *Hepadnaviridae*, gênero *Orthohepadnavirus* (SCHAEFER, 2007). Esse vírus possui aproximadamente 42 nm de diâmetro, sendo formado externamente por um envoltório e, internamente, por um nucleocapsídeo icosaédrico, envolvendo o genoma viral (LIANG, 2009). O genoma do HBV é composto por uma molécula de DNA circular, de fita parcialmente dupla, com aproximadamente 3,2 kb (Figura 1). A fita de polaridade negativa possui quatro sequências de leitura aberta (Pré-S/S, Pré-C/C, Pol e X), que codificam as proteínas estruturais e não estruturais do vírus, sendo ligadas covalentemente na sua porção 5' a DNA polimerase. Já a fita de polaridade positiva é incompleta e, seu tamanho é variável em relação ao tamanho da fita negativa (BLOCK et al., 2007; HOLLINGER; LIANG, 2001; LIANG, 2009).

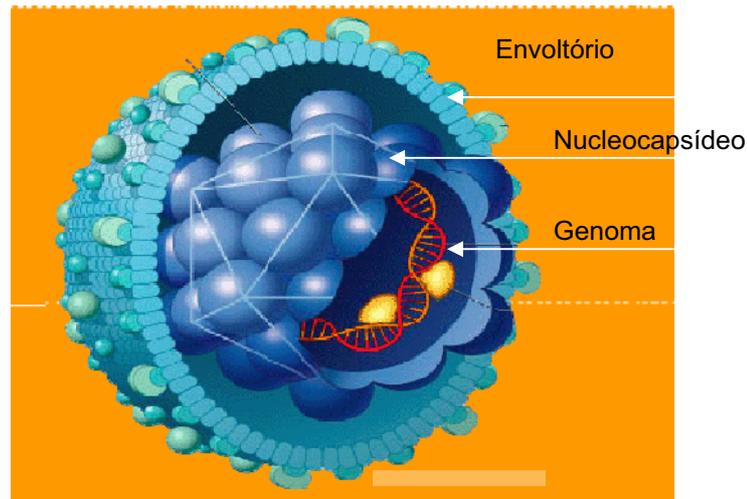


Figura 1. Desenho esquemático do vírus da hepatite B (modificado).
Fonte: www.drthuthuy.com/images/Lagan03.jpg

A sequência Pré-S/S, pelo uso alternativo de três códons de iniciação, codifica as proteínas do envoltório viral: Pré-S1 (*Large - L*), Pré-S2 (*Middle-M*) e S (*Small-S*). A proteína L (39 kDa) é essencial para infecciosidade do HBV, sendo necessária para adsorção do vírus a célula hospedeira e envelopamento (BLOCK et al., 2007; GLEBE, 2007). A função da proteína M (31 kDa) ainda não foi estabelecida, pois sua ausência não suprime a formação do virion, nem impede a infecciosidade viral (GLEBE, 2007). Mais recentemente, estudos têm sugerido a participação de antígenos Pré-S2 mutantes no desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (FANG et al., 2008; GLEBE, 2007; HSIEH et al., 2004). A proteína S (HBsAg) é a principal proteína de superfície do HBV, sendo encontrada vinte e cem vezes mais do que os antígenos M e L, respectivamente (BLOCK et al., 2007). Essa proteína é capaz de elicitar anticorpos neutralizantes (anti-HBs), independente do genótipo viral, sendo utilizada na produção da vacina contra hepatite B (ZANETTI et al., 2008). Contudo, variantes do HBV, com mutações na região S, têm sido associados a infecção em indivíduos vacinados, sendo a mutação mais frequente a substituição da glicina (G) pela arginina (R) no códom 145 (G145R) no determinante “a”, a qual representa a região imunodominante do HBsAg (CARMAN et al., 1990; COLEMAN, 2006; PURDY et al., 2007).

As proteínas do envelope, com predominância da proteína S, são produzidas em excesso durante a replicação viral e circulam no sangue de portadores do HBV como subpartículas esféricas ou circulares e tubulares (Figura 2),

sendo utilizadas como antígenos para produção de vacina e sorodiagnóstico da hepatite B. Acredita-se que essas subpartículas auxiliem na imunoevasão do vírus (BLOCK et al., 2007).

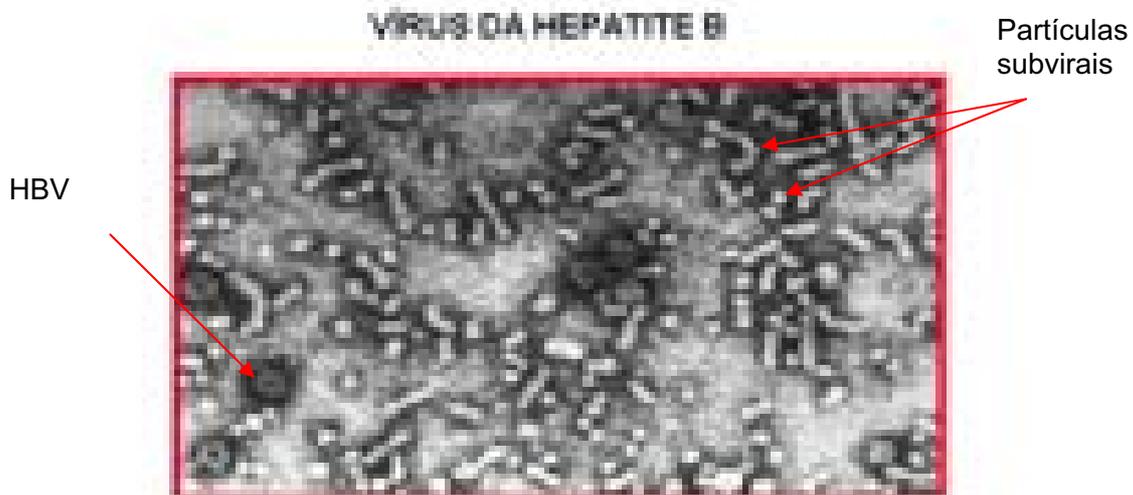


Figura 2. Micrografia eletrônica do vírus da hepatite B (HBV) e subpartículas virais .

Disponível em: www.cdc.gov/ncidvd/diseases/hepatitis/slideset/hep_b/slide 1.htm
(modificado)

A sequência Pré-C/C codifica as proteínas “core” (HBcAg) e “e” (HBeAg). A primeira compõe o nucleocapsídeo viral e parece desempenhar um importante papel durante a replicação do HBV. Além disso, o antígeno “core” é capaz de elicitar anticorpos (anti-HBc), independente de células T (MILICH; MCLACHLAN, 1986). Já o antígeno “e” é uma proteína solúvel, e sua detecção em indivíduos infectados pelo HBV indica replicação viral e viremia elevada. Acredita-se que a elevada predisposição para o desenvolvimento de hepatite B persistente em neonatos nascidos de mães infectadas, seja devida a imunotolerância de células T ao HBeAg estabelecida “in utero” (CHANG, 2007; GLEBE, 2007; LIANG, 2009).

A sequência P é a mais longa, e se sobrepõe a todas as outras. Essa região codifica uma enzima multifuncional, que atua como proteína terminal ou primase, transcriptase reversa e RNase H (GANEM; PRINCE, 2004; HOLLINGER; LIANG, 2001; LIANG, 2009). Por fim, a sequência X codifica uma proteína encontrada apenas nos hepatócitos infectados, que parece ter capacidade de ativar vários elementos transcricionais virais e celulares, e tem sido associada a carcinogênese hepática em portadores crônicos do HBV (BLOCK et al., 2007; DI BISCEGLIE, 2009).

1.1.1 Subtipos e genótipos

O HBV apresenta variabilidade intermediária entre os vírus RNA e DNA (BLOCK et al., 2007). Diferenças antigênicas no HBsAg permitiram a classificação desse vírus em nove subtipos: *adw2*, *adw4*, *ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *ayr*, *adrq+* e *adrq* (BANCROFT et al., 1972; COUROCÈ-PAUTY et al., 1978; COUROCÈ et al., 1976; LE BOUVIER, 1971). A nível molecular, o HBV tem sido classificado em oito genótipos (A-H), baseado em uma divergência intergrupo de no mínimo 8% do genoma completo ou 4% da região pré-S (ARAUZ-RUIZ et al., 2002; NORDER et al., 2004; OKAMOTO et al., 1988; STUYVER et al., 2000). Esses grupos genômicos possuem distribuição variável. O genótipo A é encontrado mais frequentemente na África Sub-Saara, norte da Europa e Estados Unidos (MAHTAB et al., 2008; NORDER et al., 2004). Os genótipos B e C em países do sudeste Asiático e o D no Mediterrâneo, Europa Oriental e Índia (MAHTAB et al., 2008). O genótipo E parece restrito ao continente africano (NORDER et al., 2004), e o F comum na população aborígine da América do Sul (CAMPOS et al., 2005; NORDER et al., 2004). O genótipo G tem sido encontrado nos Estados Unidos, México e Europa (GONZALEZ-HUEZO et al., 2003; MAHTAB et al., 2008), e o H na América Central (CAMPOS et al., 2005). Mais recentemente, um novo variante do HBV foi identificado no Vietnã, sendo sugerida a sua denominação como genótipo I (HUY et al., 2008).

Variações intragenotípicas (4%) têm permitido a identificação de subgenótipos para o grupo A (A1 a A3), B (B1 a B6), C (C1 a C6), D (D1 a D6) e F (F1 a F4) (LUSIDA et al., 2008; MELDAL et al., 2009; NURAINY et al., 2008; SCHAEFER, 2007).

No Brasil, os grupos genômicos A, D e F são predominantes (MELLO et al., 2007). No Estado de Goiás, estudos conduzidos em hemodialisados (TELES et al., 2002; TELES et al., 1999), adolescentes de baixa renda (OLIVEIRA et al., 2006), usuários de drogas não injetáveis (FERREIRA et al., 2009) e comunidade afro-brasileira isolada (MATOS et al., 2009), têm mostrado a circulação desses genótipos em nossa região.

1.2 EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO HBV

O DNA do HBV tem sido detectado no sangue, saliva e sêmen de indivíduos infectados, embora concentrações mais elevadas do vírus sejam encontradas no sangue (ALTER, 2003; JENISON et al., 1987; KIDD-LJUNGGREN et al., 2006). Além disso, esse vírus mantém-se viável e infeccioso em superfícies no ambiente por, no mínimo, uma semana (BOND et al., 1981). Assim, existem várias rotas de transmissão do HBV, incluindo relações sexuais desprotegidas (MATOS et al., 2008; PASSOS et al., 2007), compartilhamento de seringa/agulhas contaminadas com sangue (LUM et al., 2008; STARK et al., 1997), acidentes com perfurocortantes (DE SCHRIJVER et al., 2005; SAMANDARI et al., 2007), uso comum de objetos pessoais cortantes como alicate de unha e lâminas de barbear (MARIANO et al., 2004) e durante o parto, da mãe para o filho (WISEMAN et al., 2009).

Regiões onde a prevalência para o HBsAg é igual ou superior a 8% têm sido consideradas de endemicidade elevada para o HBV, e incluem a China, Indonésia, Nigéria, partes da Ásia e África (SHEPARD et al., 2006). Outras áreas tradicionalmente hiperendêmicas (> 8% da população HBsAg positiva), em razão da implementação da vacina contra hepatite B, atualmente têm sido classificadas como de endemicidade intermediária (2-7% da população HBsAg positiva) como o Alasca Ocidental, partes do leste da Ásia e África Sub-Saara (MCMAHON, 2005). Adicionalmente são consideradas regiões de prevalência intermediária para o HBV: parte do Mediterrâneo, leste Europeu, e sudoeste da Ásia (SHEPARD et al., 2006). Já a Europa Ocidental, partes das América do Norte e do Sul apresentam baixa prevalência para infecção pelo HBV (< 2% da população HBsAg positiva) (PARANA; ALMEIDA, 2005; SHEPARD et al., 2006).

Estudos prévios em doadores de sangue têm mostrado taxas variáveis de prevalência para a infecção pelo HBV nas diferentes regiões do País e, até mesmo dentro de uma mesma região. Em geral, as Regiões Centro-Oeste, Sudeste e Nordeste têm sido consideradas de baixa endemicidade para o HBV (AGUIAR et al., 2001; ANDRADE et al., 2006; MARTELLI et al., 1999). A Região Norte tem sido apontada como de prevalência intermediária a alta (MARTELLI et al., 1999; SILVA et

al., 2006). Já a Região Sul apresenta endemicidade intermediária a baixa (MARTELLI et al., 1999; ROSINI et al., 2003).

Em Goiás, um estudo realizado há vinte anos em doadores de sangue em Goiânia mostrou uma taxa para o HBsAg de 1,9% (MARTELLI et al., 1990). Outras investigações conduzidas em grupos específicos têm revelado taxas de prevalência de 2% em meninos de/na rua (PORTO et al., 1994), 0,5% em gestante-parturientes (CARDOSO et al., 1996), 0,7% em profissionais de hemodiálise (LOPES et al., 2001), 14,5% em pacientes com suspeita clínica de hepatite (SILVA et al., 2002), 5,8% em hemodialisados (TELES et al., 2002), 0% em anestesiológicos (CARNEIRO; DAHER, 2003), 1,6% em indivíduos com problemas mentais (DE SOUZA et al., 2004), 1% em hemofílicos (TAVARES et al., 2004), 0,7% em profissionais de laboratório (SILVA et al., 2005), 5,9% em adolescentes de baixa renda (OLIVEIRA et al., 2006), 1,0% em usuários de drogas não injetáveis (FERREIRA et al., 2009) e 1,7% em afrodescendentes de comunidades isoladas (MATOS et al., 2009).

1.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico laboratorial da hepatite B pode ser realizado rotineiramente por meio dos seguintes marcadores sorológicos: HBsAg, anti-HBs, anti-HBe, anti-HBc IgM e total (IgM e IgG) (BOWDEN, 2006; LIAW; CHU, 2009).

Na hepatite aguda, aproximadamente, três a cinco semanas após a exposição ao HBV, o HBsAg já pode ser detectado no soro de indivíduos infectados, indicando infecciosidade. Além desse marcador são encontrados também o HBeAg e o anti-HBc IgM. O HBsAg declina a níveis indetectáveis até o sexto mês do seu surgimento, quando então surge o anti-HBs, que indica resolução e imunidade contra o HBV. O HBeAg desaparece antes do HBsAg, aproximadamente, três meses após a sua detecção, quando então aparece o seu anticorpo correspondente (anti-HBe), que indica diminuição ou ausência de viremia e evolução para cura. Já o anti-HBc IgM desaparece após o HBsAg, mas a fração IgG do anti-HBc persiste por toda a vida do indivíduo (BOWDEN, 2006; LIANG, 2009; LIAW; CHU, 2009; SERVOSS; FRIEDMAN, 2006) (Figura 3).

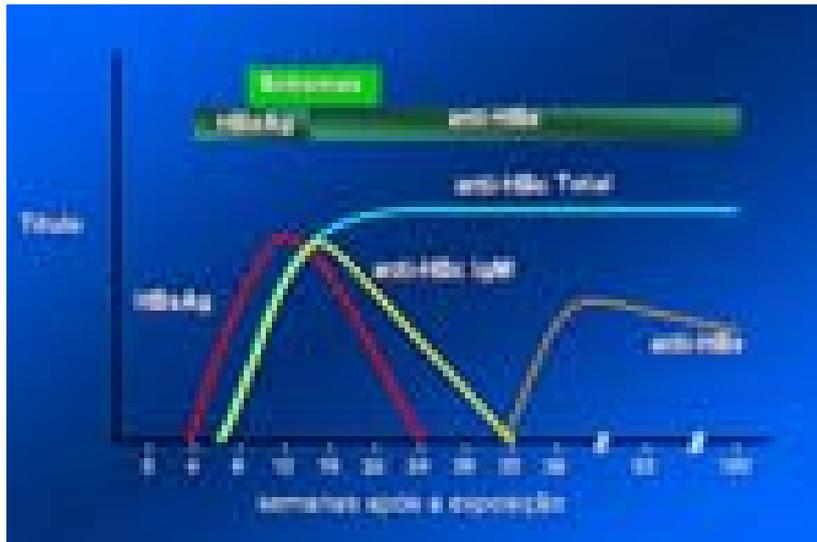


Figura 3. Perfil sorológico da hepatite B aguda.

Fonte: CDC - www.cdc.gov/hcidod/diseases/hepatitis/slideset (modificado).

A positividade do HBsAg por mais de seis meses indica evolução para cronicidade (LIAW; CHU, 2009). Nesses indivíduos, são detectados normalmente os marcadores HBsAg e anti-HBc total. Já o HBeAg, anti-HBe e anti-HBc IgM poderão ser ou não detectados, dependendo da fase da doença crônica (BOWDEN, 2006; SERVOSS; FRIEDMAN, 2006) (Figura 4).

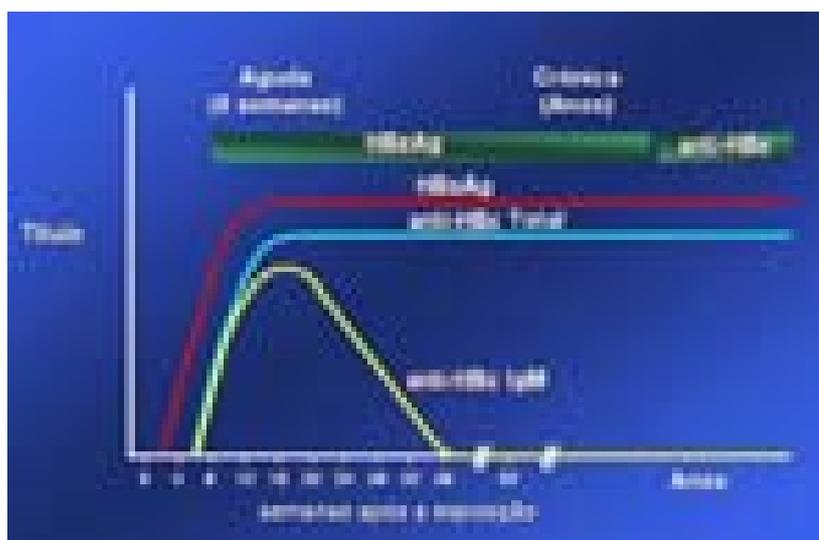


Figura 4. Perfil sorológico da infecção crônica pelo HBV.

Fonte: CDC- www.cdc.gov/hcidod/diseases/hepatitis/slideset (modificado).

Testes moleculares para detecção qualitativa e quantitativa do DNA do HBV têm sido ferramentas úteis para elucidação de perfis sorológicos atípicos, monitoramento da viremia e da terapia antiviral. Atualmente, existem vários testes comerciais para detecção quantitativa do DNA viral, sendo seus resultados expressos em UI/L, conforme padrão da Organização Mundial de Saúde (OMS), permitindo, assim, a comparação dos resultados de diferentes estudos (BOWDEN, 2006; SERVOSS; FRIEDMAN, 2006).

1.4 ASPECTOS CLÍNICOS E TRATAMENTO DA HEPATITE B

O período de incubação da hepatite B é de aproximadamente duas a seis semanas (VILLENEUVE, 2005). A infecção aguda é assintomática em mais de 90% das crianças infectadas. Entretanto, 30 a 50% dos adultos desenvolvem sintomas clínicos como icterícia, náuseas, vômitos, dor abdominal, febre, urina escura, acolia fecal e hepatomegalia (CHANG, 2007; FATTOVICH, 2003). Uma forma grave e altamente letal da hepatite B aguda, denominada de hepatite B fulminante, pode ocorrer em 0,1 a 0,5% dos casos (PUNGPAPONG et al., 2007).

A idade na época da infecção é determinante para o desenvolvimento da doença crônica. Neonatos infectados possuem um risco de até 90% ou mais de evoluírem para hepatite B crônica. Esse risco declina para até 50% quando a infecção ocorre entre 1 e 5 anos de idade, e menos de 10% em adultos (SORRELL et al., 2009).

A infecção crônica pelo HBV inclui três fases: tolerância imune, hepatite crônica ativa/imune ativa e inativa (MCMAHON, 2009). A primeira fase é caracterizada pela presença do HBsAg, níveis séricos elevados de viremia, aminotransferases normais e ausência ou presença de inflamação hepática leve (biopsia hepática). Em indivíduos infectados por via perinatal, essa fase pode persistir por uma a quatro décadas. Já os que adquiriram a infecção na infância ou idade adulta, essa fase pode ser mais curta ou ausente (MCMAHON, 2009; YIM; LOK, 2006).

Na hepatite crônica ativa, o portador pode ser HBeAg positivo, possuir níveis elevados de viremia, com elevação persistente ou intermitente das

aminotransferases e inflamação hepática ativa (MCMAHON, 2009). A duração desse estado, frequência e elevação súbita de aminotrasferases (*flare*) parecem aumentar o risco de cirrose e carcinoma hepatocelular. A soroconversão para o anti-HBe, acompanhada de níveis detectáveis de DNA do HBV, aminotransferases e necroinflamação pode, também, ser observadas nessa fase. O indivíduo pode evoluir para essa forma de hepatite crônica, a partir do estado de portador HBsAg inativo, ou diretamente de uma fase HBeAg-positiva. Geralmente, os indivíduos são mais velhos e têm doença hepática mais avançada (ELGOUHARI et al., 2008; PUNGPAPONG et al., 2007).

O estado de portador inativo é caracterizado pela positividade para o anti-HBe, aminotransferases normais e DNA-HBV em níveis baixos ou indetectáveis. Na biópsia hepática é observada fibrose mínima e hepatite leve. Esse estado pode persistir indefinidamente, sendo o prognóstico geralmente favorável (YIM; LOK, 2006).

Na hepatite B crônica, o desaparecimento do HBsAg ocorre numa taxa de 0,5 a 1% ao ano, acompanhado de níveis de DNA-HBV indetectáveis, normalização das enzimas hepáticas e melhora do processo inflamatório (YIM; LOK, 2006). A evolução da hepatite B crônica para cirrose tem sido estimada em 2 a 6% para os pacientes HBeAg positivos e 8 a 10% para os HBeAg negativos. Em relação ao carcinoma hepatocelular, a taxa de incidência tem sido de < 1% para os não cirróticos e de 2 a 3% entre os cirróticos. Idade mais avançada, sexo masculino, co-infecção pelo vírus da hepatite C, consumo regular de álcool, níveis elevados de DNA-HBV, variantes do HBV (mutantes pré-core) e genótipos (C e B) parecem potencializar o risco de cirrose e câncer hepático em portadores de hepatite B crônica (PUNGPAPONG et al., 2007; VILLENEUVE, 2005; YIM; LOK, 2006).

O tratamento da infecção crônica pelo HBV é baseado na clínica, na fase de replicação viral e presença de indicadores de lesão hepática. O principal objetivo é suprimir a replicação viral, prevenindo danos irreversíveis ao fígado (SORRELL et al., 2009).

Atualmente, sete fármacos são aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para tratamento da hepatite B crônica nos Estados Unidos da América: Interferon alfa-2b, peginterferon alfa-2a, lamivudina, adefovir dipivoxil, entecavir, telbuvudina, e tenofovir (DEGERTEKIN; LOK, 2009; SORRELL et al.,

2009). No Brasil, os antivirais indicados e fornecidos gratuitamente pelo SUS, conforme Portaria nº 860 de 2002 do Ministério da Saúde, são: Interferon alfa-2b e lamivudina (BRASIL, 2002). São candidatos ao tratamento: indivíduos com idade superior a dois anos, HBsAg positivo por mais de seis meses, HBsAg positivo ou HBV-DNA > 10⁴ cópias/mL, transaminases > 2 vezes o limite superior da normalidade e ter realizado, nos últimos dois anos, biópsia hepática com evidência de atividade necro-inflamatória de moderada a intensa e/ou presença de fibrose moderada a intensa (BRASIL, 2008).

1.5 VACINA CONTRA HEPATITE B

O desenvolvimento de vacinas contra hepatite B foi um grande desafio e conquista para a saúde pública. A impossibilidade de o vírus crescer em cultura de tecidos e a limitação de modelos animais suscetíveis ao HBV impulsionaram o desenvolvimento de novos processos de produção da vacina (MAHONEY; KANE, 1999). No início da década de 80, a vacina contra hepatite B foi a primeira produzida a partir de plasma humano. Nessa, utilizou-se o plasma de indivíduos cronicamente infectados pelo HBV para obtenção do HBsAg. Contudo, as dificuldades para sua obtenção e o risco de transmissão de outros agentes veiculados pelo sangue, principalmente, o vírus da imunodeficiência humana, limitaram a produção da vacina plasma-derivado. Assim, um novo desafio se impôs, e um processo de produção, que utiliza tecnologia de DNA recombinante foi desenvolvido para obtenção do HBsAg. Essa tecnologia potencializou a produção da vacina contra hepatite B, favorecendo a sua introdução em programas de imunização em vários países do mundo (JAIN et al., 2000; JOSHI et al., 2000; KAUR; MANI, 2000; VAN HERCK; VAN DAMME, 2008; ZANETTI et al., 2008).

A primeira vacina produzida por meio de engenharia genética foi a *Engerix™-B*, produzida pelo laboratório belga - *SmithKline Beecham Biologicals, Rixensart, Belgium* (ASSAD; FRANCIS, 1999). Essa vacina é considerada, até hoje, o padrão ouro, e utiliza a levedura *Sacharomyces cerevisiae* para expressão do HBsAg recombinante. Atualmente, vários países produzem a vacina contra hepatite B, inclusive o Brasil; e outros sistemas de expressão para obtenção do HBsAg têm

sido utilizados para produção dessas vacinas (FLAQUET et al., 2001; IOSHIMOTO et al., 1999; JOSHI et al., 2000; KAUR; MANI, 2000).

A vacina brasileira contra hepatite B foi desenvolvida pelo Instituto Butantan, em São Paulo. Para sua produção, utiliza-se a levedura *Hansenula polymorfa* modificada geneticamente para obtenção do HBsAg recombinante (IOSHIMOTO et al., 1999). Esse sistema apresenta uma alta produtividade e baixo custo quando comparado a *Sacharomyces cerevisiae* para produção do antígeno recombinante (HIEU et al., 2002; SHIVANANDA et al., 2006). Alguns estudos têm mostrado uma boa imunogenicidade da Butang®, principalmente, em indivíduos jovens (BALDY et al., 2004; MARTINS et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2006).

Inicialmente, a vacina contra hepatite B foi recomendada a grupos populacionais que apresentavam maior risco da infecção pelo HBV, como profissionais de saúde, pacientes em hemodiálise, usuários de drogas, dentre outros. No entanto, a imunização seletiva não foi suficiente para reduzir a incidência global da infecção pelo HBV (VAN HERCK; VAN DAMME, 2008). Assim, desde 1991, a OMS tem recomendado a vacinação universal contra a hepatite B. Em 2007, 171 países membros já haviam incluído essa vacina em seus Programas de Imunização, sendo que em 139 desses países, 80% das crianças receberam o esquema completo (três doses) da vacina (Figura 5) (WHO, 2007).

Estudos têm mostrado o sucesso da implementação da vacina em vários países, com declínio da infecção pelo HBV e mudança no perfil de endemicidade para hepatite B (DAVAALKHAM et al., 2007; MAST et al., 2006; STROFFOLINI et al., 2000; TSEBE et al., 2001; VAN HERCK; VAN DAMME, 2008). Em Taiwan houve uma redução da positividade para o HBsAg em crianças de até 6 anos de idade de 10,5% em 1989, para 1,7% em 1993 (HSU et al., 1999) e, mais especificamente em Taipei, a prevalência para o HBsAg declinou para 0,5% em crianças com menos de 6 anos, nascidas entre 1999 e 2003 (NI et al., 2007).

Na Itália, 14 anos após a introdução da vacina nos programas de imunização, verificou-se um declínio na taxa de incidência do HBV de 6 casos para 0,02 casos/100.000 habitantes na faixa etária de 0-14 anos, e na de faixa de 15-24 anos de 41 para 0,5 casos/100.000, sendo que quando considerada todas as faixas etárias, o declínio foi de 12/100.000 para 1,6/100.000 (LA TORRE et al., 2008). Nos

Estados Unidos, entre 1990-2004 a incidência de hepatite B aguda declinou em 75%, sendo que em crianças e adolescentes a queda foi de 94%, coincidindo com o aumento da cobertura vacinal em crianças (SHEPARD et al., 2006).



Figura 5. Países que introduziram a vacina contra o HBV no programa Nacional de Vacinação (WHO/UNICEF, 2008).

Disponível em: http://www.who.int/immunization_monitoring/diseases/hepatitis/en/index. html.
Acessado em: 20/02/2009.

No Brasil, em 1989, a vacina contra hepatite B foi oficialmente utilizada em áreas endêmicas da Bacia Amazônica. Em 1992, foi estendida para os Estados do Amazonas e do Acre, e ampliada para os profissionais da área da saúde em risco ocupacional. Um ano após, os Estados de Santa Catarina, Paraná e Espírito Santo introduziram a vacina em seus Programas de Imunização para todas as crianças com menos de um ano de idade e, em 1995, o Distrito Federal adotou o mesmo procedimento (RIBEIRO; AZEVEDO, 2006). Nos anos subsequentes, gradativamente, a vacina contra hepatite B foi ampliada para menores de 20 anos.

Em 2003, a Butang® foi introduzida no Programa Nacional de Imunização (PNI, BRASIL, 2003). Atualmente, essa vacina está disponível em todo território nacional para indivíduos com menos de 20 anos e grupos em elevado risco para hepatite B (BRASIL, 2008).

Em adultos saudáveis, recomenda-se três doses de 20 µg da vacina contra hepatite B, por via intramuscular, nos meses 0, 1 e 6. Já em indivíduos com menos de 20 anos, utiliza-se a metade da dose. O intervalo mínimo entre a 1ª e a 2ª dose deve ser de um mês, e entre a 2ª e a 3ª dose de quatro meses (BRASIL, 2006; MAST et al., 2006).

A detecção de títulos de anti-HBs ≥ 10 mUI/mL, cerca de 45 a 60 dias após a terceira dose, indica imunidade contra o HBV. Mais de 90% dos indivíduos vacinados são respondedores a vacina contra hepatite B, sendo a não resposta atribuída a fatores como predisposição genética, sexo masculino, idade superior a 40 anos, tabagismo, obesidade, imunossupressão e administração da vacina na região dorso glúteo, ou por via subcutânea (ASSAD; FRANCIS, 1999; ZANETTI et al., 2008).

As reações adversas, relacionadas à vacina contra hepatite B, são geralmente locais (dor no local da injeção, induração e eritema) (DEMIRJIAN; LEVY, 2009; ZANETTI et al., 2008). Febre é a reação sistêmica mais comum, principalmente em crianças. Eventos como fadiga, cefaléia, náusea, rash cutâneo, mialgia e desconforto respiratório são observados em menos de 1% dos vacinados (YU et al., 2006). Em adultos, Geier; Geier (2002) relataram uma associação entre artralgia, artrite, trombocitopenia, vasculite, mielite, eritema e desconforto gastrointestinal e vacinação contra hepatite B. Outros eventos como esclerose múltipla (HALL et al., 1999) e Síndrome de Guillan-Barret (KHAMAISI et al., 2004) foram encontrados em indivíduos vacinados, no entanto, nenhuma relação causal foi estabelecida entre esses eventos e a vacina contra hepatite B (MAST et al., 2006). Em crianças e adolescentes, estima-se que ocorra uma reação anafilática por 1,1 milhões de doses aplicadas (DEMIRJIAN; LEVY, 2009). Assim, a vacina contra o HBV tem sido contra-indicada para indivíduos com história de anafilaxia após a primeira dose (MAST et al., 2006).

Investigações em indivíduos adultos têm mostrado uma menor imunogenicidade da vacina contra hepatite B, quando administrada, por via intramuscular, na região dorsoglútea (CDC, 1985; LINDSAY et al., 1985). Nessa região, há um acúmulo maior de gordura subcutânea e, muitas vezes, a agulha utilizada para injeção não alcança o músculo, depositando, assim, a vacina no tecido gorduroso onde o imunógeno não é bem mobilizado (COCKSHOTT et al., 1982). Assim, em adultos, a vacina tem sido administrada no músculo deltóide. Em crianças, a recomendação no músculo vasto lateral da coxa (VLC) tem sido baseada na experiência com a vacina em adultos (CDC, 1985; LINDSAY et al., 1985), bem como na contraindicação da região dorso glútea para menores de dois anos, baseada em relatos de lesão do nervo isquiático e fibrose glútea após a injeção (BEGERSON et al., 1982; NAPIONTEK; RUSZKOWSKY, 1993).

1.6 VACINA CONTRA HEPATITE B EM RN

No Brasil, a vacina contra hepatite B tem sido aplicada simultaneamente com outras vacinas do Programa Nacional de Imunização (BRASIL, 2006). A primeira dose é recomendada nas primeiras 12 horas de vida do RN, concomitante com a vacina contra tuberculose (BCG). A segunda e terceira doses são administradas 30 e 180 dias após a primeira dose, sendo que a última coincide com a terceira dose da vacina tetravalente (DPT+Hib-difteria, tétano, coqueluche, meningite e outras infecções causadas pelo *Haemophilus influenzae* tipo b). Em RN de baixo peso (< 2.000 g), recomenda-se a adição de mais uma dose ao esquema, sendo a vacina administrada seguindo um calendário 0, 1, 2 e 6 meses.

Em crianças de mães HBsAg positivas, o PNI recomenda a administração de imunoglobulina hiperimune na concentração de 100 UI (ou 0,5 mL), por via intramuscular, nas primeiras 12 horas de vida, concomitante com a primeira dose da vacina contra hepatite B (administradas em músculos diferentes). O esquema vacinal para essas crianças inclui quatro doses nos meses 0, 1, 6 e 12 meses (BRASIL, 2006).

Estudos têm mostrado que mais de 90% dos recém-nascidos sadios vacinados contra hepatite B respondem com títulos protetores de anti-HBs. No

entanto, os níveis dos títulos de anti-HBs após a terceira dose da vacina têm sido variáveis (MARTINS et al., 2004; MOTTA et al., 2002; SADECK; RAMOS, 2004; SHIVANANDA et al., 2006).

Alguns autores têm sugerido a interferência de anticorpos anti-HBs passivos na resposta vacinal contra hepatite B. Recém-nascidos de mães com hepatite B crônica, que recebem imunoglobulina hiperimune e a primeira dose da vacina contra hepatite B logo após o nascimento, geralmente, desenvolvem títulos mais baixos de anti-HBs vacinal quando comparados aos que recebem apenas a vacina (ESTEBAN et al., 1986; YANG et al., 2003). Mais recentemente, Hu et al. (2008) verificaram em crianças vacinadas nas primeiras horas de vida, títulos mais baixos de anti-HBs em filhos de mães imunes contra hepatite B quando comparados aos de mães suscetíveis, sugerindo uma possível interferência dos anticorpos anti-HBs maternos na resposta a vacina contra hepatite B.

Investigações em lactentes que receberam três doses de 10 µg da vacina Engerix B, mostraram médias geométricas de títulos de anti-HBs variáveis. Na Austrália, Cook; Murtagh (2002) relataram GMT de 2071,2 mIU/mL em 84 bebês que iniciaram a vacinação até os 10 meses de idade. Na Índia, Velu et al. (2007) encontraram uma GMT de 193,9 mUI/mL em 50 lactentes de mães HBsAg positivas, e Shivananda et al. (2006) verificaram 167 mIU/mL em 88 crianças que iniciaram o esquema vacinal com 6 a 8 semanas de vida. Já em Israel, Blondheim et al. (1998) detectaram em RN pré-termos (n=176) e a termos (n=46), GMT de 469,1 mIU/mL e 701,2 mIU/mL, respectivamente. No Brasil, Martins et al. (2004) relataram uma GMT de 1530,6 mIU/mL em 409 RN a termo.

Outros autores, que utilizaram vacinas compostas por antígenos recombinantes, obtidos por sistema de expressão semelhante ao da Butang, também mostraram taxas de soroproteção elevada e níveis de GMT variáveis. Na Índia, dois estudos utilizando a vacina GeneVacB encontraram resultados semelhantes. Shivananda et al. (2006) vacinaram 85 crianças com idade média de 47 dias ao receberem a primeira dose da vacina e observaram GMT de 229 mIU/mL, e Velu et al. (2007), em 48 RN vacinados nas primeiras 24 horas de vida, encontraram GMT de 226,7 mUI/mL. Em relação à Butang, Isolani et al. (2006) detectaram uma média geométrica de títulos de anti-HBs de 680,6 mUI/mL em 70 crianças que coletaram o sangue entre 7 e 10 meses de idade. Já Martins et al.

(2004) verificaram GMT de 325,3 mUI/mL e 390,3 mUI/mL em 147 RN do sexo masculino e 134 do sexo feminino, respectivamente.

1.6.1 Administração intramuscular da vacina contra hepatite B em crianças

Injeções intramusculares são regularmente prescritas para a administração de vários fármacos e vacinas em crianças (NICOLL; HESBY, 2002). A administração segura da injeção IM depende da escolha adequada do local onde será feita a aplicação, considerando-se os seguintes aspectos: desenvolvimento do músculo, acessibilidade do local da punção, distância em relação a vasos e nervos importantes, condições da musculatura para absorção do medicamento a ser injetado, espessura do tecido adiposo; idade do indivíduo, irritabilidade da droga e atividade exercida pelo paciente (RODGER; KING, 2000; SMALL, 2004). Outro aspecto importante a ser observado é a condição da musculatura, que deve ser livre de fibrose, edemas, hiperemia ou calor (CASTELLANOS, 1977) e tamanho adequado da agulha (COOK, 2009; GROSWASSER et al., 1997; LIPPERT; WALL, 2008; PETOUSIS-HARRIS, 2008).

Assim, os vários locais usualmente utilizados são: braço (músculo deltóide), coxa (músculo vasto lateral), parte posterior do glúteo (músculo glúteo médio) e região lateral do íliaco (ventro glútea - músculos mínimo e médio). A escolha da região deve ser norteadas pelas vantagens e desvantagens que apresenta, bem como pelo conhecimento do aplicador sobre as várias áreas anatômicas para prevenção de possíveis complicações (BABHULKAR, 1985; BEYEA; NICOLL, 1995; CASTELLANOS, 1977; SOANES, 2000). Em crianças menores de 12 meses, o músculo vasto lateral da coxa tem sido o local indicado para administração da vacina contra hepatite B (BRASIL, 2006; CDC, 2009; IAC, 2009; MAST et al., 2006).

O músculo vasto lateral é o maior dentre os músculos que formam o quadríceps femoral. Ele é localizado na face vasto lateral da coxa, uma área considerada livre de vasos e nervos importante, sendo recomendada, principalmente, para administração de fármacos em crianças abaixo de 12 meses (BEECROFT; REDICK, 1990; BEGERSON et al., 1982; BEYEA; NICOLL, 1995;

CASTELLANOS, 1977; COCOMAN; MURRAY, 2008; MOORE; DALLEY, 2004; NICOLL; HESBY, 2002).

Para injeção intramuscular na região vasto lateral da coxa (VLC), o *Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP)* do *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)* recomenda que se faça uma pinça (“bochecha”) com o dedo indicador e o polegar da mão não dominante no músculo vasto lateral da coxa, na porção do terço médio da coxa e, com a mão dominante, insira a agulha com angulação de 90°, conforme o tamanho da musculatura presente (Figura 6). A agulha (22-25 mm) deve ser introduzida na “bochecha” (MAST et al., 2006). Segundo Begerson et al. (1982), a formação da bochecha é para estabilizar e aumentar a musculatura para a penetração da agulha.

Existem duas variações, nessa técnica, relacionadas à agulha e ao ângulo. A primeira recomenda o uso de agulha de 25 mm e ângulo de 45° a 60° (COOK; MURTAGH, 2005; COOK; MURTAGH, 2006). Já a segunda, recomendada pela OMS e CDC, utiliza agulhas de 16 mm para recém-nascidos, e 22 mm ou 25 mm para crianças de 1 a 12 meses de idade, dependendo do tamanho da musculatura do indivíduo e ângulo reto (CDC, 2009; IAC, 2009; WHO, 2001a).

Cook; Murtagh (2005) realizaram um ensaio clínico randomizado em 375 lactentes australianas, utilizando a vacina tríplice (difteria, tétano e coqueluche) e *Haemophilus influenzae* tipo b, para comparar as variações da técnica recomendada para injeção intramuscular na VLC, e concluíram que a técnica mais adequada é a de utilização do ângulo de 90°, apresentando menor reação local e facilidade na utilização correta da técnica. No Brasil, o Programa Nacional de Imunização adota o ângulo de 90°, recomendado pelo CDC, porém utiliza-se agulha de 20 mm (BRASIL, 2006).



Figura 6. Vacina aplicada no músculo vasto lateral da coxa.

Vários autores têm relatado casos de fibrose do músculo quadríceps em crianças que receberam injeções na região vasto lateral da coxa. Na Índia, Makhani (1971) relatou uma série de 20 casos com perda da flexão do joelho. Mukherjee; Das (1980) verificaram 37 casos de contratura do músculo com envolvimento de extremidades e, Mukherjee; Mukhopadhyay (1988) 60 casos de lesões extra-articular com limitação da flexão do joelho. Nos Estados Unidos da América, um estudo mostrou 07 casos de contraturas do quadríceps com incapacidade de flexão do joelho em crianças atendidas em um hospital da Filadélfia (MCCLOSKEY; CHUNG, 1977). Na Inglaterra e na França foram relatados 32 e 92 casos de contratura muscular, respectivamente (JACKSON; HUTTON, 1985; SOUMAH et al., 2003). Ainda, segundo esses autores, o risco de lesão na musculatura é proporcional à frequência de injeções, volume e tipo de medicamento injetado. Nessa região, o volume máximo do medicamento deve ser proporcional à musculatura, não podendo exceder três mililitros, porém para crianças até dois anos de idade não deve ultrapassar um mililitro e no caso de RN 0,5 mililitros, ainda o medicamento deve ser aquoso, não irritante, oleoso ou viscoso (CASTELLANOS, 1977; LOSEK; GYURO, 1992).

A região ventro glútea foi descrita por Von Hochstetter há mais de 50 anos (HOCHSTETTER, 1954), sendo considerada uma região segura para injeções intramusculares. Esse local é delimitado pela espinha ílaca ântero-superior; grande trocanter e crista ílaca superior, formando-se, assim, um triângulo, conforme Figura 7 (COOK; MURTAGH, 2006; MOORE; DALLEY, 2004).



Figura 7. Localização da região ventro glútea (MOORE; DALLEY II, 2004; p.495).

A região VG possui menos inervação e vasos sanguíneos, quando comparada às outras regiões utilizadas para injeções IM, sendo a musculatura grande, bem definida e demarcada (GREENWAY, 2004). A camada de tecido adiposo é mais fina, diminuindo a possibilidade de depósito do medicamento na mesma. Os músculos glúteo médio e glúteo mínimo estão presentes nesta região, sendo bem desenvolvida tanto em adulto quanto em crianças. Além disso, é de fácil localização e tem sido associada a menor dor durante a aplicação (COOK; MURTAGH, 2006).

A região ventro glútea tem sido citada por vários autores como sendo a de primeira escolha para injeções, devida às suas várias vantagens quando comparada à região dorso glúteo, tradicionalmente, utilizada para injeção intramuscular (BEECROFT; REDICK, 1990; CASTELLANOS, 1977; COCOMAN; MURRAY, 2008; DONALDSON; GREEN, 2005; GREENWAY, 2004). Sua musculatura profunda é

selada pela caixa óssea, e os feixes musculares têm direção adequada, prevenindo, assim, o deslizamento do material injetado. Além disso, a ausência de nervos e vasos calibrosos no local, impede a ocorrência de lesões neurais e vasculares importantes, mesmo com a agulha mal dirigida (MOORE; DALLEY, 2004). Adicionalmente, a epiderme local, devida a sua localização anatômica é mais pobre em germes patogênicos anaeróbios, reduzindo, portanto, o risco de infecção associada à injeção (BEECROFT; REDICK, 1990; CASTELLANOS, 1977). Essa região tem sido recomendada para administração de medicamentos injetáveis em indivíduos de qualquer faixa etária, inclusive para os magros e crianças (BEECROFT; REDICK, 1990; CASTELLANOS, 1977; COCOMAN; MURRAY, 2008; COOK; MURTAGH, 2002; 2003; 2006; GREENWAY, 2004; HOCHSTETTER, 1954; SMALL, 2004).

No Brasil, tem sido utilizada a técnica preconizada por Castelhanos (1977), a qual é descrita a seguir: coloca-se a mão esquerda no quadril direito do paciente, localizando na falange distal do dedo indicador a espinha ilíaca ântero-superior direita, estendendo o dedo médio ao longo da crista ilíaca, espalmando a mão sobre a base do grande trocanter do fêmur e formando com o indicador um triângulo. A punção deverá ser realizada no centro deste triângulo, com a agulha ligeiramente voltada para a crista ilíaca.

Godoy (2002) publicou a técnica de forma didática, passo a passo, por meio de imagens, que deve facilitar a sua reprodução e aplicação pelos profissionais, e mais recentemente, MENESES; MARQUES (2007) fizeram uma nova proposta para a localização da VG, utilizando o modelo de delimitação geométrica. Segundo esses autores, traça-se uma linha imaginária do osso da crista ilíaca (do tubérculo ilíaco) até a espinha ilíaca ântero-superior, outra linha a partir desta até o trocanter maior e outra fechando o triângulo a partir do trocanter até o tubérculo do ilíaco. A punção deve ser no baricentro do triângulo. Esses autores recomendam um ângulo de 90°.

Existem poucos estudos sobre a resposta vacinal contra hepatite B em bebês que receberam a vacina na região glútea. No Brasil, Alves, et al. (2001) realizaram um ensaio clínico controlado randomizado para comparar a imunogenicidade da vacina Engerix B em lactentes (2 a 4 semanas de idade) vacinados no dorso glúteo e vasto lateral da coxa. Embora esses autores tenham encontrado taxas de soroconversão semelhantes (99,3% vs. 99,2%) entre os dois

grupos, o primeiro apresentou uma proporção maior de baixo respondedores. Já Cook; Murtagh (2002) encontraram taxas semelhantes de soroproteção (98,8% vs. 97,7%) e soroconversão (96,6% vs. 93,2%) em lactentes que receberam a vacina na região VG versus VLC.

1.7 JUSTIFICATIVA

Em indivíduos menores de 12 meses de idade, a administração intramuscular de fármacos tem sido realizada preferencialmente no músculo vasto lateral da coxa ao invés do glúteo médio (COOK; MURTAGH, 2006; NICOLL; HESBY, 2002). Essa recomendação se fundamenta no risco de lesão do nervo isquiático com conseqüente neuropatia como pé paralítico, fibrose glútea com reflexo na rotação externa e abdução e contratura do quadril (NAPIONTEK; RUSZKOWSKY, 1993). Portanto, em crianças enfermas a sobrecarga do músculo vasto lateral pode ter efeitos dramáticos, com lesões permanentes devida a injeções repetidas (MUKHERJEE; MUKHOPADHYAY, 1988). Em relação à vacina contra hepatite B, acredita-se que exista uma diminuição da imunogenicidade em indivíduos que recebem a vacina no glúteo, quando comparados aos vacinados no vasto lateral (CDC, 1985; LINDSAY et al., 1985). Assim, a identificação de um compartimento muscular para injeção de vacinas e outros fármacos é de grande importância para redução de agravos nessa população.

A região ventro glútea foi descrita por Von Hochstetter na década de 50, como local alternativo para medicação intramuscular em crianças. Segundo esse e outros autores (HOCHSTETTER, 1954; CASTELLANOS, 1977; COOK; MURTAGH, 2006; DONALDSON; GREEN, 2005), essa região é segura por ser constituída pelos músculos glúteo médio e mínimo que possuem feixes musculares que previnem o deslizamento de medicamentos em direção ao nervo isquiático, por possuir nervos e vasos de menor calibre, além de estar delimitada pelo osso ilíaco. No entanto, são raros os ensaios clínicos randomizados que ratificam esses pressupostos (COOK; MURTAGH, 2002).

No Brasil, seguindo as orientações dos *Centers for Disease Control and Prevention* (MAST et al., 2006), o Ministério da Saúde e a Sociedade Brasileira de

Pediatria (SBP) recomendam a primeira dose da vacina contra hepatite B nas primeiras 12 horas de vida do recém-nascido (BRASIL, 2006; SBP, 2009).

A vacina brasileira Butang® foi introduzida no Programa Nacional de Imunização em 2003. Entretanto, ainda são poucas as informações sobre a imunogenicidade e reatogenicidade dessa vacina nas várias populações de nosso país (ISOLANI et al.,2006; MARTINS et al.,2004; OLIVEIRA et al.,2006), principalmente, em RN que iniciam o esquema vacinal nas primeiras 12 horas de vida.

Assim, considerando que nos primeiros anos de vida, a criança recebe todas as vacinas e medicações intramusculares na região VLC e que múltiplas injeções realizadas nessa região podem gerar agravos como retração muscular e outras lesões dessa musculatura, além do músculo da região ventro glútea ser apropriado e seguro para aplicação de injeções intramusculares em indivíduos de qualquer idade, principalmente em crianças, a proposta deste estudo foi avaliar e comparar a resposta vacinal e a reatogenicidade à vacina Butang® em RN, administrada na região VG e VLC, bem como avaliar fatores que possam interferir na resposta vacinal contra hepatite B por ambas as regiões, incluindo anticorpos anti-HBs maternos.

Acreditamos que as evidências deste estudo somarão aos conhecimentos já obtidos em relação à imunogenicidade e segurança da vacina brasileira contra hepatite B, mas servirão, principalmente, para subsidiar tomadas de decisão em relação à escolha do local mais apropriado para aplicação da vacina em crianças, contribuindo, assim, para a redução de agravos, qualidade da assistência e eficiência da vacina contra hepatite B em nossa população, bem como ampliação do corpo de conhecimento da área da saúde e, em especial, da enfermagem.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a resposta à vacina brasileira contra hepatite B (Butang®) em recém-nascidos (RN) moradores do Distrito Sanitário Leste de Goiânia-Goiás, comparando as regiões ventro glútea e vasto lateral da coxa.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a imunogenicidade da Butang® aplicada na região VG e VLC em RN, que iniciaram o esquema vacinal nas primeiras 12 horas de vida;
- Verificar a reatogenicidade da Butang® aplicada nessas duas regiões;
- Avaliar fatores que possam interferir na resposta a esta vacina nos grupos investigados;
- Comparar a resposta vacinal dos RN de mães vacinadas e não vacinadas contra hepatite.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO

Ensaio clínico controlado randomizado para avaliar a imunogenicidade e reatogenicidade da Butang® aplicada nas regiões VG e VLC.

3.2 POPULAÇÃO ALVO

A população constituiu-se de RN e suas respectivas mães, moradoras da Região Leste do município de Goiânia-Goiás (Figura 8). Esta região possui aproximadamente 120.000 habitantes, distribuídos em 42 bairros, abrangendo uma área de 79,5 Km². Segundo dados do Programa de Imunização das Unidades Básicas de Saúde da Secretaria Municipal de Saúde (SMS) de Goiânia, nesta região são atendidos aproximadamente 1000 RN por ano para a primeira dose da vacina contra hepatite B (Departamento de Imunização da SMS de Goiânia-GO, comunicação pessoal). O recrutamento dos participantes foi realizado de fevereiro a novembro de 2007, nos hospitais e maternidades que atendem as parturientes dessa região (Hospital São Lucas, Hospital e Maternidade Goiânia Leste, Maternidade Nossa Senhora de Lourdes, Hospital e Maternidade Vila Nova e Maternidade Modelo).



Figura 8. Mapa do município de Goiânia-GO, divisão territorial por Distrito Sanitário.

3.3 AMOSTRA

O cálculo da amostra foi baseado em um estudo prévio, em crianças brasileiras, que mostrou 12,2% de baixo respondedores nos indivíduos que receberam a vacina na região dorso glúteo e de 5,2% nos que receberam o imunógeno na região VLC (ALVES et al., 2001), considerando um poder estatístico de 80% ($\beta=20\%$) e um nível de significância de 95% ($\alpha <0,05$).

A amostra foi composta por 580 crianças, sendo: 286 para o grupo de intervenção e 294 para o grupo controle.

3.4 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

3.4.1 Critérios de inclusão

- Ser RN com até 12 horas de vida;
- Pesar no mínimo 2.500g;

- Ser filho de mãe residente na região leste de Goiânia-GO.

3.4.2 Critérios de exclusão

- Possuir antecedentes de transfusão sanguínea, vacinação contra hepatite B e/ou imunoglobulina;
- Possuir qualquer doença que contra-indique imunização;
- Apgar* < 8 no 5º minuto;
- RN de mãe portadora do HBV ou HIV (registro em prontuário ou relato da mãe).

3.4.3 Variáveis de predição referentes aos RN

Sexo, cor, peso inicial (ao nascer) e peso final (3ª dose) informações do cartão de saúde da criança, tempo de amamentação exclusivo, antecedentes familiares de doenças crônicas.

3.4.4 Variáveis de predição referentes às mães

Idade, estado civil, rendas familiar e materna, história de vacinação contra hepatite B, tabagismo, uso de bebidas alcoólicas e drogas ilícitas.

3.5 RECRUTAMENTO

A Divisão de Imunização da Secretaria Municipal de Saúde de Goiânia possui quatro equipes móveis de vacinação que trabalham em esquema de plantão de 12 horas diurno, sendo que as duas equipes de plantão visitam diariamente as maternidades de Goiânia em busca de RN, para a

administração da primeira dose da vacina contra hepatite B dentro das primeiras horas de vida.

Para a realização deste estudo foi pactuado, com essas equipes de vacinação, que as duas pesquisadoras do projeto fariam as visitas às maternidades de referência para o atendimento das parturientes da região do Distrito Sanitário Leste, administrando a primeira dose da vacina nos RN nas primeiras 12 horas de vida. Essas visitas ocorreram em dias úteis, no período matutino e vespertino. Nas maternidades, a triagem dos RN para o projeto foi realizada com base em informações dos registros dos berçários, bem como dos prontuários das puérperas e RN. Essas visitas foram realizadas de 06 de fevereiro a 30 de novembro de 2007.

Se o RN apresentasse os critérios de elegibilidade pelo projeto, fazia-se o contato com a mãe ou seu responsável legal, informando a respeito do estudo, do prognóstico da infecção pelo vírus da hepatite B e dos benefícios e riscos da vacinação do RN, bem como do acompanhamento da criança durante os 06 meses da vacinação pela equipe da pesquisa, da avaliação da resposta à vacina Butang® e das visitas ao domicílio, além dos benefícios do conhecimento da condição sorológica da mãe em relação ao HBV.

A seguir era solicitada a autorização para participação no projeto, e entregue o termo de consentimento livre e esclarecido para leitura e assinatura. Caso a participação do RN e da mãe fosse autorizada, iniciava-se o registro dos mesmos no estudo.

Para avaliar a situação vacinal da mãe, a todas ofereceu-se a testagem para o marcador anti-HBs, além do anti-HBc para avaliação de exposição prévia ao HBV. Para as que aceitaram, na ocasião da coleta de sangue dos lactentes, foram coletados 5 mL de sangue de veia periférica dos membros superiores, utilizando-se seringas de 5 mL e agulhas hipodérmicas 25 X 8 mm esterilizadas e descartáveis.

As amostras sanguíneas obtidas (lactente e mãe) foram conservadas em tubos de ensaio numerados, de acordo com os números dos questionários. Os tubos foram transportados, em caixas de isopor, até o Laboratório de Virologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da

Universidade Federal de Goiás (IPSTP-UFG), onde os soros foram centrifugados, separados (uma alíquota da amostra das crianças e duas alíquotas das mães), armazenados e estocados a -20°C até a realização dos ensaios.

3.5 RANDOMIZAÇÃO

Números de randomização foram gerados por *software* para alocar, na razão 1:1, as crianças recrutadas para o grupo de intervenção (VG) e para o grupo de comparação (VLC). Cada número da randomização foi colocado em um envelope pardo, lacrado e, os envelopes correspondentes a 1 bloco de 50 números foram depositados em uma urna específica para o projeto, por um membro externo à equipe de pesquisa.

Uma vez que o RN era considerado elegível para o estudo, na enfermaria ou quarto da maternidade/hospital, sob a supervisão de um membro externo à pesquisa, o vacinador retirava um envelope lacrado da urna, que continha o número randômico e o local da aplicação do imunógeno. Definido o local da aplicação, administrava-se a vacina Butang®. Após, eram anotados no cartão de vacinação da criança os dados referentes ao imunógeno (lote, data, maternidade e local da aplicação da vacina) e o agendamento das doses subsequentes. Para facilitar a anotação da via selecionada, confeccionou-se um carimbo com as siglas VG e VL. Além disso, os dados do RN e da mãe foram registrados em livro-ata e fichários individuais, arquivados por ordem de agendamento das vacinas e coleta de sangue.

3.6 ENTREVISTA

Após a randomização, era realizada a entrevista com a mãe do RN. Para tanto, utilizou-se um questionário padrão, contendo perguntas sobre os dados sócio demográficos (idade, escolaridade, estado civil, renda familiar e materna), condições de saúde variáveis (imunizações prévias, antecedentes

peçoais e familiares de doenças crônicas) e hábitos de vida (tabagismo, consumo de álcool e drogas ilícitas durante a gestação) (anexo A). Os dados apgar, peso e estatura ao nascer e na 3ª dose da vacina do RN eram obtidos por meio da Caderneta de Saúde da Criança.

3.7 ASPECTOS ÉTICOS

3.7.1 Comitê de Ética, Registro Internacional e Financiamento

Este estudo foi aprovado em 01 de novembro de 2006 e monitorado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Materno Infantil (HMI) /Secretaria de Estado da Saúde de Goiás (SES-GO), protocolo CEP-HMI nº11/06 e registrado no *International Standard Randomized Controlled Trial Number Register* (ISRCTN) sob o nº 69460769.

O financiamento desta pesquisa foi realizado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), via Edital Universal 2006; Processo nº 472289/2006-3.

Foi assegurado no projeto que as reações adversas à vacina seria assistida pela equipe de saúde da família da região do participante e em casos especiais pelo Hospital Materno Infantil da Secretaria de Saúde do Estado de Goiás (hospital público de referência).

3.8 INTERVENÇÃO

3.8.1 vacina contra o HBV

O frasco da vacina Butang® contém 20 µg de HBsAg purificado, 1,25 mg de hidróxido de alumínio (adjuvante) e 0,05 mg de timerosal (conservante). Os RN receberam três doses de 10 µg (0,5 mL) da Butang®, nos meses 0, 1 e 6, por via intramuscular, na região ventre glútea direita (grupo VG - intervenção) ou vasto lateral da coxa direita (grupo VLC - controle).

Todas as vacinas foram cedidas pela Divisão de Imunização da Secretaria de Saúde do Município de Goiânia-Goiás.

3.8.2 Transporte e Conservação dos Imunógenos

As vacinas e todo o material necessário para a imunização (seringas, agulhas, álcool a 70%, algodão, caixa descartável para perfurocortante) foram fornecidos pela Divisão de Imunologia da Secretaria da Saúde do Município de Goiânia. Foi seguida a padronização dessa Divisão para vacinação em campo (BRASIL, 2006).

As doses necessárias para a vacinação diária eram acondicionadas em caixas térmicas com bolsas de gelo recicláveis para manutenção da temperatura entre +2 a + 8°C (BRASIL, 2006). Para o controle da temperatura, utilizou-se um termômetro analógico de cabo flexível

3.8.3 Procedimentos

O frasco da vacina era aberto, segundo técnica asséptica. Além disso, conforme orientação da Divisão de Imunologia (BRASIL, 2006), outro frasco da vacina só era aberto após o término do anterior. Para garantir a precisão e acurácia dos resultados, as duas técnicas de administração das vacinas, utilizadas no estudo, foram padronizadas pelos pesquisadores e aplicadas por duas enfermeiras treinadas.

Em todos os procedimentos foram respeitadas as normas de biossegurança, conforme Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 306, de 07 de dezembro de 2004 (BRASIL, 2004). A anti-sepsia local foi realizada com algodão hidrófilo umedecido com álcool a 70%. O vacinador lavou as mãos antes e após a vacinação, e utilizou luvas descartáveis em todos os procedimentos, desprezando-as após cada uso. Foram utilizadas seringas de 3 mL e agulhas hipodérmicas 20 x 5,5 mm esterilizadas e descartáveis, sendo todo o material perfurocortante desprezado em recipiente próprio (caixa de

papelão com paredes rígidas). Os demais materiais foram descartados em sacos brancos leitosos.

Para administração da vacina na região ventro glútea (grupo de intervenção – VG), posicionou-se a criança confortavelmente no colo da mãe ou responsável, na posição dorsal com a perna direita flexionada em ângulo de aproximadamente 45°. A seguir, localizou-se a espinha ilíaca ântero-superior com o dedo indicador (mão direita no quadril esquerdo). Nos RN, posicionou-se a falange proximal do dedo indicador na espinha ilíaca ântero-superior, estendendo o dedo médio até o tubérculo da crista ilíaca, formando-se, assim, um triângulo (Figura 9). A partir dos seis meses de idade, na terceira dose da vacina, utilizou-se a falange distal para formar o triângulo. A injeção foi aplicada após a anti-sepsia na área do triângulo, ou seja, a vacina foi depositada na fossa ilíaca (músculo glúteo mínimo), inserindo a agulha no centro do triângulo em um ângulo de $\pm 85^\circ$ com sua ponta voltada ligeiramente para a crista ilíaca (CASTELLANOS, 1977).



Figura 9. administração da vacina na região ventro glútea.

Para administração da vacina na região vasto lateral da coxa (grupo de comparação - VLC), posicionou-se a criança confortavelmente no colo da mãe, com o dorso lateralizado e a perna direita flexionada em ângulo de 45°. Localizou-se a linha mediana da coxa anterior, em sua porção lateral. A seguir, no terço médio da região vasto lateral da coxa (músculo vasto lateral), firmou-se o músculo com o dedo indicador e o polegar (como uma pinça), formando-

se, assim, uma bochecha, fez-se a anti-sepsia e inseriu-se a agulha em ângulo reto (90° -) ao eixo longitudinal do fêmur (Figura 10) (BRASIL, 2006; WHO, 2001b).



Figura 10. Administração da vacina na região vasto lateral da coxa.

A 2ª e 3ª doses da vacina foram realizadas no domicílio do lactente, mediante agendamento prévio e após comunicação e autorização dos seus responsáveis para o procedimento. O descarte do material perfurocortante utilizado na vacinação era realizado em caixas apropriadas (tipo “descartex”), as quais eram posteriormente desprezadas no coletor de lixo hospitalar do Hospital das Clínicas da UFG.

A vacinação dos lactentes que apresentaram temperatura corporal > 37,5°C ou outro agravo que contraindicasse o procedimento na data agendada era suspensa temporariamente, e uma nova data era acordada após o restabelecimento da criança.

3.9 AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE

3.9.1 Desfecho da resposta vacinal

- Primário: títulos de anti-HBs \geq 10 mUI/mL após a terceira dose da vacina (respondedor a vacina contra hepatite B);

- Secundário: títulos de anti-HBs entre 10 mUI/mL e 99 mUI/mL (baixo respondedor a vacina contra hepatite B).

Para as coletas de sangue, foram respeitadas as normas de biossegurança conforme Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 306, de 07 de dezembro de 2004 (BRASIL, 2004).

De 45 a 60 dias após a última dose da vacina, todas as mães ou responsáveis pelos lactentes que receberam as três doses foram contatados novamente para realização da coleta de sangue. Foram coletados 3 mL de sangue em veia periférica de membros superiores pelos dois pesquisadores participantes da vacinação e no domicílio dos participantes. Para esse procedimento, o lactente foi posicionado sentado no colo da mãe ou de seu cuidador, visando assegurar maior segurança à criança. Foram utilizadas seringas de 3 mL e agulhas hipodérmicas 25 x 8 mm esterilizadas e descartáveis.

3.10 AVALIAÇÃO DA REATOGENICIDADE

3.10.1 Desfecho da reatogenicidade vacinal

- Sistêmico: febre
- Local: endureção, rubor e calor local.

A coleta de dados, referente a reatogenicidade da vacina, era realizada no domicílio das crianças. A mãe ou responsável pelo cuidado da criança era entrevistada, utilizando-se também um questionário padrão, contendo perguntas sobre o comportamento da criança após a vacinação, sinais de febre, reações locais e aleitamento materno (Anexo B).

As crianças eram avaliadas no período de 48 a 72 horas após cada dose da vacina por um membro da equipe, previamente treinado, não participante das etapas de triagem, randomização e vacinação, o qual desconhecia o local da aplicação do imunógeno.

Para minimizar potencial viés do observador, inicialmente era investigada a presença de febre, por meio do relato verbal da mãe ou cuidador. A seguir, questionava-se a presença de endureção, rubor e calor no local da vacina. Por fim, o local da vacina era revelado por meio do cartão da vacina ao

entrevistador, quando o mesmo avaliava o local da vacina à procura das reações referidas.

3.11 ENSAIOS SOROLÓGICOS

3.11.1 Detecção quantitativa do anti-HBs

Todas as amostras foram testadas para a detecção quantitativa do marcador anti-HBs, pelo ensaio imunoenzimático de micropartícula (MEIA), utilizando o Sistema AxSYM de automação e kits AxSYM AUSAB (Abbot Laboratórios do Brasil), conforme descrito pelo fabricante.

O critério de soroproteção foi definido como concentração de anti-HBs igual ou superior a 10 mIU/mL. Assim, os lactentes foram classificados como não respondedores (anti-HBs < 10 mIU/mL), baixos respondedores (anti-HBs: 10 – 99 mIU/mL), bons respondedores (anti-HBs; 100-999 mIU/mL) e altos respondedores (anti-HBs > 1000 mIU/mL) .

Os lactentes que não responderam às três doses da vacina receberam uma dose de reforço da Butang®. Amostras sanguíneas foram coletadas, após 60 dias, para reavaliação da resposta vacinal, e as que ainda permaneceram não respondedoras foram encaminhadas para unidades de saúde para complementar o esquema vacinal.

3.11.2 Detecção qualitativa do anti-HBs

A detecção qualitativa do anticorpo anti-HBs foi realizada por ensaio imunoenzimático direto, tipo *sandwich* (BIO-RAD, Monolisa® Anti-HBs PLUS), conforme instruções do fabricante. Em microplaca recoberta com HBsAg (subtipos *ad* e *ay*) foram, inicialmente, distribuídos 25 µl de diluente de amostra em cada poço, e adicionados os soros das mães (75 µl) e controles (75 µl). A seguir, a microplaca foi incubada por 60 minutos a 37°C, lavada e adicionada

em cada poço 100 µl da solução de conjugado (HBsAg subtipos *ad* e *ay* marcado com peroxidase). Após nova incubação e lavagem, foram adicionados 100 µl da solução de revelação, contendo substrato (peróxido de uréia) e cromógeno (TMB). A reação foi interrompida adicionando-se ácido sulfúrico. A leitura espectrofotométrica foi realizada com filtros de 450 nm e 620 nm.

O ponto de corte foi definido pela média das absorvâncias obtidas da leitura do calibrador 10 mUI/mL. Assim, o resultado dos testes se deu pela comparação da densidade óptica de cada amostra ao valor do ponto de corte, sendo considerados positivos os valores maiores ou iguais, e negativos os valores inferiores.

3.11.3 Detecção qualitativa do anti-HBc total

A detecção do anti-HBc total foi realizada utilizando-se reagentes comerciais (Hepanostika anti-HBc, Uni-Form), de acordo com o protocolo do fabricante. O princípio da reação foi baseado na inibição competitiva de fase única. Cada poço da microplaca foi previamente sensibilizado com HBcAg. A seguir, amostras, controles e conjugado, constituído de anticorpos anti-HBc humano ligado à enzima peroxidase, foram incubados durante 90 minutos a 37°C. Posteriormente, a microplaca foi lavada com tampão fosfato. Em seguida, foi adicionada a solução substrato/cromógeno (TMB/peróxido de uréia) e incubada por 30 minutos. Finalmente, a reação foi interrompida pelo acréscimo de ácido sulfúrico, e a leitura espectrofotométrica realizada em leitora de microplaca com filtro simples (filtro de 450 nm).

O valor do ponto de corte foi obtido pela fórmula: $0,25 (CNx + 3CPx)$, onde “CNx” é igual ao valor médio das absorvâncias dos controles negativos e “CPx” ao dos controles positivos. Assim, foram consideradas amostras positivas aquelas que apresentaram absorvância menor ou igual ao valor do ponto de corte.

3.12 ANÁLISE DOS DADOS

A análise foi baseada no protocolo e o que foi considerado violação de protocolo (vacinação em local diferente da randomização) no princípio da intenção de tratar (*intention to treat*). O responsável técnico pela análise dos dados foi um membro da equipe que não participou das etapas anteriores da pesquisa.

A análise descritiva foi realizada por meio de distribuição de frequência, média aritmética e desvio padrão. A média geométrica dos títulos de anti-HBs (GMT) para a soroproteção e soroconversão à vacina Butang[®], foi calculada com intervalo de 95% de confiança. O teste-t de *Student* foi utilizado para comparação de médias. O teste de qui-quadrado ou exato de *Fisher* foi utilizado para testar a significância de diferenças entre proporções, bem como avaliar a relação soroproteção e local de administração da vacina. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS

Nos meses de fevereiro a novembro de 2007, 703 RN foram visitados nas maternidades envolvidas neste estudo. Desses, 583 cumpriram com os critérios de elegibilidade e 580 (82,5%) participaram deste estudo (Figura 11).

De acordo com a análise por protocolo, a primeira dose da vacina Butang[®] foi aplicada em 286 RN na região VG e em 294 na região VLC. Dos 286 RN que receberam a 1^a dose da vacina na região VG, 32 não receberam a segunda, ou seja: 15 por mudança de endereço, 1 por recusa dos responsáveis e 16 crianças por violação do protocolo (receberam a segunda dose na região VLC em unidades de saúde). A terceira dose da vacina não foi administrada em 12 crianças: 11, devido à mudança de endereço, e 1 por falecimento. Ainda, a violação do protocolo ocorreu em nove bebês. Assim, 233 crianças receberam a terceira dose da vacina no músculo VG. Dentre as crianças que receberam a primeira dose no VLC, 278 e 259 receberam a 2^a e 3^a doses, respectivamente. A causa de saída do estudo (n=40) foi mudança de cidade. Assim, das 233 e 259 crianças que receberam as três doses da Butang[®], coleta de amostras sanguíneas para avaliação da resposta vacinal foi autorizada pelos pais/responsáveis em 224 lactentes do grupo de intervenção e 250 do grupo controle.

A análise por intenção de tratar foi realizada em 492 crianças: 242 randomizadas para vacinação na região VG e 250 para vacinação no VLC.

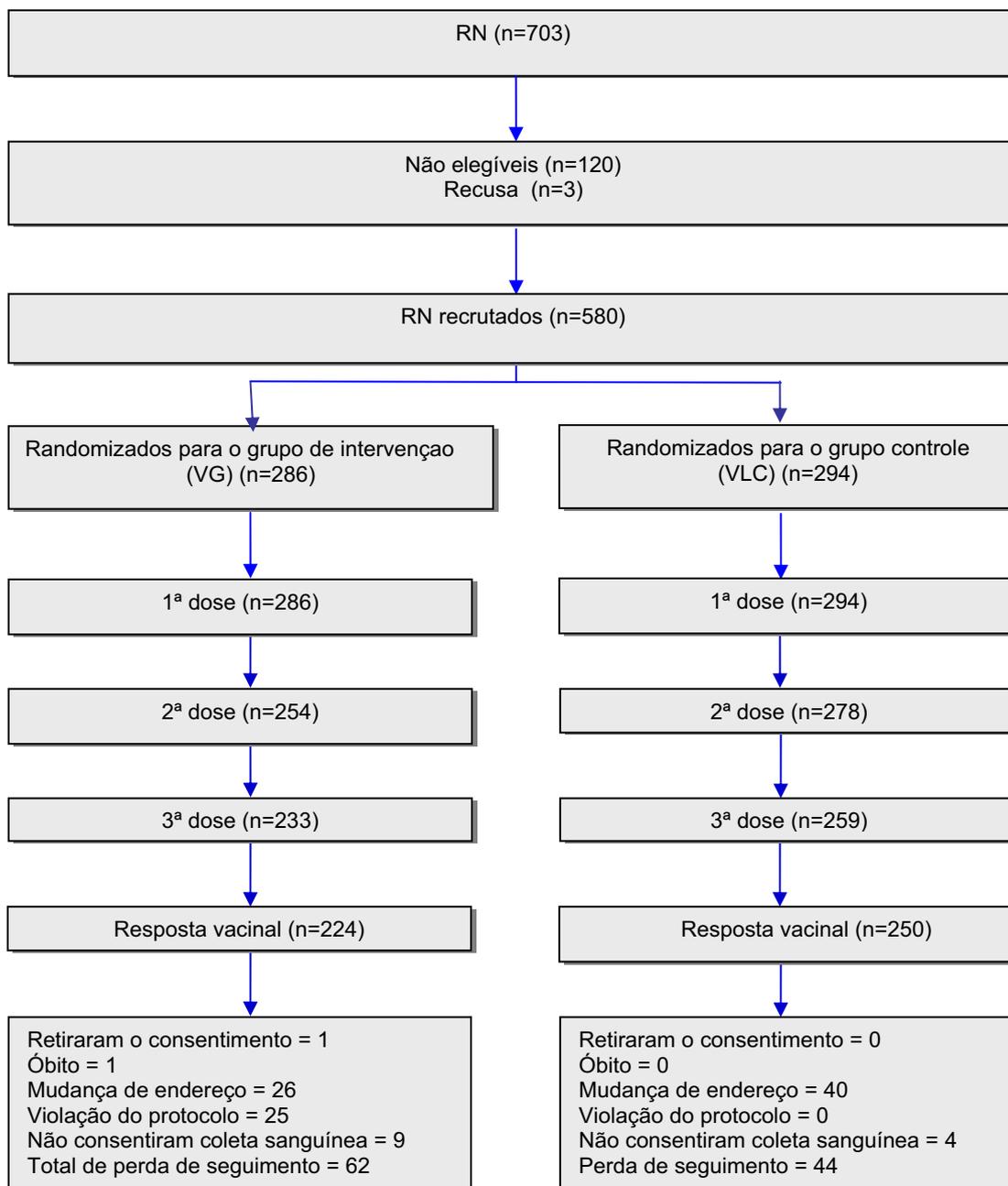


Figura 11. Fluxograma do estudo realizado em 580 recém-nascidos vacinados com a Butang[®] nas regiões ventro glútea (VG) e vasto lateral da coxa (VLC) em Goiânia-GO, 2007-2008.

4.1 CARACTERÍSTICAS DOS RN E DAS MÃES

A Tabela 1 apresenta as características dos recém-nascidos que concluíram o estudo. Os dois grupos foram comparáveis, não existindo diferença estatística em relação ao sexo, cor da pele, antecedentes familiares de doenças crônicas, peso ao nascer e na última dose da vacina (peso final). Praticamente a metade do grupo era do sexo feminino (48,7% vs. 51,6%). A maioria dos RN era de cor branca (60,7% vs. 63,6%) e possuía antecedentes de doenças crônicas em familiares de 1º ou 2º grau (61,2% vs. 61,2%). Em ambos os grupos, a média de peso ao nascer e ao final do estudo foi em torno de 3.300g e 7.500g, respectivamente.

O intervalo de tempo entre a aplicação da 1ª e 2ª doses, entre a 2ª e 3ª doses da vacina, como também entre a 3ª dose e a coleta de amostras sanguíneas não diferiu entre os grupos de intervenção e de controle: 31,7 vs. 31,5 dias, 151,7 vs. 151,8 dias, 53,0 vs. 53,3, respectivamente ($p > 0,05$).

Tabela 1 - Características dos 474 lactentes que concluíram o estudo, de acordo com o protocolo, Goiânia – GO, 2007-2008

Variável	Local da Vacina		Valor de p
	VG ^a (n=224)	VLC ^b (n=250)	
Sexo (%)			
Feminino	109 (48,7)	129 (51,6)	
Masculino	115 (51,3)	121 (48,4)	0,5
Cor (%)			
Branca	136 (60,7)	159 (63,6)	
Negra/parda	77 (34,4)	82 (32,8)	0,8
Amarela	11 (4,9)	9 (3,6)	
Peso inicial (g) (média, dp ^c)	3.276 (415)	3.340 (403)	0,1
Peso final (g) (média, dp)	7.565 (1.058)	7.432 (1.070)	0,2
Antecedentes familiares de doenças crônicas (%)	137 (61,2)	153 (61,2)	0,5
Intervalo em dias entre 1 ^a e 2 ^a doses (média, dp)	31,7 (2,9)	31,5 (2,8)	0,4
Intervalo em dias entre 2 ^a e 3 ^a doses (média, dp)	151,7 (8,1)	151,8 (8,7)	1,0
Intervalo em dias entre a 3 ^a dose e a coleta de amostra (média, dp)	53,0 (4,7)	53,3 (4,5)	0,5

^aVG: ventre glútea; ^bVLC: vasto lateral da coxa; ^cdp: desvio-padrão

Assim como descritas em relação às crianças, as características das mães não diferiram estatisticamente entre o grupo de intervenção (VG) e de controle (VLC) (Tabela 2). A maioria das mães possuía até 30 anos de idade (81,7% vs. 75,2%), era casada ou vivia em união consensual (77,7% vs. 82,4%), referiu renda familiar inferior a três salários mínimos (R\$ 1.246,00) (84,3% vs. 83,2%) e cinco a 12 anos de estudo (83,9% vs. 86,8%).

Em relação a características comportamentais, uso de drogas ilícitas foi referido raramente (2,7% vs. 2,0%), mas uso de tabaco foi relatado por 14,7% vs. 10,8% das mães dos bebês vacinados na região VG vs. VLC, respectivamente. Além disso, em ambos os grupos, quase 1/3 das mães afirmaram consumir bebida alcoólica durante a gravidez.

Tabela 2 - Características das puérperas, cujos filhos receberam a vacina contra hepatite B na região ventro glútea ou vasto lateral da coxa, Goiânia-GO, 2007-2008

Variável	Local da Vacina		Valor de p
	VG ^a (n=224)	VLC ^b (n=250)	
<i>Idade da mãe (anos)</i>			
< 20	51 (22,8)	50 (20,0)	0,4
21-30	132 (58,9)	138 (55,2)	
31-40	39 (17,4)	59 (23,6)	
> 40	2 (0,9)	3 (1,2)	
<i>Estado civil (%)</i>			
Casada/amasiada	174 (77,7)	206 (82,4)	0,4
Viúva/separada	11 (4,9)	9 (3,6)	
Solteira	39 (17,4)	35 (14,0)	
<i>Renda familiar (R\$)</i>			
415,00	78 (34,8)	64 (25,6)	0,2
416,00 – 830,00	67 (29,9)	88 (35,2)	
831,00 - 1245,00	44 (19,6)	56 (22,4)	
1246,00 – 2075,00	22 (9,8)	31 (12,4)	
> 2075,00	13 (5,9)	11 (4,4)	
<i>Escolaridade (anos)</i>			
< 5	10 (4,5)	12 (4,8)	0,3
5 – 9	89 (39,7)	88 (35,2)	
10 – 12	99 (44,2)	129 (51,6)	
> 12	26 (11,6)	21 (8,4)	
<i>Uso de drogas ilícitas</i>	6 (2,7)	5 (2,0)	0,5
<i>Tabagismo</i>	33 (14,7)	27 (10,8)	0,2
<i>Uso de bebida alcoólica</i>	69 (30,8)	64 (25,6)	0,2

^aVG: ventro glútea; ^bVLC: vasto lateral da coxa

4.2 RESPOSTA VACINAL

A Tabela 3 apresenta a análise, por protocolo, da resposta à vacina Butang[®] nos RN estudados. Do total de bebês vacinados, 99,5% vs 99,6% soroconverteram para o anti-HBs, independentemente do local da aplicação. A detecção de títulos protetores de anti-HBs também foi verificada em quase a totalidade dos bebês vacinados na região para VG (97,8%) ou VLC (97,6%). Mais ainda, a média geométrica dos títulos de anti-HBs foi semelhante nos dois grupos, sendo de 427,5 mUI/mL no de intervenção vs. 572,0 mUI/mL no grupo controle.

Tabela 3 - Análise, pelo protocolo, da resposta à vacina Butang[®] aplicada em lactentes na região vasto lateral da coxa ou ventre glútea, Goiânia-GO, 2007-2008

Parâmetro	VG ^a (n=224)			VLC ^b (n=250)		
	f	(%)	IC 95% ^c	f	(%)	IC 95%
Soroconversão ^d	223	(99,5)	97,5-100,0	249	(99,6)	97,8-100,0
Soroproteção ^e	219	(97,8)	94,8-99,3	244	(97,6)	94,8-99,1
GMT ^f	427,5		344,9-530,0	572,0		471,1-694,6

^aVG: ventre glútea; ^bVLC: vasto lateral da coxa; ^c Intervalo de Confiança de 95%; ^d título de anti-HBs \geq 1 mUI/mL; ^e título de anti-HBs \geq 10 mUI/mL; ^fGMT: média geométrica dos títulos.

Assim como observada na análise pelo protocolo do estudo, na análise por intenção de tratamento quase a totalidade das crianças respondeu a Butang[®], desenvolvendo títulos protetores de anti-HBs com GMT de 415,9 mUI/mL (IC 95%: 340,1-508,5) no grupo de intervenção vs. 572,0 mUI/mL (IC 95%: 471,1 - 694,6) no grupo controle (Tabela 4).

Tabela 4 - Análise, por intenção de tratamento, da resposta à vacina Butang[®] em lactentes vacinados na região ventro glútea ou vasto lateral da coxa, Goiânia-GO, 2007-2008

Parâmetro	VG ^a (n=242)		VLC ^b (n=250)			
	f	(%)	IC 95% ^c	f	(%)	IC 95%
Soroconversão ^d	241	(99,6)	97,4-99,9	249	(99,6)	97,8-100,0
Soroproteção ^e	236	(97,5)	94,4-98,9	244	(97,6)	94,8-99,1
GMT ^f	415,9		340,1-508,5	572,0		471,1-694,6

^aVG: ventro glútea; ^bVLC: vasto lateral da coxa; ^cIntervalo de Confiança de 95%; ^d título de anti-HBs \geq 1 mUI/mL; ^e título de anti-HBs \geq 10 mUI/mL; ^fGMT: média geométrica dos títulos.

A Figura 12 mostra o tipo de resposta à Butang[®] nas crianças estudadas. Após a administração do esquema vacinal, 30,6% e 29,3% dos RN que receberam a vacina nas regiões VG e VLC, respectivamente, desenvolveram títulos de anti-HBs superiores a 1.000 mUI/mL, sendo considerados, portanto, excelentes respondedores. Praticamente a metade dos bebês, em ambos os grupos, foram bons respondedores, apresentando títulos de anti-HBs de 100-999 mUI/mL: 54,3% (VG) e 53,2% (VLC). A proporção de baixos respondedores (anti-HBs: 10-99 mUI/mL) foi maior entre as crianças randomizadas para o grupo de intervenção (15,1%) quando comparadas ao grupo controle (6,8%) ($p < 0,05$). No entanto, as médias geométricas dos títulos de anti-HBs foram semelhantes entre as crianças vacinadas na região VG e VLC, considerando os baixos respondedores (40,9 mUI/mL vs. 39,6 mUI/mL), bons respondedores (380,5 mUI/mL vs. 358,0 mUL/mL) e excelentes respondedores (2.387,3 mUI/mL vs. 2.480 mUI/mL) (Tabela 5).

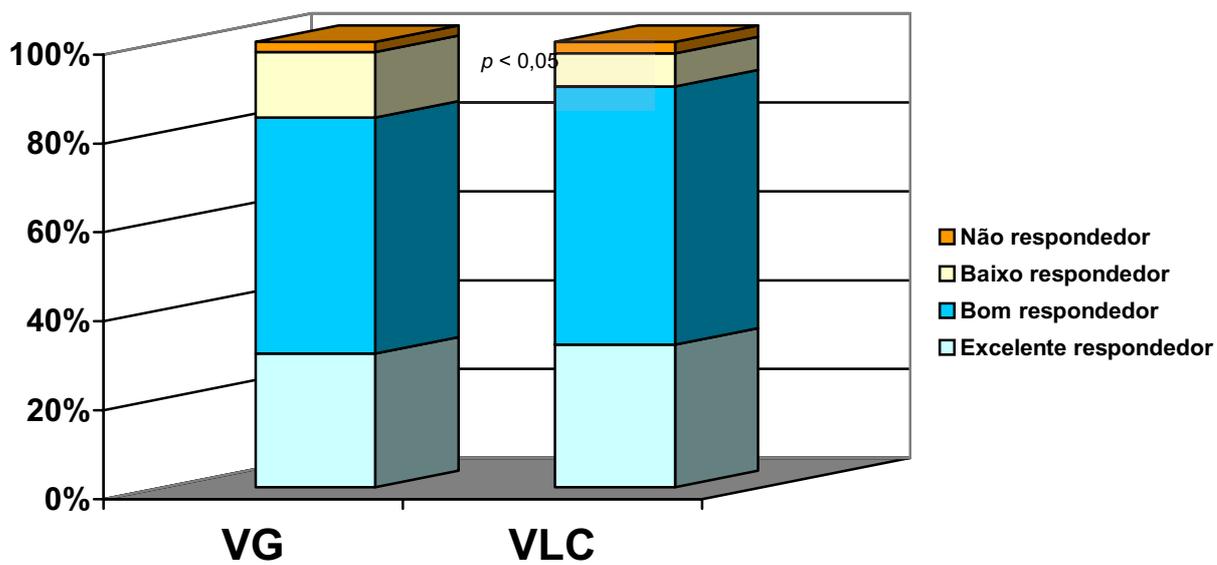


Figura 12. Tipo de resposta vacinal contra hepatite B em lactentes que receberam a vacina na região ventro glútea (VG) ou vasto lateral da coxa (VLC) em Goiânia-GO, 2007- 2008.

Tabela 5 - Média geométrica dos títulos de anti-HBs em lactentes respondedores à Butang[®], segundo local de aplicação, Goiânia-GO, 2007-2008

Tipo de respondedor	VG ^a (n=219)			VLC ^b (n=244)		
	f	GMT ^c	IC 95%*	f	GMT	IC 95%
Baixo (10-99 mUI/mL)	33	40,9	33,1-50,6	17	39,6	31,8-48,8
Bom (100 – 999 mUI/mL)	119	380,5	337,8-427,6	133	358,0	319,5-398,9
Alto (≥ 1000 mUI/mL)	67	2.387,3	2.048,0-2.797,6	94	2.480,0	2.179,8-2.817,1

^aVG: ventre glútea; ^bVLC: vasto lateral da coxa; ^cGMT: média geométrica dos títulos de anti-HBs.

Independente do local aplicado, as variáveis: sexo, cor, peso inicial e ao final do estudo e tempo de amamentação, bem como história materna de tabagismo e uso de álcool durante a gestação, não foram associadas à baixa resposta à vacina Butang[®] nos bebês investigados (Tabela 6). Já em relação a antecedentes de doenças crônicas em familiares de 1º ou 2º grau, houve uma tendência a associação estatística em crianças que receberam a vacina na região ventro glútea, mas não nas que foram vacinadas na região VLC. No grupo de intervenção, das 33 crianças que desenvolveram títulos de anti-HBs entre 10-99 mUI/mL, 75,8% tinham história familiar de doença crônica, enquanto as que apresentaram títulos iguais ou superiores a 100 mUI/mL, a proporção foi de 58,6% ($p = 0,06$).

Tabela 6 - Características dos lactentes de acordo com o tipo de resposta e local da aplicação da vacina Butang[®], Goiânia – GO, 2007-2008

Característica	VG ^a			VLC ^b		
	Baixo Responder (n=33)	Bom/Alto Responder (n=186)	p	Baixo Responder (n=17)	Bom/Alto Responder (n=227)	p
Sexo Masculino (%)	18 (54,5)	95 (51,1)	0,7	10 (58,8)	107 (47,1)	0,3
Cor Branca (%)	20 (60,6)	113 (60,8)	0,9	14 (82,4)	142 (62,6)	0,4
Antecedentes familiares de doenças crônicas (%)	25 (75,8)	109 (58,6)	0,06	9 (52,9)	141 (62,1)	0,4
Tempo de amamentação (dp ^c)	153,4 (50,3)	155,1 (54,5)	0,9	168,1 (44,7)	162,1 (47,9)	0,6
Peso Inicial ao Nascer (dp) (g)	3.185 (424)	3.287 (410)	0,2	3.228 (420)	3.346 (405)	0,2
Peso Final (dp) (g)	7.749 (1.037)	7.545 (1.062)	0,3	7.836 (780)	7.404 (1.085)	0,1
Peso Insuficiente ^a ao Nascer	8 (24,2)	42 (22,6)	0,8	6 (35,3)	42 (18,5)	0,1
Mãe tabagista (%)	6 (18,2)	26 (14,0)	0,5	1 (5,9)	26 (11,5)	0,5
Mãe usuária de bebida alcoólica (%)	10 (30,3)	57 (30,6)	1,0	7 (41,2)	57 (25,1)	0,1

^aVG: ventre gútea; ^bVLC: vasto lateral da coxa; ^cdp: desvio-padrão

Somente dois lactentes não soroconverteram para o anti-HBs e 9 apresentaram títulos inferiores a 10 mUI/mL, sendo, portanto, considerados não respondedores a vacina. Dessas crianças, cinco receberam a vacina na região VG. As características dessas crianças são apresentadas na Tabela 7.

A maioria dos lactentes era do sexo masculino (7/11; 63,6%) e da cor branca (7/11; 63,6%). Somente uma criança tinha menos de 3.000g (RN-512). Quase todas as crianças (10/11) foram amamentadas por no mínimo seis meses. Metade das crianças possuía antecedentes de doenças crônicas em familiares de 1º e 2º graus. Em 10/11 bebês, suas mães foram testadas para o anti-HBs, sendo que em duas os títulos de anti-HBs foram > 10 mUI/mL.

Tabela 7 - Características dos lactentes não respondedores a vacina Butang[®], Goiânia – GO, 2007-2008

ID	Local	Sexo	PI ^a (g)	PF ^b (g)	Cor	Título Anti-HBs (mUI/mL)	Tempo de Amamentação (meses)	Antecedentes familiares de doença crônica	Anti-HBs materno (mUI/mL)
88	VG ^c	Masc	4.400	6.000	Parda	7,5	< 6	Sim	Neg
103	VG	Fem	3.100	7.000	Branca	0,0	> 6	Sim	Neg
120	VG	Fem	3.500	6.400	Branca	7,0	> 6	Não	Neg
132	VG	Fem	3.300	8.200	Branca	4,8	> 6	Não	Neg
198	VG	Masc	3.000	8.500	Parda	5,5	> 6	Sim	Neg
87	VLC ^d	Fem	3.200	7.400	Branca	5,4	> 6	Sim	SI
104	VLC	Masc	3.400	9.000	Parda	7,3	> 6	Sim	Neg
140	VLC	Masc	3.100	5.500	Branca	5,2	> 6	Não	19,7
270	VLC	Masc	3.400	7.600	Parda	7,4	> 6	Não	Neg
286	VLC	Masc	3.600	7.600	Negra	3,0	> 6	Não	Neg
512	VLC	Fem	2.900	7.500	Branca	0,0	> 6	Sim	49,2

^aPI: peso inicial; ^bPF: peso final; ^cVG: ventre glútea; ^dVLC: vasto lateral da coxa.

4.3 REATOGENICIDADE VACINAL

A Tabela 8 apresenta a reatogenicidade à vacina Butang[®] nos grupos intervenção e controle. Febre foi a reação mais frequente em ambos os grupos, sendo observada um aumento gradativo desse sintoma a cada dose da Butang[®] (VG: χ^2 para tendência = 20,4, $p < 0,01$; VLC: χ^2 para tendência = 15,7, $p < 0,01$). Após a terceira dose, 17,6% vs. 20,7% dos bebês vacinados nas regiões VG vs. VLC apresentaram febre baixa a moderada (37°C a 38°C), respectivamente ($p = 0,4$). Enduração no local da aplicação da vacina foi incomum após a primeira dose em ambos os grupos (1,4% vs. 1,4%), mas a sua frequência aumentou cerca de três vezes (3,9 vs. 5,1%) com a segunda dose da vacina. Após a terceira dose, 11,4% dos bebês randomizados para o grupo controle apresentaram enduração no local da vacina, comparados a 4,0% no grupo de intervenção ($p = 0,00$). Ainda, verificou-se um gradiente positivo de enduração com o número de doses no grupo controle (χ^2 para tendência = 24,6, $p < 0,01$), não observado nas crianças vacinadas na região VG (χ^2 para tendência = 3,1, $p > 0,05$).

Em relação ao calor, verificou-se uma proporção maior desse evento após a terceira dose da vacina em ambos os grupos (VG: χ^2 para tendência = 3,7, $p = 0,05$; VLC: χ^2 para tendência = 3,9, $p = 0,05$). No entanto, após cada dose da vacina, a proporção desta reação foi semelhante entre os grupos. Rubor também foi mais frequente após a terceira dose nos dois grupos estudados, mas esse aumento não alcançou significância estatística (VG: χ^2 para tendência = 2,3, $p > 0,05$; VLC: χ^2 para tendência = 0,4; $p > 0,05$). Além disso, a proporção de rubor foi semelhante entre os grupos.

Considerando todas as reações investigadas, após cada dose aplicada, um número crescente de reações foi observada no grupo de intervenção (χ^2 para tendência = 22,9; $p < 0,01$), como também no grupo controle (χ^2 para tendência = 41,6; $p < 0,01$). Por outro lado, a análise intergrupos mostrou uma proporção maior de reações nas crianças que receberam a vacina no músculo vasto lateral da coxa, comparadas às vacinadas na região ventro glútea, sendo que após a terceira dose a diferença foi estatisticamente significativa: 38,4% vs. 28,6%, respectivamente ($p = 0,03$).

Tabela 8 - Comparação da reatogenicidade da vacina Butang® após cada dose aplicada na região ventro glútea e vasto lateral da coxa em lactentes vacinados em Goiânia-Goiás, 2007-2008

Reações	1ª dose				2ª dose				3ª dose				
	VG ^a (n=286)		VLC ^b (n=294)		VG (n=254)		VLC (n=272)		VG (n=227)		VLC (n=237)		p
	f	%	f	%	f	%	f	%	f	%	f	%	
Calor	1	(0,3)	3	(1,0)	3	(1,2)	2	(0,7)	5	(2,2)	5	(2,1)	0,8
Rubor	7	(2,4)	7	(2,4)	4	(1,6)	4	(1,5)	11	(4,8)	8	(3,4)	0,4
Enduração	4	(1,4)	4	(1,4)	10	(3,9)	14	(5,1)	9	(4,0)	27	(11,4)	0,00
Febre	15	(5,2)	24	(8,2)	25	(9,8)	37	(13,6)	40	(17,6)	49	(20,7)	0,4
Total	34	(11,9)	42	(14,3)	42	(16,5)	47	(17,3)	65	(28,6)	91	(38,4)	0,03

^aVG: ventro glútea; ^bVLC: vasto lateral da coxa.

4.4 ANTI-HBS MATERNOS E RESPOSTA VACINAL EM RN

Para avaliar se a presença de anticorpos anti-HBs maternos (origem vacinal) interferem na resposta vacinal das crianças que receberam a primeira dose da Butang[®] nas primeiras horas de vida, 312 mães com idade ≤ 30 anos foram testadas para o marcador anti-HBs e anti-HBc (para exclusão da análise as mulheres imunizadas naturalmente).

Quarenta e nove mães foram positivas apenas para o anti-HBs, sugerindo imunização prévia contra hepatite B. A média geométrica dos títulos de anti-HBs dos bebês de mães anti-HBs negativas (492,7 mUI/mL; IC 95%: 3,0–10.000) foi semelhante aos de mães cujos títulos variaram de 10 a 99 mUI/mL (534,4 mUI/mL; IC 95%: 1.0-5.421), 100-999 mUI/mL (511,8 mUI/mL; IC 95%: 14,6-2.938) e ≥ 1.000 mUI/mL (24,9-10.002) ($p = 0,68$) (Figura 13).

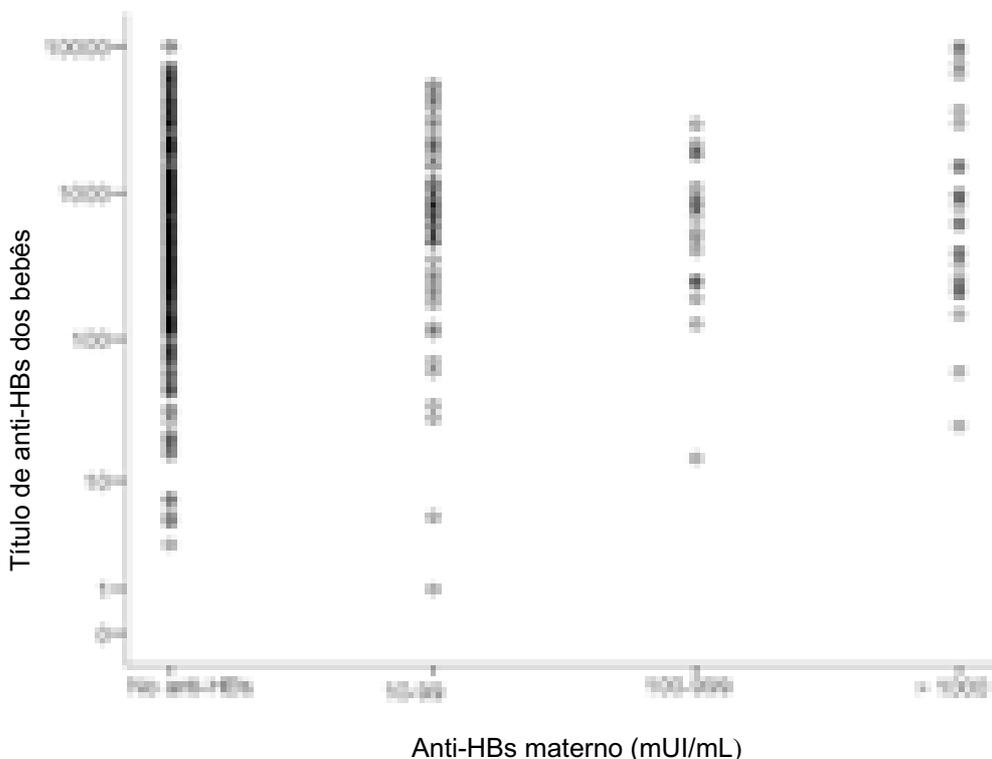


Figura 13. Resposta vacinal contra hepatite B em lactentes, de acordo com a situação vacinal das mães, Goiânia-GO, 2007-2008.



6. CONCLUSÕES

- Quase a totalidade dos RN respondeu com títulos protetores de anti-HBs, independente do local da aplicação: 97,8 % (VG) e 97,6 % (VLC), ratificando a boa imunogenicidade da vacina Butang[®]. A média geométrica dos títulos de anti-HBs não diferiram entre as crianças que receberam a vacina na região VG (427,5 mUI/mL; IC 95%: 344,9 - 530,9) e VLC (572,0 mUI/mL; IC 95%: 471,1 - 694,6);

- Crianças vacinadas na região VG apresentaram uma proporção menor de reações locais e febre comparada às que receberam na VLC, principalmente após a terceira dose (28,6% vs. 38,4%), evidenciando essa região como um local seguro para administração intramuscular da vacina contra hepatite B em lactentes;

- Em recém-nascidos baixos respondedores, que receberam a vacina na região VG, verificou-se uma proporção maior de antecedentes familiares de doenças crônicas (75,8% vs. 58,6%);

- Nesta investigação, os títulos de anti-HBs vacinais maternos não influenciaram a resposta vacinal dos seus conceptos.



5. DISCUSSÃO

Este estudo trata do primeiro ensaio clínico randomizado controlado para avaliação da imunogenicidade e reatogenicidade da vacina Butang[®] em recém-nascidos a termo, vacinados nas primeiras 12 horas de vida, comparando duas regiões de aplicação do imunógeno, ou seja, a ventro glútea e a vasto lateral da coxa. O estudo iniciou-se em fevereiro de 2007, seis meses após a Divisão de Imunização da Secretaria de Saúde do Município de Goiânia implantar, de forma sistemática, a vacina contra hepatite B para os RN nas primeiras horas de vida.

Os dois grupos estudados foram comparáveis, considerando sexo, peso, cor, antecedentes familiares de doenças crônicas, intervalo entre as doses da vacina, bem como entre a última dose e coleta de sangue, e características maternas. Adicionalmente, as características sócio-demográficas das mães dos RN foram semelhantes as da população em geral de Goiânia, ou seja, idade até 30 anos, casadas ou vivendo em união consensual, renda familiar inferior a 6 salários mínimos e 5 a 12 anos de escolaridade (IBGE, 2008).

Independente dos grupos, a imunogenicidade da Butang[®] foi semelhante à encontrada em outros estudos utilizando a vacina Engerix B (MARTINS et al., 2004; SHIVANANDA et al., 2006; VELU et al., 2007), considerada o padrão ouro, bem como de outras vacinas que utilizam o mesmo sistema de expressão para obtenção do HBsAg recombinante (SAPRU et al., 2007; SHIVANANDA et al., 2006).

Em relação à Butang[®], os resultados do presente estudo ratificaram os de Martins et al. (2004) que vacinaram 284 recém-nascidos e observaram uma taxa de soroproteção de 93,7%, e os de Isolani et al. (2007) que relataram 100% de soroconversão em 70 crianças pré-termo e a termo, iniciando o esquema vacinal em torno dos 10 meses de idade.

Ao comparar a imunogenicidade da Butang[®], verificou-se que a proporção de crianças que desenvolveu títulos protetores de anti-HBs após vacinação na região VG (97,8 %; IC 95%: 94,8-99,3), foi semelhante à daquelas vacinadas no

músculo vasto lateral (97,6%; IC 95%: 94,8-99,1). A magnitude da resposta vacinal, refletida pela média geométrica dos títulos de anti-HBs, também não diferiu entre os dois grupos. Crianças que receberam a vacina na região VG tiveram uma GMT de 427,5 mUI/mL (IC 95%: 344,9-530,0) e as vacinadas na região VLC de 572,0 mUI/mL (IC 95%: 471,1-694,6), evidenciando esse local como apropriado para administração do imunógeno.

COOK e MURTAGH (2002), utilizando a vacina Engerix B e o mesmo calendário vacinal do presente estudo, mostraram também esse local como apropriado para vacinação de crianças com menos de dois anos, encontrando médias geométricas de títulos de anti-HBs de 2071,2 mUI/mL e 2073,2 mUI/mL nas crianças vacinadas na região VG (n=87) e VLC (n=84), respectivamente.

Alguns fatores têm sido associados à não resposta vacinal contra hepatite B, incluindo sexo, peso ao nascer, idade do início da vacinação e história de doenças crônicas (ASSAD; FRANCIS, 1999; ISOLANI et al., 2006; LOSONSKY et al., 1999; RIBEIRO; AZEVEDO, 2006). Neste estudo, em crianças vacinadas na região VG, verificou-se uma proporção maior de antecedentes familiares de doenças crônicas e menor média de peso ao nascer em bebês baixos respondedores (75,8%; 3.185g), comparados aos bons/altos respondedores (58,6%; 3.287g).

Onze RN não responderam à Butang[®] com títulos de anti-HBs \geq 10 mUI/mL, sendo que duas delas não soroconverteram para o anti-HBs. A metade das crianças foi vacinada na região VG e a outra no VLC. A maioria dessas crianças era do sexo masculino, um fator que parece interferir na resposta vacinal contra hepatite B (ASSAD; FRANCIS, 1999; COOK; MURTAGH, 2002; KOFF, 2002; YU et al., 2006). De fato, apesar da diferença não ter sido estatisticamente significativa, verificou-se, também, uma proporção maior de meninos baixos respondedores, independente do local da vacina (VG: 54,5% vs. 51,5%; VLC: 58,8% vs. 47,1%).

Em indivíduos não respondedores ao esquema primário de vacinação, aproximadamente 25% a 50% respondem com títulos protetores de anti-HBs após uma dose de reforço, e 44% a 100% após uma série de três doses (MAST et al., 2006). Ademais, alguns autores têm mostrado que indivíduos que não soroconverteram para o anti-HBs com títulos inferiores a 10 mUI/mL (títulos entre 1 e 9 mUL/mL) têm um risco maior de não responderem a vacina após doses de reforço (CLEMENS et al., 1997; MAST et al., 2006). Realmente, nesta investigação todas as

crianças não respondedoras receberam uma dose adicional da Butang[®], sendo que 83,3% desenvolveram uma resposta anamnésica com títulos de anti-HBs superiores a 100 mUI/mL. Somente duas crianças não desenvolveram títulos ≥ 10 mUI/mL, sendo que ambas não haviam soroconvertido para o anti-HBs após o esquema vacinal primário. Para essas crianças, foi recomendado completar o esquema, conforme preconizado pelo Ministério da Saúde.

O local da aplicação da vacina deve ser capaz de induzir a resposta imune desejada com uma probabilidade mínima de lesão tecidual, neural ou vascular (WATSON; PETER, 1999). Assim, apesar da vacina contra hepatite B ser considerada segura, reações como dor e endureção no local da aplicação têm sido relatadas em 3% a 27% dos vacinados, e febre baixa a moderada ($> 37.7^{\circ}$ C) entre 1% a 6% (BRASIL, 2006; MAST et al., 2006). Portanto, utilizar um compartimento muscular que apresente de forma adequada o antígeno para o sistema imune e baixa reatogenicidade, devem ser de grande interesse para a saúde pública.

Utilizando-se a Butang[®], verificou-se um gradiente positivo de reações locais e febre de acordo com o número de doses recebidas em ambos os grupos. Ademais, após a terceira dose, a proporção de endureção foi significativamente maior em lactentes que receberam a vacina no músculo vasto lateral, comparadas com as que receberam na região VG ($p < 0,05$). COOK e MURTAGH (2006), utilizando a vacina tríplice acelular (DPTa) e Hib (*H. Influenza B*) também mostraram uma proporção maior de reações locais, como endureção/rubor (36,4% vs. 6,3%; 13,9% vs. 7,4%) em lactentes vacinadas no VLC vs. VG, ratificando os achados deste estudo.

As reações locais são minimizadas quando o imunógeno é administrado por via intramuscular profunda, diminuindo, assim, a possibilidade da administração no tecido subcutâneo (COOK; MURTAGH, 2006; GROSWASSER et al., 1997; ZUCKERMAN, 2000). O *Advisory Committee on Immunization Practices* (CDC, 2009) tem recomendado agulhas de 16 mm e 25 mm para administração de vacinas no VLC em RN e lactentes, respectivamente.

Neste estudo, embora a técnica de inserção da agulha tenha sido a mesma preconizada pelo ACIP, utilizou-se agulhas de 20 mm de comprimento, como padronizado pela Divisão de Imunização do Município de Goiânia. Assim, o comprimento da agulha pode ter contribuído para os achados de endureção.

Após a terceira dose, 11,4% das lactentes que receberam a vacina no músculo vasto lateral apresentaram endureção no local da vacina, enquanto somente 4% dos vacinados na região ventro glútea tiveram esta reação. Nas primeiras, a média de peso na época da conclusão do esquema vacinal não diferiu considerando a endureção 7.471g (5.000-10.200) vs. 7.359g (5.500-10.000); ($p = 0,72$). Já em relação aos lactentes vacinados na região VG, a média de peso diferiu significativamente. Bebês com endureção no local da vacina tinham uma média de peso de 8.658g (6.800-10.500), enquanto os que não apresentaram esta reação, a média ponderal foi de 7.522g (5.400-10.500) ($p < 0,05$) (dados não apresentados). Assim, agulhas mais longas parecem mais adequadas para vacinação de bebês com mais de 30 dias em nossa região, inclusive quando a injeção é realizada na região ventro glútea. Sugere-se, portanto, a padronização do tamanho da agulha, de acordo com a faixa etária, conforme recomendação do ACIP (MAST et al., 2006). Esta padronização oferecerá mais conforto para criança e minimizará a ocorrência de endureção, principalmente quando a vacina é administrada na região VLC.

No PNI, a terceira dose da vacina contra hepatite B coincide com a última dose da vacina combinada contra difteria, tétano, coqueluxe e *Haemophilus influenzae* tipo b (tetravalente). A administração das duas vacinas é realizada na região vasto lateral da coxa, por via IM, porém em locais anatômicos distintos, a tetravalente na coxa esquerda e a hepatite B na direita. Reações locais (vermelhidão, calor, endurecimento e edema) e febre têm sido observadas em 37% e 40,4% dos indivíduos vacinados com a tetravalente, respectivamente (BRASIL, 2006). Desde que a maioria dos lactentes recebeu a vacina contra hepatite B na mesma época da tetravalente, isto pode ter contribuído para a proporção elevada de febre após a última dose da Butang[®].

Neste trabalho, apesar da falta de registros de aceitabilidade dos pais ou responsáveis em relação à região VG, não houve recusa em relação ao local da aplicação da vacina. Além disso, as mães manifestavam satisfação, inclusive questionando a possibilidade de outras vacinas injetáveis do PNI serem administradas neste local. Segundo elas, os bebês sentiam menos dor durante e após a aplicação da vacina. Na Austrália, COOK e MURTAGH (2003), também, verificaram uma boa aceitabilidade das mães em relação à região VG.

No presente estudo selecionou-se todas as mães com idade ≤ 30 anos e investigou-se a associação entre vacinação contra hepatite B (positividade isolada para o anti-HBs) e resposta vacinal de seus conceptos. Dos 312 pares de mães-filhos investigados, não foi observada qualquer associação entre títulos de anti-HBs maternos e resposta vacinal dos conceptos, ratificando a estratégia nacional de aplicação da primeira dose da vacina contra hepatite B, nas primeiras horas de vida.

Por outro lado, Hu et al. (2008) vacinaram 59 RN nas primeiras horas de vida e verificaram que filhos de mães com títulos altos de anticorpos vacinais (> 1000 mUI/mL) apresentaram uma média geométrica de títulos de anti-HBs mais baixo (465 mUI/mL), do que filhos de mães com títulos mais baixos (< 1000 mUI/mL) ou negativos: 1806 mUI/mL e 1738 mUI/mL, respectivamente. Haja vista que a persistência de títulos protetores de anti-HBs tem sido relacionada ao pico do nível de anticorpos obtidos após a vacinação primária (WHITTLE et al., 2002), que estudos longitudinais têm mostrado a perda da memória imunológica contra hepatite B em indivíduos vacinados ao nascer (HAMMITT et al., 2007; LU et al., 2008), e que a frequência de mulheres vacinadas contra hepatite B em idade fértil tende a ser cada vez maior nos próximos anos, mais investigações são desejáveis para confirmar ou refutar os achados desses autores.

Portanto os resultados deste estudo ratificam a musculatura da região VG, como um local alternativo seguro e imunogênico para administração da vacina Butang[®] em RN. A magnitude da resposta vacinal e os achados globais de menos reações locais e febre, tornam esse local apropriado para vacinação de RN e lactentes, oferecendo mais conforto para criança e satisfação dos pais e/ou responsáveis.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o desenvolvimento deste estudo, teve-se a oportunidade de vivenciar um estudo de seguimento. Assim, conseguiu-se manter uma coorte de lactentes por oito meses, tarefa árdua, que exigiu um grande envolvimento dos pesquisadores. Este estudo foi realizado na Região Leste de Goiânia, que possui uma área total de 79,5 Km², 76 bairros e indivíduos de todas as classes sociais. A primeira dose da vacina foi realizada em cinco diferentes maternidades e bairros de Goiânia, e as doses subseqüentes nos domicílios dos RN. As visitas eram agendadas com um dia de antecedência, no entanto, raros foram os dias em que todas as crianças se encontravam em seus lares. Em alguns casos, foi necessário retornar ao mesmo endereço para fazer uma única dose cinco a seis vezes, e, ainda, muitas vezes encontrando dificuldades tais como: endereços distantes uns dos outros e/ou locais de difícil acesso, inclusive fora da área de abrangência do estudo, devido às mudanças de domicílios.

Contudo, o rigor no cumprimento do calendário vacinal, visitas pós-vacinação e coleta de amostras no domicílio, bem como parcerias estabelecidas com os serviços de saúde da Região Leste de Goiânia, contribuíram para o estabelecimento do vínculo de confiança das mães ou responsáveis pelos recém-nascidos com a equipe de pesquisa, favorecendo a adesão e conclusão do estudo em 84,8% das crianças que receberam a primeira dose da vacina.

Portanto, este trabalho vem somar a outros que advogam a necessidade de um local alternativo para as vacinas, tão seguro e imunogênico como o músculo da região vasto lateral da coxa, porém com menor reatogenicidade e maior conforto local. Além disso, confirma a segurança e eficácia da vacina brasileira contra hepatite B produzida pelo Instituto Butantan, quando administrada nas primeiras 12 horas de vida do RN.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, J. I., et al. Prevalence of antibodies to hepatitis B core antigen in blood donors in the middle West region of Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 96, p.185-7, 2001.

ALTER, M. J. Epidemiology of hepatitis B in Europe and worldwide. *J. Hepatol.*, v. 39, Suppl 1, p.S64-9, 2003.

ALVES, A. S. R., et al. Hepatitis B vaccine in infants: a randomized controlled trial comparing gluteal versus anterolateral thigh muscle administration. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 43, p. 139-143, 2001.

ANDRADE, A. F., et al. Seroprevalence of hepatitis B and C virus markers among blood donors in Rio de Janeiro, Brazil, 1998-2005. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.101, p. 673-6, 2006.

ARAUZ-RUIZ, P., et al. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J. Gen. Virol.*, v. 83, p. 2059-73, 2002.

ASSAD, S.; FRANCIS, A. Over a decade of experience with a yeast recombinant hepatitis B vaccine. *Vaccine*, v.18, p. 57-67, 1999.

BABHULKAR, S. S. Triceps contracture caused by injections: A report of 11 cases. *J. Bone Joint Surg Br*, v. 67, p. 94-6, 1985.

BALDY, J. L., 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. São Paulo*, v. 46, p. 103-7, 2004.

BANCROFT, W. H.; MUNDON, F. K.; RUSSELL, P. K. Detection of additional antigenic determinants of hepatitis B antigen. *J. Immunol.*, v. 109, p. 842-8, 1972.

BEECROFT, P. C.; REDICK, S. A. Intramuscular injection practices of pediatric nurses: site selection. *Nurse Educator*, v. 15, p. 23-28, 1990.

BEGERSON, P. S.; SINGER, S. A.; KAPLAN, A. M. I. Intramuscular injections in children. *Pediatrics*, v. 70, p. 944-948, 1982.

BEYEA, S. C.; NICOLL, L. H. Administration of medications via the intramuscular route: an integrative review of the literature and research-based protocol for the procedure. *Appl. Nurs. res.*, v. 8, p. 23-33, 1995.

BLOCK, T. M.; GUO, H.; GUO, J. T. Molecular virology of hepatitis B virus for clinicians. *Clin. Liver Dis.*, v. 11, p. 685-706 vii, 2007.

BLONDHEIM, O., et al. Immunogenicity of hepatitis B vaccine in preterm infants. *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal Ed.*, v. 79, p. F206-8, 1998.

BOND, W. W., et al. Survival of hepatitis B virus after drying and storage for one week. *Lancet*, v. 1, p. 550-1, 1981.

BOWDEN, S. Serological and molecular diagnosis. *Semin. Liver Dis.*, v. 26, p. 97-101, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Avaliação da Assistência às Hepatites Virais no Brasil*. Brasília: Ministério da Saúde, 2002. 61 p.

_____. Programa Nacional de Imunizações 30 anos. *Projetos, Programas e Relatórios Ministério da Saúde*. Série C, 2003.

_____. Ministério da Saúde .Agencia Nacional de Vigilância Sanitária.Resolução da Diretoria Colegiada-RDC nº 306 de 7 de dezembro de 2004/Ministério da Saúde. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária.Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br> . Acesso em:09 mar 2009.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual dos Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais. *D. D. V. Epidemiológica*. Brasília, 2006. 158 p.

_____. Ministério da Saúde. *Hepatites Virais: o Brasil está atento*. 2008. 60 p.

CAMPOS, R. H.; MBAYED, V. A.; PINEIRO, Y. L. F. G. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Latin America. *J. Clin. Virol.*, v. 34, Suppl 2, p. S8-S13, 2005.

CARDOSO, D. D. D., et al. Seroepidemiology for the hepatitis B virus (HBV) in pregnant women/parturients and its transmission to newborns in Goiania, GO. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 29, p. 349-53, 1996.

CARMAN, W. F., et al. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet*, v. 336, p. 325-9, 1990.

CARNEIRO, A.F.; DAHER, R.R. Soroprevalência do vírus da hepatite B em anestesiológicos. *Rev. Bras. Anesthesiol.*, v. 53, p. 672-679, 2003.

CASTELLANOS, B. E. P. Revisão bibliográfica dos estudos relativos as diferentes regiões para aplicação de injeção intra-muscular. *Rev. Esc. Enf. USP*, v. 11, p. 85-89, 1977.

CDC. Epidemiologic notes and reports suboptimal response to hepatitis B vaccine given by injection into buttock. *MMWR*, 34: 105-108, 1985, 113 p.

_____. Administering Vaccines: Dose, Route, Site, and Needle Size. *Vaccine Administration*. V. IMMUNIZATIONS: Centers for Disease and Control and Prevention, 2009.

CHANG, M. H. Hepatitis B virus infection. *Semin.Fetal Neonatal Med.*, v. 12, p. 160-167, 2007.

CLEMENS, R., et al. Booster immunization of low - and non - responders after a standard three dose hepatitis B vaccine schedule-results of a post-marketing surveillance. *Vaccine*, v. 15, p. 349-52, 1997.

COCKSHOTT, W. P., et al. Intramuscular or intralipomatous injections? *N. Engl. J. Med.*, v. 307, p. 356-8, 1982.

COCOMAN, A.; MURRAY, J. Intramuscular injections: a review of best practice for mental health nurses. *J. Psychiatr. Ment. Health Nurs.*, v. 15, p. 424-34, 2008.

COLEMAN, P. F. Detecting hepatitis B surface antigen mutants. *Emerg.Infect. Dis.*, v. 10, p. 198-203, 2006.

COOK, I. F. Sex differences in injection site reactions with human vaccines. *Hum Vaccin*, v. 5, 2009.

COOK, I. F.; MURTAGH, J. Comparative immunogenicity of hepatitis B vaccine administered into ventrogluteal area and anterolateral thigh in infants. *J. Pediatr. Child Health*, v. 38, p. 303-396, 2002.

_____. Comparative reactogenicity and parental acceptability of pertussis vaccines administered into the ventrogluteal area and anterolateral thigh in children aged 2, 4, 6, and 18 months. *Vaccine*, v. 21, p. 3330-3334, 2003.

_____. Optimal technique for intramuscular injection of infants and toddlers: a randomised trial. *Med. J. Aust.*, v. 183, p. 60-3, 2005.

_____. Ventrogluteal area-a suitable site for intramuscular vaccination of infants and toddlers. *Vaccine*, v. 24, p. 2403-2408, 2006.

COUROCÈ-PAUTY, A. M.; LAMAIRE, J. M.; ROUX, J. F. New hepatitis B surface antigens subtypes inside *ad* category. *Vox Sang.*, v. 35, p. 304-308, 1978.

COUROCÈ, A. M.; HOLLAND, P. V. J. Y., M.; SOULIER, J. P. HBsAg subtypes. *Bibl. Haematol.*, v. 42, 1976.

DAVAALKHAM, D., et al. Impact of the universal hepatitis B immunization program in Mongolia: achievements and challenges. *J. Epidemiol.*, v. 17, p. 69-75, 2007.

DE SCHRIJVER, K., et al. An outbreak of nosocomial hepatitis B virus infection in a nursing home for the elderly in Antwerp (Belgium). *Acta Clin. Belg.*, v. 60, p. 63-9, 2005.

DE SOUZA, M. M., et al. Seroprevalence of hepatitis B virus infection in patients with mental problems. *Rev. Bras. Psiquiatr.*, v. 26, p. 35-8, 2004.

DEGERTEKIN, B.; LOK, A. S. Update on viral hepatitis: 2008. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, v. 25, p. 180-5, 2009.

DEMIRJIAN, A.; LEVY, O. Safety and efficacy of neonatal vaccination. *Eur. J. Immunol.*, v. 39, p. 36-46, 2009.

DI BISCEGLIE, A. M. Hepatitis B and hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, v. 49, p. S56-S60, 2009.

DIENSTAG, J. L. Hepatitis B virus infection. *NEJM*, v. 359, p. 1486-1500, 2008.

DONALDSON, C.; GREEN, J. Using the ventrogluteal site for intramuscular injections. *Nurs. Times*, v. 101, p. 36-8, 2005.

ELGOUHARI, H. M.; ABU-RAJAB TAMIMI, T. I.; CAREY, W. D. Hepatitis B virus infection: understanding its epidemiology, course, and diagnosis. *Cleve. Clin. J. Med.*, v. 75, p. 881-9, 2008.

ESTEBAN, J. I., et al. Immunoprophylaxis of perinatal transmission of the hepatitis B virus: efficacy of hepatitis B immune globulin and hepatitis B vaccine in a low-prevalence area. *J. Med. Virol.*, v. 18, p. 381-91, 1986.

FANG, Z. L., et al. Hepatitis B virus pre-S deletion mutations are a risk factor for hepatocellular carcinoma: a matched nested case-control study. *J. Gen. Virol.*, v. 89, p. 2882-90, 2008.

FATTOVICH, G. Natural history of hepatitis B. *J. Hepatol.*, v. 39, p. S50-8, 2003.

FERREIRA, R. C., et al. Prevalence of hepatitis B virus and risk factors in Brazilian non-injecting drug users. *J. Med. Virol.*, v. 81, p. 602-9, 2009.

FLAQUET, P. P.; LAY, L. R.; GONZALÉZ, M. D. Immunogenicity of a recombinant DNA yeast-derived hepatitis B vaccine at different doses in health young adults. *Infect. Dis. Rev.*, v. 3, p. 138-142, 2001.

GANEM, D.; PRINCE, A. M. Mechanisms of disease: hepatitis B infection - Natural history and clinical consequences. *NEJM*, v. 350, p. 1118-1129, 2004.

GEIER, M. R.; GEIER, D. A. Hepatitis B vaccination safety. *Ann. Pharmacother.*, v. 36, p. 370-4, 2002.

GLEBE, D. Recent advances in hepatitis B virus research: a Germain point of view. *World J. Gastroenterol.*, v. 13, p. 8-13, 2007.

GODOY, S. Educação em serviço por meio de vídeo conferência: aplicação de injetáveis por via intramuscular na região ventro glútea. 2002, 107 p. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, 2002.

GONZALEZ-HUEZO, M. S., et al. Comparison of two different vaccination schemes against Hepatitis A and B in Mexican children and adolescents. *Rev. Gastroenterol. Mex.*, v. 68, p. 271-6, 2003.

GREENWAY, K. Using the ventrogluteal site for intramuscular injection. *Nurs. Stand.*, v. 18, p. 39-42, 2004.

GROSWASSER, J., et al. Needle length and injection technique for efficient intramuscular vaccine delivery in infants and children evaluated through an ultrasonographic determination of subcutaneous and muscle layer thickness. *Pediatrics*, v. 100, p. 400-3, 1997.

HALL, A., et al. Multiple sclerosis and hepatitis B vaccine? *Vaccine*, v. 17, p. 2473-5, 1999.

HAMMITT, L. L., et al. Hepatitis B immunity in children vaccinated with recombinant hepatitis B vaccine beginning at birth: a follow-up study at 15 years. *Vaccine*, v. 25, p. 6958-64, 2007.

HIEU, N. T., et al. Comparative efficacy, safety and immunogenicity of Hepavax-Gene and Engerix-B, recombinant hepatitis B vaccines, in infants born to HBsAg and HBeAg positive mothers in Vietnam: an assessment at 2 years. *Vaccine*, v. 20, p. 1803-8, 2002.

HOCHSTETTER, V. A. V. Über die intraglutaale injektion, ihre komplikationen und deren verhütung. *Shweizerische Medizinische Wochenschrift*, v. 84, p. 1226-1227, 1954.

HOLLINGER, F.; LIANG, T. J. Hepatitis B virus. In: *Fields Virology*. Philadelphia: Lippecontt Willians; S. Wilkins, 2001, p. 2971-3036.

HSIEH, Y. H., et al. Pre-S mutant surface antigens in chronic hepatitis B virus infection induce oxidative stress and DNA damage. *Carcinogenesis*, v. 25, p. 2023-32, 2004.

HSU, H. M., et al. Seroepidemiologic survey for hepatitis B virus infection in Taiwan: the effect of hepatitis B mass immunization. *J. Infect. Dis.*, v. 179, p. 367-70, 1999.

HU, Y., et al. Influence of maternal antibody against hepatitis B surface antigen on active immune response to hepatitis B vaccine in infants. *Vaccine*, v. 26, n. 48, p. 6064-6067, 2008.

HUY, T. T. T.; NGOC, T. T.; ABE, K. New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam. *J. Virol.*, v. 82, p. 5657-5663, 2008.

IAC. How to Administer Intramuscular (IM) Injections. *Needle tips: Immunization Action Coalition*, 2009.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Síntese de indicadores sociais. Uma análise das condições de vida da população brasileira. Rio de Janeiro – RJ. 2008, 280p. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatística/população/condiçãodevida/indicadoresminimos/sinteseindcsociais2008/indic_sociais_2008.pdf. Acesso: 12 dez. 2008.

IOSHIMOTO, L. M., et al. Safety and immunogenicity of hepatitis B vaccine Butang in adults. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, v. 41, p. 191-3, 1999.

ISOLANI, A. P., et al. Protection against hepatitis B by the Butang recombinant vaccine in newborn children in South Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 101, p. 551-3, 2006.

JACKSON, A. M.; HUTTON, P. A. Injection-induced contractures of the quadriceps in childhood. A comparison of proximal release and distal quadricepsplasty. *J. Bone Joint Surg. Br.*, v. 67, p. 97-102, 1985.

JAIN, A., et al. Multicentric evaluation of recombinant DNA hepatitis B vaccine of Cuban origin. *Trop. Gastroenterol.*, v. 21, p. 14-7, 2000.

JENISON, S. A., et al. Quantitative analysis of hepatitis B virus DNA in saliva and semen of chronically infected homosexual men. *J. Infect. Dis.*, v. 156, p. 299-307, 1987.

JOSHI, N., et al. Safety and immunogenicity of indigenous recombinant hepatitis B vaccine (Shanvac-B) in comparison with commercially available vaccine. *Indian J. Gastroenterol.*, v. 19, p. 71-73, 2000.

KAUR, H.; MANI, H. Seroprotection following Enivac-HB a recombinant hepatitis B vaccine. *Indian J. Gastroenterol.*, v. 19, p. 41, 2000.

KHAMAISSI, M.; SHOENFELD, Y.; ORBACH, H. Guillain-Barre syndrome following hepatitis B vaccination. *Clin. Exp. Rheumatol.*, v. 22, p. 767-70, 2004.

KIDD-LJUNGGREN, K., et al. High levels of hepatitis B virus DNA in body fluids from chronic carriers. *J. Hosp. Infect.*, v. 64, p. 352-7, 2006.

KOFF, R. S. Immunogenicity of hepatitis B vaccines: implications of immune memory. *Vaccine*, v. 20, p. 3695-3701, 2002.

LA TORRE, G., et al. An assessment of the effect of hepatitis B vaccine in decreasing the amount of hepatitis B disease in Italy. *J. Virol.*, v. 5, p. 84, 2008.

LE BOUVIER, G. L. The heterogeneity of Australia Antigen. *J. Infect. Dis.*, v. 123, p. 671-675, 1971.

LIANG, T. J. Hepatitis B: The virus and Disease. *Hepatology*, v. 49, p. S13-S21, 2009.

LIAW, Y.-F.; CHU, A.-M. Hepatitis B infection. *Lancet*, v. 373, p. 582-592, 2009.

LINDSAY, K. L.; HERBERT, D. A.; GITNICK, G. L. Hepatitis B vaccine: low postvaccination immunity in hospital personnel given gluteal injections. *Hepatology*, v. 5, p. 1088-90, 1985.

LIPPERT, W. C.; WALL, E. J. Optimal intramuscular needle-penetration depth. *Pediatrics*, v. 122, p. 556-63, 2008.

LOPES, C. L. R., et al. Perfil soropidemiológico da infecção pelo vírus da hepatite B em profissionais das unidades de hemodiálise de Goiânia-Goiás, Brasil Central. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 34, p. 543-548, 2001.

LOSEK, J. D.; GYURO, J. Pediatric intramuscular injections: do you know the procedure and complications? *Pediatr. Emerg. Care*, v. 8, p. 79-81, 1992.

LOSONSKY, G. A., et al. Hepatitis B vaccination of premature infants: a reassessment of current recommendations for delayed immunization. *Pediatrics*, v. 103, p. 14, 1999.

LU, C. Y., et al. Humoral and cellular immune responses to a hepatitis B vaccine booster 15-18 years after neonatal immunization. *J. Infect. Dis.*, v. 197, p. 1419-26, 2008.

LUM, P. J., et al. Hepatitis B virus infection and immunization status in a new generation of injection drug users in San Francisco. *J. Viral Hepat.*, v. 15, p. 229-36, 2008.

LUSIDA, M. I., et al. Novel subgenotypes of hepatitis B virus genotypes C and D in Papua, Indonesia. *J. Clin. Microbiol.*, v. 46, p. 2160-6, 2008.

MAHONEY, F. J.; KANE, M. *Hepatitis B vaccine*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1999, 1229 p.

MAHTAB, M., et al. Hepatitis B genotypes: an overview. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.*, v. 7, p. 457-464, 2008.

MAKHANI, J. S. A complication of intra-muscular injections in the thigh. *Indian J. Pediatrics*, v. 38, p. 54-60, 1971.

MARIANO, A., et al. Role of beauty treatment in the spread of parenterally transmitted hepatitis viruses in Italy. *J. Med. Virol.*, v. 74, p. 216-20, 2004.

MARTELLI, C. M. T., et al. Soroprevalência e fatores de risco para a infecção pelo vírus da hepatite B pelos marcadores HBsAg e anti-HBs em prisioneiros e primodoadores de sangue. *Rev. Saúde Publ.*, 24, p. 478-487, 1990.

_____, et al. Anti-HBc testing for blood donations in areas with intermediate hepatitis B endemicity. *Pan Am. J. Public Health*, v. 6, p. 69-73, 1999.

MARTINS, R. M., et al. Multicenter study on the immunogenicity and safety of two recombinant vaccines against hepatitis B. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 99, p. 865-871, 2004.

MAST, E. E., et al. 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 II: immunization of adults. *MMWR Recomm. Rep.*, v. 55, RR-16, p. 1-33, 2006.

MATOS, M. A., et al. Epidemiology of hepatitis B virus infection in truck drivers in Brazil, South America. *Sex Transm. Infect.*, v. 84, p. 386-9, 2008.

MATOS, M. A., et al. Epidemiological study of hepatitis A, B and C in the largest Afro-Brazilian isolated community. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 2009.

MCCLOSKEY, J. R.; CHUNG, M. K. Quadriceps contracture as a result of multiple intramuscular injection. *Am. J. Dis. Child*, v. 131, p. 416-7, 1977.

MCMAHON, B. J. Epidemiology and natural history of hepatitis B. *Semin. Liver Dis.*, v. 25, Suppl. 1, p. 3-8, 2005.

_____. The natural history of chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology*, v. 49, Suppl. 5, p. S45-55, 2009.

MELDAL, B. H., et al. A new Hepatitis B virus subgenotype D6 in Tunisian blood donors. *J. Gen. Virol.*, 2009.

MELLO, F. C., et al. Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. *BMC Microbiol.*, v. 7, p. 103, 2007.

MENESES, A. S.; MARQUES, I. R. Proposta de um modelo de delimitação geométrica para injeção ventro-glútea. *REBEN*, v. 60, p. 552-558, 2007.

MILICH, D. R.; MCLACHLAN, A. The nucleocapsid of hepatitis B virus is both a T-cell-independent and a T-cell-dependent antigen. *Science*, v. 234, p. 1398-401, 1986.

MOORE, K. L.; DALLEY, A. F. *Anatomia orientada para a clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2004

MOTTA, M. S. F., et al. Immunogenicity of hepatitis B vaccine in preterm and full term infants vaccinated within the first week of life. *Vaccine*, v. 20, p. 1557-1562, 2002.

MUKHERJEE, P. K.; DAS, A. K. Injection fibrosis in the quadriceps femoris muscle in children. *J. Bone Joint Surg.*, v. 62-A, p. 453-456, 1980.

_____.; MUKHOPADHYAY, P. Stiff knee following intramuscular injection into the thigh. *Indian Ped.*, p. 343-349, 1988.

NAPIONTEK, M.; RUSZKOWSKY, K. Paralytic drop foot and gluteal fibrosis after intramuscular injections. *J. Bone Joint Surg.*, v. 75, p. 83-85, 1993.

NI, Y. H., et al. Two decades of universal hepatitis B vaccination in taiwan: impact and implication for future strategies. *Gastroenterol.*, v. 132, p. 1287-93, 2007.

NICOLL, L. H.; HESBY, A. Intramuscular injection: an integrative research review and guideline for evidence-based practice. *Appl. Nurs, res.*, v. 16, p. 149-162, 2002.

NORDER, H., et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirol.*, v. 47, p. 289-309, 2004.

NURAINY, N., et al. Genetic study of hepatitis B virus in Indonesia reveals a new subgenotype of genotype B in east Nusa Tenggara. *Arch. Virol.*, v. 153, p. 1057-65, 2008.

OKAMOTO, H., et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J. Gen. Virol.*, v. 69, p. 2575-83, 1988.

OLIVEIRA, M. D. S., et al. Seroepidemiology of hepatitis B virus infection and high rate of response to hepatitis B virus Butang^R vaccine in adolescents from low income families in Central Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 101, p. 251-256, 2006.

PARANA, R.; ALMEIDA, D. HBV epidemiology in Latin America. *J. Clin. Virol.*, v. 34, Suppl 1, Dec, p. S130-3, 2005.

PASSOS, A. D. C., et al. Hepatitis B among female sex workers in Ribeirão Preto-São Paulo. *Rev. Bras. Epidemiol.*, v. 10, p. 517-524, 2007.

PETOUSIS-HARRIS, H. Vaccine injection technique and reactogenicity--evidence for practice. *Vaccine*, v. 26, p. 6299-6304, 2008.

PORTO, S. O., et al. Prevalence and risk factors for HBV infection among street youth in central Brazil. *J. Adolesc. Health*, v. 15, p. 577-81, 1994.

PUNGPAPONG, S.; KIM, W. R.; POTERUCHA, J. J. Natural history of hepatitis B virus infection: an update for clinicians. *Mayo Clin. Proc.*, v. 82, p. 967-75, 2007.

PURDY, M. A. Hepatitis B virus S gene escape mutants. *Asian J. Transf. Sci.*, v. 1, p. 62-70, 2007.

RIBEIRO, T. M.; AZEVEDO, R. S. Seroconversion of hepatitis B vaccine in infants related to the mothers's serostatus in a community of São José dos Campos, State of São Paulo, Brazil. *Clinics*, v. 61, p. 387-394, 2006.

RODGER, M. A.; KING, L. Drawing up and administering intramuscular injections: a review of the literature. *J. Adv. Nurs*, v. 31, p. 574-582, 2000.

ROSINI, N., et al. Seroprevalence of HbsAg, Anti-HBc and anti-HCV in Southern Brazil, 1999-2001. *Braz. J. Infect. Dis.*, v. 7, p. 262-7, 2003.

SADECK, L. S.; RAMOS, J. L. Immune response of preterm infants to hepatitis B vaccine administered within 24 hours after birth. *J. Pediatr.*, v. 80, p. 113-8, 2004.

SAMANDARI, T., et al. Differences in response to a hepatitis B vaccine booster dose among Alaskan children and adolescents vaccinated during infancy. *Pediatrics*, v. 120, p. 373-81, 2007.

SAPRU, A., et al. Immunogenicity and reactogenicity of two recombinant hepatitis B vaccines in small infants: a randomized, double-blind comparative study. *J. Trop. Pediatr.*, v. 53, p. 303-7, 2007.

SBP. *Novo calendário de vacinas da SBP*: Sociedade Brasileira de Pediatria, 2009.

SCHAEFER, S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J. Gastroenterol.*, v. 7, p. 14-21, 2007.

SERVOSS, J. C.; FRIEDMAN, L. S. Serologic and molecular diagnosis of hepatitis B virus. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, v. 20, p. 47-61, 2006.

SHEPARD, C. W., et al. Hepatitis B virus infection: epidemiology and vaccination. *Epidemiol. Rev.*, v. 28, p. 112-25, 2006.

SHIVANANDA, et al. Comparison of two hepatitis B vaccines (GeneVac-B and Engerix-B) in healthy infants in India. *Clin. Vaccine Immunol.*, v. 13, p. 661-4, 2006.

SILVA, C. O., et al. Seroprevalence of hepatitis B virus infection in individuals with clinical evidence of hepatitis in Goiania, Goias: Detection of viral DNA and determination of subtypes. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 44, p. 331-4, 2002.

SILVA, P. A., et al. Seroprevalence of hepatitis B virus infection and seroconversion to anti-HBsAg in laboratory staff in Goiania, Goias. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 38, p. 153-6, 2005.

SILVA, R. S. U., et al. Avaliação da pré-triagem sorológica para o marcador do vírus da hepatite B (anti- HBc) em candidatos à doação de sangue no Estado do Acre, 2002. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 39, p. 179-182, 2006.

SMALL, S. P. Preventing sciatic nerve injury from intramuscular injections: literature review. *J. Adv. Nurs*, v. 47, p. 287-96, 2004.

SOANES, N. Injection site safety. *Nurs Stand*, v. 14, p. 55, 2000.

SORRELL, M. F., et al. National Institutes of Health consensus development conference statement: management of hepatitis B. *Hepatology*, v. 49, p. S4-S12, 2009.

SOUMAH, M. T., et al. Quadriceps fibrosis following intramuscular injections into the thigh: apropos of 92 cases at Ignance Deen Central University hospital in Conakry. *Med. Trop.*, v. 63, p. 49-52, 2003.

STARK, K., et al. History of syringe sharing in prison and risk of hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus infection among injecting drug users in Berlin. *Int. J. Epidemiol.*, v. 26, p. 1359-66, 1997.

STROFFOLINI, T., et al. The impact of the hepatitis B mass immunisation campaign on the incidence and risk factors of acute hepatitis B in Italy. *J. Hepatol.*, v.33, p.980-5, 2000.

STUYVER, L., et al. New genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J. Gen. Virol.*, v. 81, p. 67-74, 2000.

TAVARES, R. S., et al. Infecção pelo vírus da hepatite B em hemofílicos em Goiás: soroprevalência, fatores de risco associados e resposta vacinal. *Rev. Bras. Hematol. Hemot.*, v. 26, p. 183-188, 2004.

TELES, S. A., et al. Hepatitis B virus transmission in Brazilian hemodialysis units: serological and molecular follow-up. *J. Med. Virol.*, v. 68, p. 41-9, 2002.

_____, et al. Hepatitis B virus: genotypes and subtypes in Brazilian hemodialysis patients. *Artif Organs*, v. 23, p. 1074-8, 1999.

TSEBE, K. V., et al. The first five years of universal hepatitis B vaccination in South Africa: evidence for elimination of HBsAg carriage in under 5-year-olds. *Vaccine*, v. 19, p. 3919-26, 2001.

VAN HERCK, K.; VAN DAMME, P. Benefits of early hepatitis B immunization programs for newborns and infants. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, v. 27, p. 861-869, 2008.

VELU, V., et al. Comparison of three different recombinant hepatitis B vaccines: GeneVac-B, Engerix B and Shanvac B in high risk infants born to HBsAg positive mothers in India. *World J. Gastroenterol.*, v. 13, p. 3084-9, 2007.

VILLENEUVE, J. P. The natural history of chronic hepatitis B virus infection. *J. Clin. Viro.*, v. 34, p. s139-s142, 2005.

WATSON, J. C.; PETER, G. General Immunization series. In: *Vaccines*. W.B. Saunders Company: 1999, 1229 p.

WHITTLE, H., et al. Observational study of vaccine efficacy 14 years after trial of hepatitis B vaccination in Gambian children. *BMJ*, v. 325, p. 569, 2002.

WISEMAN, E., et al. Perinatal transmission of hepatitis B virus: an Australian experience. *Med. J. Aust.*, v. 190, p. 489-92, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Department of Vaccines and Biologicals. *Introduction of hepatitis B vaccine into childhood immunization services*. Geneva, 2001a, 2001.

_____. *Introduction of hepatitis B vaccine into childhood immunization services.* Geneva, 2001b, 2001, 55 p.

_____. *Immunization surveillance, assessment and monitoring.* Geneva, 2007

YANG, Y. J., et al. Role of hepatitis B immunoglobulin in infants born to hepatitis B e antigen-negative carrier mothers in Taiwan. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, v. 22, p. 584-8, 2003.

YIM, H. J.; LOK, A. S. F. Natural History of chronic hepatitis B virus infection: What we knew in 1981 and what we know in 2005. *Hepatology*, p. s173-s181, 2006.

YU, A. S.; CHEUNG, R. C.; KEEFFE, E. B. Hepatitis B vaccines. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, v. 20, p. 27-45, 2006.

ZANETTI, A. R.; VAN DAMME, P.; SHOUVAL, D. The global impact of vaccination against hepatitis B: a historical overview. *Vaccine*, v. 26, p. 6266-73, 2008.

ZUCKERMAN, J. N. The importance of injecting vaccines into muscle. Different patients need different needle sizes. *BMJ*, v. 321, p. 1237-8, 2000.