
Relazione Epidemiologica e Molecolare Tra la Produzione di vaccini e la Prevalenza dei Disturbi dello Spettro Autistico

Theresa A. Deisher, Ph.D.;* Ngoc V. Doan, B.S.;**
Kumiko Koyama, B.S.;*** Sarah Bwabye, B.S.****

ABSTRACT

Obiettivo: Valutare le conseguenze sulla salute pubblica dei vaccini prodotti con linee cellulari fetali che contengono frammenti residuali di DNA umano fetale utilizzando approcci di laboratorio ed ecologici tra cui statistiche, biologia molecolare e genomica.

* Presidente e Scienziato Principale. La Dr. Deisher ha concettualizzato e progettato lo studio, supervisionato tutti i dati raccolti e i risultati, fatto la bozza del manoscritto iniziale, revisionato e approvato il manoscritto finale così come presentato.

Affiliazioni: ¹Sound Choice Pharmaceutical Institute, 1749 Dexter Ave N, Seattle, WA 98109. Indirizzo per la corrispondenza a: Theresa Deisher, tdeisher@soundchoice.org, 206-906-9922, 1749 Dexter Ave N, Seattle, WA 98109.

Statuto Etico: tutti i dati utilizzati in questo manoscritto derivano da file di dati pubblici e pertanto sono esenti dalla approvazione IRB in accordo con le linee guida delle raccomandazioni del Comitato consultivo nazionale sulla protezione dei soggetti umani (NHRC) relative ai file di dati ad uso pubblico approvate durante la riunione della commissione il 28-29 gennaio 2002 (<http://www.hhs.gov/ohrp/archive/nhrpac/documents/dataltr.pdf>): “Responsabilità degli utenti di file di dati di utilizzo pubblico: gli Utenti di file di dati ad uso pubblico non hanno bisogno di ottenere l’approvazione IRB per l’utilizzo di tali dati o cercare una garanzia che l’utilizzo dei file di dati pubblici incontri i criteri sull’esonazione da una revisione da parte dell’IRB”.

Dichiarazione di trasparenza: L’autore principale afferma che questo manoscritto è una relazione/resoconto onesta, accurata e trasparente dello studio segnalato; che non sono stati omessi aspetti importanti dello studio; e che qualsiasi discrepanza dallo studio come pianificato è stata spiegata .

Tutti gli autori, esterni ed interni, hanno avuto pieno accesso a tutti i dati dello studio (inclusi i rapporti statistici e le tabelle) e possono assumersi la responsabilità per l’integrità dei dati e l’accuratezza dell’analisi dei dati.

Fonti di Finanziamento: Lo studio è stato finanziato da M.J. Murdock Charitable Trust e da donazioni private.

** Ricerca associata. La signora Doan ha raccolto e analizzato i dati; ha gestito strumenti di analisi dei dati, rivisto il manoscritto e approvato il manoscritto finale come presentato.

*** Ricerca associata. La signora Koyama ha coordinato e progettato l'esperimento, rivisto il manoscritto e ha approvato il manoscritto finale come presentato.

**** Ricerca associata. La signora Beabye ha assistito nel collezionamento e revisione dei dati e approvato il manoscritto finale come presentato.

Metodo: I dati sulla copertura per il trivalente MMR e la prevalenza dei disturbi autistici o disturbi dello spettro autistico per Norvegia, Svezia e Regno Unito sono stati ottenuti da siti governativi e pubblici così come da articoli revisionati pubblicati.

Biologicamente, sono state misurate e quantificate, attraverso elettroforesi su gel, microscopia fluorescente e fluorimetria, la grandezza e la quantità di DNA fetale contaminante in Meruvax II® e Havrix® come anche la tendenza di svariate linee cellulari all'assorbimento cellulare e nucleare di frammenti di DNA umano primitivo. Infine, l'analisi genomica ha identificato i siti specifici in cui è più probabile che si verifichi l'integrazione di frammenti di DNA fetale nel genoma di un bambino.

Risultati: La copertura media di MMR per i tre paesi è caduta sotto il 90% dopo la famigerata pubblicazione nel 1998 del Dr. Wakefield ma ha iniziato a recuperare lentamente dopo il 2001 fino a raggiungere oltre il 90% di copertura entro il 2004. Durante lo stesso periodo, la prevalenza media dei disturbi da spettro autistico nel Regno Unito, Norvegia e Svezia sono diminuiti sostanzialmente negli anni di nascita 1998 ed è gradualmente aumentata di nuovo per gli anni di nascita dopo il 2000. La quantità media di DNA a singolo filamento e di DNA a doppio filamento in Meruvax ®II era rispettivamente di 142.05 ng/vial e 35.00 ng/vial, e in Havrix® era rispettivamente di 276.00 ng/vial e 35.74 ng/vial. La grandezza dei frammenti di DNA fetale in Meruvax®II era approssimativamente di 215 coppie di basi. Si è registrato uno spontaneo assorbimento cellulare e nucleare di DNA all'interno delle cellule HFF1 E NCCIT. I geni che sono stati correlati con l'autismo (geni associati all'autismo; AAGs) presentano una suscettibilità più mirata verso insulti alla stabilità genomica rispetto al gruppo di tutti i geni contenuti nel genoma umano. Tra gli AAGs del cromosoma X, 15 su 19 hanno sequenze di rottura del doppio filamento a una distanza inferiore a 100 kilobasi dal centro dell'hotspot della ricombinazione meiotica situato all'interno dell'esone.

Conclusioni: I vaccini prodotti in linee fetali umane contengono livelli inaccettabilmente alti di contaminanti a base di frammenti di DNA fetale. Il genoma umano contiene in modo naturale regioni che sono sensibili alla formazione di rotture del doppio filamento e a mutagenesi inserzionale di DNA. La "Paura di Wakefield" ha creato un esperimento naturale che può dimostrare la relazione causale tra vaccini prodotti in linee cellulari fetali e la prevalenza di ASD.

Un'epidemia mondiale di autismo è abbondantemente accertata considerando il numero di articoli revisionati sull'argomento, tra cui le osservazioni provenienti da numerose istituzioni riguardo il fatto che le inserzioni genetiche de novo e le mutazioni sono smisurate nei bambini con autismo.¹ Il disturbo Autistico (AD), un sottogruppo dei Disturbi dello Spettro Autistico (ASD), è un disordine neurologico e dello sviluppo i cui sintomi appaiono

solitamente nei primi tre anni di vita.² L'epidemia di autismo crea ovviamente degli oneri a carico della salute pubblica e richiede una valutazione critica dei fattori ambientali che possano scatenare questa epidemia. Una precedente pubblicazione del nostro gruppo si è focalizzata sui trascurati e universalmente adottati fattori ambientali, compresi i contaminanti fetali umani e retrovirali presenti nei vaccini infantili, l'età genitoriale avanzata e i cambiamenti nei criteri diagnostici. Come richiesto dall'Agenzia degli Stati Uniti per la Protezione Ambientale, la scoperta di potenziali fattori ambientali scatenanti l'autismo richiede una valutazione statistica per identificare gli anni di nascita come punti di svolta per la prevalenza del disturbo dello spettro autistico. Appropriati algoritmi iterativi hanno identificato gli anni 1980.8, 1988.4 e 1996.5 come anni di "punto di svolta" per quanto riguarda la prevalenza di AD negli Stati Uniti, a conferma di un rapporto da parte dell'Agenzia di Protezione Ambientale (EPA) che ha identificato un punto di svolta a livello mondiale nel 1988.⁴ In più, i punti di svolta per anno di nascita del AD per il Regno Unito, l'Australia Occidentale e la Danimarca sono stati calcolati essere il 1987, 1990.4, e 1987.5, rispettivamente³. Questi punti di svolta per AD statisticamente calcolati non corrispondono ai punti di cambiamento che sarebbero stati previsti sulla base delle programmazioni di ristampa delle revisioni del Manuale di Diagnosi e Statistica (DSM) e quindi le revisioni del DSM non possono costituire il principale fattore scatenante ambientale o sociologico responsabile dell'attuale prevalenza di AD. L'età genitoriale avanzata è attualmente la spiegazione favorita dell'epidemia mondiale di autismo. Tuttavia, l'analisi di regressione lineare per i dati di Stati Uniti e Australia Occidentale non ha rilevato alcuna relazione tra età genitoriale e AD per alcun specifico anno di nascita³.

Nel Regno Unito e in alcuni paesi Scandinavi va osservato che c'è stato un significativo declino nella copertura immunitaria per MMR durante degli anni ben delimitati, ipoteticamente scatenato dalla paura dopo la pubblicazione nel 1998 di Andrew Wakefield che aveva sostenuto che l'immunizzazione per MMR e la regressione autistica fossero collegati, ma ovviamente non a causa di una mancata segnalazione delle vaccinazioni.⁶⁻⁸ Da quando abbiamo rilevato una relazione tra MMR e prevalenza di AD/ADS nei nostri studi precedenti, l'osservazione che la copertura di MMR era scesa acutamente nel Regno Unito e nei paesi Scandinavi durante degli anni delimitati solleva la questione se la copertura di MMR abbia avuto un impatto sulla prevalenza di AD/ADS in questi paesi nello stesso periodo di tempo.

L'utilizzo di linee cellulari fetali umane per produrre vaccini per l'infanzia lascia nei prodotti finali dei vaccini che noi iniettiamo nei nostri bambini dei residui di DNA umano come anche dei frammenti di retrovirus endogeno umano (HERVK). Le cellule mammifere assorbono frammenti di DNA extracellulare della stessa specie attraverso endocitosi recettore-mediata. La captazione è più efficiente a basse concentrazioni di DNA extracellulare⁹ e ha il picco 2 ore dopo l'aggiunta di frammenti di DNA alla cultura cellulare.¹⁰ Nell'intervallo di concentrazione extracellulare di 0,1 a 7 μ M, gli oligonucleotidi (piccoli frammenti di acidi nucleici) entrano facilmente nelle cellule in coltura attraverso l'assorbimento mediato dai recettori,¹¹⁻¹³ raggiungendo concentrazioni intracellulari e nucleari^{11,14-16} che eguagliano o superano quelle del mezzo extracellulare entro 2-4 ore.¹⁷ Esperimenti empirici hanno dimostrato che l'aggiunta di frammenti di DNA placentare della lunghezza di 500 coppie di basi aveva contribuito all'incirca al 4% del contenuto genomico di una cellula per ora di incubazione, che circa il 40-50% del DNA frammentato aggiunto alla coltura cellulare sarà prelevato da una cellula e il 10-20% del DNA aggiunto sarà

portato nel nucleo, dimostrando la rapidità con cui il DNA può entrare in una cellula.^{9,18} L'attuale guida della FDA dice che il livello di DNA residuo del substrato cellulare dovrebbe essere inferiore ai 10ng per dose di vaccino con una mediana nella dimensione del DNA di 200 coppie di basi o inferiore.¹⁹

Le analisi genetiche nei casi di ASD su base individuale hanno identificato centinaia di differenti mutazioni de novo, delezioni e duplicazioni presenti dal 48,4% al 63% dei casi di autismo nei quali solo un bambino in una famiglia risultava affetto, chiamato ASD simplex.²⁰ I dati genomici analizzati nella maggioranza delle pubblicazioni su questo tema derivano dal Simplex Collection di Simon (SSC) in cui rientrano il 73% degli esomi. Pertanto, estrapolando dalla percentuale riportata di bambini con mutazioni dannose, da 66% fino a 86% di ASD simplex dovrebbe avere una mutazione de novo se fosse sequenziato l'intero esoma. Poiché l'85% delle mutazioni che causano la malattia si verificano nell'esoma e il 15% sono state trovate nelle regioni regolatorie, possiamo quindi stimare che anche le regioni regolatorie siano state sequenziate e che dal 76% fino al 90% dei bambini affetti da ASD simplex avrebbero mutazioni deleterie de novo.²¹ I bambini non affetti e quelli con ASD multiplex, cioè la forma che colpisce più bambini nella stessa famiglia, presentano mutazioni de novo in modo nettamente inferiore e tuttavia la maggioranza dei bambini con ASD sono simplex (dal 75% al 90%),^{22,23} dimostrando il ruolo critico delle mutazioni genetiche de novo nell'epidemia mondiale di autismo. In altre parole, la suscettibilità per l'autismo nei casi simplex origina da una fonte de novo, indicando l'impatto ambientale come componente principale dell'ASD, piuttosto che l'ereditarietà.²⁴ Infatti, pubblicazioni recenti hanno mostrato che molte malattie umane oltre al ASD sono associate a traslocazioni cromosomiali de novo, delezioni delle dimensioni di megabasi, inserzioni di DNA, e duplicazioni.²⁴ Sebbene l'ASD sia altamente eterogeneo in termini di geni e mutazioni, è stato dimostrato che i geni affetti interagiscono con alcuni reti biologiche critiche, spiegando così il genotipo comune dell'ASD nonostante mutazioni differenti.^{20,25} Una domanda ancora più cruciale da farsi è: "Cosa causa l'aumento di queste centinaia di differenti mutazioni de novo?"

Durante la meiosi avviene uno scambio di materiale genomico tra i cromosomi materni e paterni, un processo chiamato ricombinazione meiotica (MR). Gli Hotspot sono siti nel genoma di differenti lunghezze dove più frequentemente avviene la MR. Questo processo crea la diversità genetica nella nostra prole, ed è utile in tal senso. Il genoma umano contiene più di 25000 hotspot di ricombinazione noti.²⁶ Curiosamente, è stato dimostrato che le regioni del genoma dove è avvenuta la ricombinazione meiotica (gli hotspots) sono altamente predisposti a successive rotture del doppio filamento delle cellule somatiche (DSB) e a mutazioni che causano malattie,²⁷⁻²⁹ incluse variazioni di singolo nucleotide, variazione del numero di copie, eventi di delezione del gene e inserimento / integrazione di DNA estraneo durante la riparazione del DSB.^{30,31} Le malattie note per essere influenzate da delezioni o inserzioni genomiche sono il cancro, la neuropatia ereditaria,³² le sindromi mitocondriali,²⁶ l'ittiosi,^{26,33} la sindrome da rotture cromosomiche tipo Nijmegen (NBS),³⁴ i disturbi dello spettro autistico,^{24,35} la schizofrenia³⁶ e altre. In questo studio ci siamo chiesti se gli hotspot della MR che predispongono a successive mutazioni somatiche siano correlati alle mutazioni genetiche che sono state collegate al ASD.

Questo studio valuta le conseguenze sulla salute pubblica dei vaccini contaminati con frammenti di DNA fetale umano residuo utilizzando approcci di laboratorio ed ecologici, tra cui la statistica, la biologia molecolare e la genomica. Utilizzando dati disponibili da siti

pubblici e governativi, abbiamo tracciato la copertura per MMR e la prevalenza di AD/ADS in Norvegia, Svezia e Regno Unito al fine di determinare se le riduzioni della compliance per MMR®II riportate durante il 1999-2002, dopo la “Paura di Wakefield” abbiano avuto un impatto sull’incidenza di AD/ASD nei bambini nati durante quegli anni. Riportiamo qui anche le dimensioni e le quantità del DNA fetale contaminante in Meruvax®II e Havrix® e la predisposizione di numerose linee cellulari all’assorbimento cellulare e nucleare di frammenti primitivi di DNA umano simili per dimensioni e qualità ai frammenti di DNA fetale contenuti in Meruvax®II. Infine, la nostra analisi genomica ha identificato i siti specifici dove è più probabile che avvenga l’integrazione dei frammenti di DNA fetali all’interno del genoma del bambino. Questo studio è uno dei primi studi di laboratorio ed ecologici condotti ad aver esaminato la relazione tra i vaccini prodotti in linee cellulari fetali umane, i danni del DNA cellulare e l’epidemia mondiale di autismo.

Metodologia

Fonti di dati per i tassi di Disturbo dello Spettro Autistico e copertura MMR

La copertura nazionale con MMR in Norvegia è stata ottenuta dall’Istituto Norvegese di Sanità Pubblica ³⁷, per la Svezia dal National Board of Health and Welfare (Consiglio Nazionale per la Salute e il Benessere)³⁸ e per il Regno Unito dal Public Health England (Sanità Pubblica d’Inghilterra)³⁹, la copertura con vaccino MMR è stata tracciata come percentuale della massima copertura in ciascun paese.

I tassi di Disturbo dello Spettro Autistico per la Norvegia sono stati raccolti usando i dati di tre documenti: il primo era una pubblicazione del 2012 di Isaksen et al. ⁴⁰]; il secondo e il terzo erano entrambi articoli del 2012 e del 2013 di Suren et al. ^{41,42}. I dati della popolazione norvegese sono stati ottenuti dal sito ufficiale di Statistiska Centralbyran - Statistics Norway ⁴³]. In Svezia, il tasso di AD è stato ottenuto da uno studio pubblicato nel 2012 "La prevalenza dei disturbi dello spettro autistico nei bambini: uno studio su popolazione di bambini svedesi di 2 anni" di Nygren et al. ⁴⁴]. I dati sulla popolazione svedese sono stati ottenuti dal sito ufficiale di Statistiska Centralbyran - Statistics Sweden ⁴⁵]. Nel Regno Unito, il tasso di ASD è stato raccolto da due studi: il primo pubblicato da Lingam et al. (2003) ⁴⁶] e il secondo da Latif et al. (2007) ⁴⁷]. I dati sulla popolazione del Regno Unito sono stati ottenuti dal sito Web dell’Ufficio di Statistica Nazionale⁴⁸].

Quantificazione del DNA residuo nel Meruvax®II (vaccino contro la rosolia) e Havrix® (vaccino contro l’epatite A)

Il vaccino contro la rosolia a virus vivo Meruvax®II (Merck & Co. Inc) è stato sciolto in 30 µl di 1X Tris EDTA (TE, pH8) e incubato a 60° C per due ore per inattivare il virus vivo. Anche l’ Havrix® (GlaxoSmithKline Biologicals) in soluzione è stato inattivato a 60° C per due ore. In particolare, il virus con RNA a singolo filamento (ssRNA) nel Meruvax®II è incapsulato e il virus ssRNA nel Havrix® viene incapsulato dopo l’ingresso nell’ospite, ⁴⁹] quindi è estremamente improbabile che ci saranno livelli significativi di RNA virale a singolo filamento libero nei vaccini. Infatti, per rintracciare l’RNA del virus della rosolia da campioni orali che si sa essere positivi alla rosolia, l’RNA deve essere estratto dal virus incapsulato utilizzando i kit di estrazione dell’RNA virale di Qiagen, ^{50,51}] che richiede la lisi delle capsule in condizioni altamente denaturanti. Inoltre, anche se fosse presente un RNA

virale libero, la specificità del test di quantificazione del DNA PicoGreen® per il dsDNA è 9 volte maggiore di quello per l'ssDNA e 31 volte maggiore di quello per l'RNA.

È stato utilizzato Primer M13 (Life Technologies) per realizzare soluzioni standard con DNA a filamento singolo (ssDNA) e DNA umano (Paragon Dx, USA) è stato utilizzato per realizzare soluzioni standard con DNA a doppio filamento (dsDNA) per l'analisi fluorimetrica. È stato utilizzato Quant-iT™ OliGreen® (Life Technologies) per identificare il ssDNA e Quant-iT™ PicoGreen® (Life Technologies) è stato utilizzato per identificare il dsDNA. Il limite di rilevazione di PicoGreen® per il dsDNA è di 100 pg/ml. Le diluizioni seriali OliGreen® della soluzione standard di DNA sono state ottenute miscelando con Quant-iT™ OliGreen® o Quant-iT™ PicoGreen® per concentrazioni finali di 0,1 ng/ml, 0,5 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml e 100 ng/ml. 200 µl di ciascuna soluzione di diluizione seriale sono stati pipettati in una piastra a 96 pozzetti. I vaccini sono stati diluiti di 1, 2, 10 e 100 volte in miscele di 1X TE con Quant-iT™ OliGreen® o Quant-iT™ PicoGreen® e 200 µl pipettati in piastre da 96 pozzetti. L'intensità della fluorescenza è stata analizzata utilizzando il lettore di micropiastre Gemini EM (dispositivo molecolare). Il contenuto di DNA in ciascun vaccino è stato calcolato in base alle curve standard.

Caratterizzazione della dimensione del frammento di DNA residuale nel Meruvax®II e Havrix® mediante elettroforesi su gel

5 ng di DNA residuale umano da ciascun vaccino, quantificato in precedenza, sono stati miscelati con colorante (Lonza) e 1X TE in volume totale inferiore a 40 µl. Campioni di DNA residuale fetale umano e soluzione ladder di DNA (20 coppie di basi Extended Range DNA Ladder (Lonza) in colorante e 1X TE per una concentrazione finale di 200 ng/µl in un volume totale di 15 µl) sono stati caricati su gel di agarosio al 4% e trattato il gel a 210 V per 4 ore. Dopo l'elettroforesi, il gel è stato incubato con soluzione colorante SYBR Gold diluita di 1:10.000 con 1X TE durante la notte a 4° C. Le bande di DNA sono state riprese sotto l'esposizione alla luce UV.

Il DNA fetale residuo di Havrix® non è migrato dal pozzetto, neanche dopo un'ora di trattamento a 50° C con proteinasi K, dimostrando che i frammenti di DNA fetale in Havrix® sono almeno superiori a 1000 paia di basi di lunghezza. Un ulteriore confronto dei frammenti di DNA fetale di Havrix® con DNA di fago lambda indica che i frammenti di DNA fetale sono persino maggiori di 48.502 coppie di basi di lunghezza.

Assorbimento del DNA e incorporazione nel genoma ospite in varie linee cellulari.

Il DNA Cot1 umano (Invitrogen) è stato marcato usando il kit di marcatura CyTM3 di Mirus Label (Mirus) e conservato a - 20° C fino al suo utilizzo. Il DNA Cot1 è stato utilizzato per rilevare l'assorbimento di frammenti di DNA cellulare e nucleare perché la dimensione del frammento del prodotto DNA Cot1 umano Invitrogen è simile alla dimensione del frammento di DNA fetale trovato nel Meruvax®II, e perché come linea cellulare cancerogena è tornato epigeneticamente verso le cellule di tipo fetale primitivo indifferenziato ⁵²].

Le cellule U937 (linfoma istocitico) sono state coltivate nel terreno di coltura Eagle Modificato di Dulbecco (DMEM) integrato con il 15% di siero bovino fetale (FBS) e 1% di soluzione antibiotico-antimicotica a 37° C in atmosfera umidificata contenente il 5% CO2/95% di aria.

Le cellule HL-60 (mieloblasto) sono state coltivate in Terreno Iscove Modificato Dulbecco (IMDM) con aggiunta di 20% di FBS e 1% di soluzione antibiotico-antimicotica a 37° C nelle stesse condizioni. Le cellule NCCIT (teratocarcinoma) debolmente aderenti sono state coltivate in RPMI-1640 supplementato con il 10% di FBS e l'1% di soluzione antibiotico-antimicotica con una densità cellulare di 3×10^4 per pozzetto di una piastra da 24 pozzetti in ciascuno dei quali è stato collocato un vetrino di copertura trattato con coltura tissutale a 37° C in atmosfera umidificata contenente il 5% di CO₂/95% di aria. Cellule di Fibroblasti di Prepuzio Umano 1 (HFF1) sono state coltivate in terreno DMEM supplementato con 15% di siero bovino fetale (FBS) e 1% di soluzione antibiotico-antimicotica. Le cellule BE (2)-C (neuroblastoma) sono state coltivate in una miscela 1:1 di Terreno minimo essenziale di Eagle (EMEM) e terreno F12 supplementato con 10% di FBS e 1% di soluzione antibiotico-antimicotica. Anche M059K (Glioblastoma-Doppio filamento riparatore competente) e M059J (Glioblastoma-Doppio filamento riparatore deficiente) sono stati coltivati in una miscela 1:1 di terreno DMEM e Ham's F12 integrata con 10% di FBS, 0,05 mM amminoacidi non essenziali, e 1% di soluzione antibiotico-antimicotica.

Dopo che le cellule sono state coltivate in ciascuna condizione per 2-3 giorni, 500-750 ng di DNA Cot1 umano marcato con Cy3 sono stati aggiunti ogni $1,0 \times 10^7$ cellule e incubati a 37° C in atmosfera umidificata contenente il 5% di CO₂/95% di aria agitando delicatamente da 24 a 48 ore. I nuclei sono stati quindi colorati con la colorazione Hoechst, i vetrini di copertura tedeschi sono stati collocati sui vetrini e l'assorbimento del DNA cellulare e nucleare è stato analizzato mediante microscopia a fluorescenza.

Per le cellule U937 e NCCIT, il DNA genomico è stato purificato mediante precipitazione di etanolo che elimina gli acidi nucleici a frammento breve incluso il DNA Cot1 umano marcato con Cy3 non incorporato. Le relative unità fluorescenti (RFU) del DNA Cot1 umano marcato con Cy3 incorporato nei cromosomi di U937 o NCCIT sono state misurate utilizzando il lettore di micropiastre Gemini EM e la quantità di DNA Cot1 umano incorporato è stata calcolata sulla base della curva standard del DNA Cot1 umano marcato con Cy3.

Per simulare l'infiammazione, tutte le linee cellulari aderenti sono state attivate con lipopolisaccaride (LPS) a 1, 10 e 100 ng per 10⁴ cellule per 24-48 ore in presenza di frammenti di DNA Cot1 marcati con Cy3. I nuclei sono stati colorati con la colorazione Hoechst e quindi l'assorbimento cellulare e nucleare del DNA è stato determinato mediante microscopia a fluorescenza. Inoltre, l'assorbimento del DNA da parte delle cellule HFF1 è stato determinato anche dopo permeabilizzazione con saponina. Le cellule HFF1 sono state incubate in saponina allo 0,02%, 300 ng/ml di DAPI e 500 ng di DNA Cot1 umano marcato con Cy3 per 24, 48 e 72 ore.

Raccolta di dati genomici

Tutti i geni associati all'autismo (AAG) attualmente pubblicati sono stati raccolti in un singolo file combinando i database AutDB e ACGMap.^{53,54} Le sequenze di nucleotidi genomici umani sono state raccolte interamente per cromosoma dal sito FTP di UCSC e le posizioni degli esoni per ogni gene sono stati ottenuti dalla tavola dei genomi del browser UCSC⁵⁵. Le posizioni hotspot di ricombinazione meiotica sono state recuperate dall'International HapMap Project⁵⁶ e le loro coordinate sono state modificate dalla build 35 alla build 37 con lo strumento UCSC LiftOver (<https://genome.ucsc.edu/cgi->

[bin/hgLiftOver](#)). È stato scritto un algoritmo per generare tutte le 1024 sequenze 13-mer specifiche vincolate e i loro complementi inversi.

Determinazione dello schema e delle posizioni hotspot

Lo strumento BLAST indipendente di NCBI, versione 2.2.24, è stato utilizzato per individuare le posizioni di tutte le sequenze di hotspot di 13-mer vincolati e dei loro complementi inversi su ciascun cromosoma. Sono stati scritti programmi multipli di sovrapposizione per abbinare le posizioni dei 13-mer dal BLAST con le posizioni degli hotspot MR su tutti i geni e sul sottoinsieme degli AAG sia a livello cromosomico che dell'esone specifico. Questi sono stati ulteriormente utilizzati per abbinare le posizioni di hotspot e poi le posizioni dei 13-mer separatamente all'interno di tutti i geni e all'interno del sottoinsieme degli AAG.

Risultati

Rapporto tra copertura MMR e prevalenza di autismo nel Regno Unito, Norvegia e Svezia dopo la "Paura (Allarme) di Wakefield"

La copertura di MMR media per i tre paesi è scesa al di sotto del 90% dopo la pubblicazione di Wakefield nel 1998 ma ha iniziato a risalire lentamente dopo il 2001 fino a raggiungere nuovamente una copertura sopra il 90% nel 2004. La copertura di MMR è indicata per anno di nascita, non per anno di vaccinazione, spiegando perché le diminuzioni di copertura per anno di nascita precedono la pubblicazione di Wakefield poiché i bambini ricevevano in genere la vaccinazione MMR tra i 12 mesi e i 3 anni di età. Durante lo stesso periodo di tempo, la prevalenza media del disturbo autistico nel Regno Unito, Norvegia e Svezia è diminuita sostanzialmente per l'anno di nascita 1998 e gradualmente riaumentata dopo l'anno di nascita, 2000. Entro il 2007, la prevalenza di ASD era doppia rispetto alla prevalenza nel 1998 (Fig. 1). La prevalenza dell'autismo e i dati sulla copertura MMR sono mostrati nella Tabella 1 e 2. Mentre i dati sulla prevalenza dell'autismo disponibili pubblicamente per questi tre paesi sono deludentemente scarsi per questo periodo di tempo, l'apparente relazione causa-effetto richiede ulteriori studi e indagini.

Quantificazione del DNA residuale del feto umano e dimensione del frammento nel Meruvax®II e nell'Havrix®

Mediamente il ssDNA e il dsDNA nel Meruvax®II erano rispettivamente di 142,05 ng/flacone e 35,00 ng/flacone e rispettivamente 276,00 ng/flacone e 35,74 ng/flacone nell'Havrix® (Tabella 3). Queste quantità sono significativamente più elevate del limite di DNA residuale < 10 ng/dose indicato nella Guida per l'Industria della FDA ¹⁹. La dimensione dei frammenti di DNA fetale nel Meruvax® II era di circa 215 coppie di basi mediante elettroforesi (Figura 2A). Il DNA nell' Havrix® non è migrato attraverso il gel e si è mantenuto nel pozzetto originale, anche se eseguito con DNA di fago lambda che indica che i frammenti di DNA fetale sono probabilmente più lunghi di 48.000 coppie di basi (Figura 2B).

Assorbimento del DNA umano e incorporazione in varie linee cellulari

L'assorbimento spontaneo cellulare e nucleare di DNA era evidente nell'HFF1 (Figura 3), nel NCCIT (Figura 5) e nel U937 (Figura 9 e Figura 10). Al contrario, l'assorbimento

spontaneo del Cy3 non era evidente nelle cellule HL-60. L'assorbimento del DNA nel BE (2)-C e M059K non era misurabile a causa dell'elevata autofluorescenza di queste cellule (dati non mostrati). L'assorbimento cellulare di DNA stimolato da LPS è stato osservato nell'HFF1 (Fig. 4), NCCIT (Fig. 6) e M059J (Fig. 7 e 8). L'assorbimento cellulare spontaneo e infiammatorio-potenziato di DNA è definito dalla quantificazione dell'entità dell'incorporazione genomica effettiva dei frammenti di DNA internalizzati.

La quantità di incorporazione di DNA Cot1 umano marcato con Cy3 nel DNA genomico U937 era $0,0111 \pm 0,0034$ pg (n = 12) per cellula entro 24 ore, circa lo 0,167% del DNA genomico U937 totale per cellula. L'incorporazione del DNA nelle cellule NCCIT era di 0,0026 pg/cellula dopo 24 ore e 0,04 pg/cellula dopo 48 ore, un tasso di incorporazione dello 0,6% del DNA genomico totale di NCCIT (Tabella 4).

Indicazioni delle specifiche di rottura del doppio filamento nell'intero genoma

La mappatura genomica degli hotspot MR ha portato all'identificazione di schemi di sequenza del DNA che sono sovrarappresentati negli hotspot, incluso una sequenza degenerata 13-mer ²⁹]. Abbiamo trovato 280.000 occorrenze dello schema di hotspot di DNA degenerato 13-mer identificato nel genoma umano, e di questi, le sequenze vincolate più abbondanti erano CCACCTTGGCCTC e il suo complemento inverso GAGCCAAGGTGG. Entrambi avevano tassi di ricombinazione entro i 30 più alti di tutti i possibili 2048 13-mer vincolati. Questa sequenza di hotspot di 13-mer è stata associata al 41% degli hotspot MR e agli hotspot di ricombinazione omologa non allelica che provocano patologia e comuni hotspot di soppressione mitocondriale ²⁹].

Per ragioni non chiare in questo momento, gli hotspot sono concentrati nel sottogruppo di geni associati all'autismo (AAG) e gli AAG hanno anche alcuni dei più alti tassi di ricombinazione meiotica, in confronto all'insieme di tutti i geni del genoma umano. Rispetto a tutti i geni, un numero maggiore di AAG contiene hotspot MR, gli AAG contengono più Hotspot MR per gene, e lo schema dell'hotspot del MR 13-mer degenerato è prevalente negli hotspot di AAG rispetto ad altri geni. Mentre il sottogruppo di AAG rispetto a tutti i geni del genoma umano ha una quantità simile di 13-mer degenerati per gene, i 13-mer si trovano in modo schiacciante più all'interno degli hotspot MR nel sottoinsieme degli AAG rispetto a tutti i geni. Nello specifico, una percentuale maggiore di AAG contiene hotspot e gli AAG hanno più hotspot per gene, rispetto a tutti i geni del genoma umano (Tabella 5 e 6). In sintesi, gli AAG hanno una suscettibilità più concentrata agli attacchi alla stabilità genomica rispetto al gruppo di tutti i geni contenuti nel genoma umano. Questi risultati supportano ulteriormente un'associazione di malattie tra MR, schemi specifici di hotspot di 13-mer vincolati e ASD.

Di particolare rilevanza per la tendenza di genere maschile di ASD è l'analisi delle indicazioni delle specifiche di rottura del doppio filamento sul cromosoma X. Ci sono 19 geni associati all'autismo sul cromosoma X che contengono hotspot di ricombinazione all'interno delle regioni trascritte. Come illustrato nella Tabella 7, 15 di questi geni del cromosoma X presentano schemi di 13-mer a meno di 100 kilobasi lontano dal centro dell'hotspot situato all'interno di un esone. Ciò suggerisce che questi particolari geni del cromosoma X possono essere particolarmente suscettibili alle rotture del doppio filamento, alla mutagenesi del DNA inserzionale e alla malattia sintomatica perché 13-mer associati alla malattia sono stati trovati vicino al centro di un hotspot contenuto in un esone ²⁹].

Discussione

I vaccini e la loro sicurezza sono temi cruciali per il pubblico in generale, e in particolare per gli operatori del sistema sanitario ai quali è chiesto in genere di essere pienamente conformi ad essi, così come per i genitori che devono prendere decisioni informate circa le vaccinazioni dei loro figli.

La derivazione, la coltura o la produzione di vaccini che utilizzano tessuto fetale umano abortito elettivamente pone dilemmi etici e filosofici. Inoltre, l'uso di linee cellulari fetali umane per la produzione di vaccini crea prodotti finali che contengono residui di DNA fetale, inclusi detriti cellulari e frammenti di DNA fetale. Ciò pone ulteriori dilemmi etici e filosofici poiché questi contaminanti verranno iniettati nel ricevente del vaccino insieme all'antigene del virus. E infine, il pubblico non è stato informato della produzione di vaccini di linea cellulare fetale, introdotta per la prima volta negli Stati Uniti nel 1979, ostacolando qualsiasi argomentazione pubblica riguardante le questioni etiche e filosofiche associate a questo cambiamento di produzione.

Oltre ai detriti cellulari fetali e ai frammenti di DNA fetale, i vaccini che sono stati coltivati o prodotti utilizzando la linea cellulare fetale WI-38 come Meruvax II, MMR II e Varivax sono contaminati da frammenti di retrovirus umano endogeno HERVK⁵⁷. Recenti prove hanno dimostrato che i trascritti retrovirali endogeni umani sono elevati nel cervello di pazienti con schizofrenia o disturbo bipolare^{58,59}, nei leucociti mononucleati del sangue periferico di pazienti con spettro autistico⁶⁰ e associati a diverse malattie autoimmuni^{61, 63}. Le conseguenze sulla salute pubblica dei residui di frammenti di DNA fetale umano e dei contaminanti retrovirali HERVK non sono mai state adeguatamente studiate. In precedenza abbiamo riportato una correlazione ecologica tra l'introduzione di vaccini fetali e il disturbo autistico, il primo studio a considerare le conseguenze sulla salute pubblica dei vaccini prodotti su linee cellulari fetali umane³.

In questo articolo abbiamo esaminato le conseguenze molecolari e genomiche del frammento di DNA fetale contenente vaccini e, cosa più importante, abbiamo presentato ulteriori dati ecologici che indicano un potenziale nesso causale tra vaccini fabbricati da feti e l'epidemia mondiale di autismo³]. Dopo che lo studio di Andrew Wakefield è stato pubblicato sulla prestigiosa rivista *The Lancet* nel 1998, suggerendo che MMR II, un vaccino prodotto da feto umano, potesse essere associato ad anomalie dell'intestino nei bambini autistici, il dibattito noto come "Wakefield Scare" si diffuse rapidamente attraverso il Regno Unito e Punti di informazione scandinavi, portando alcuni genitori a scegliere di non vaccinare i propri bambini con il vaccino MMR. Il primo paese colpito dal "Wakefield Scare" è stato il Regno Unito secondo un documento di Nagaraj del 2006⁸], che ha dichiarato che "l'utilizzo ha iniziato a calare quando è stato pubblicato lo studio controverso che collega il vaccino MMR all'autismo" portando a un livello molto basso di copertura vaccinale MMR fino al 50% in alcune aree, creando una seria minaccia di epidemie di morbillo. In Svezia, un calo della copertura MMR nei bambini nati dopo il 1999 è stato riportato da Dannetun et al. (2004)⁶] perché "nel 1999 e nel 2000 in Svezia si diffuse una discussione pubblica sugli eventi avversi legati al vaccino contro il morbillo".

Nel 2002 e 2003, Trogstad et al. hanno riportato un calo simile nell'uso del vaccino MMR in Norvegia (2012)⁷]. Simile alla riduzione in Svezia, Trogstad et al. (2012) hanno affermato che "questa caduta coincide con il dibattito che seguì le false affermazioni sul legame tra vaccino MMR e autismo proposto da Wakefield et al.". In questa pubblicazione illustriamo il brusco calo della copertura media MMR nel Regno Unito, in Norvegia e

Svezia dopo la pubblicazione di Wakefield e una altrettanto brusca ripresa dopo il 2001, quando Wakefield fu pubblicamente screditato.

La brusca caduta e il recupero della compliance MMR offrono un'opportunità unica per indagare su qualsiasi relazione causale tra l'MMR prodotto fetale, che è stato introdotto nel Regno Unito, Norvegia e Svezia rispettivamente nel 1988, 1983 e 1982 e prevalenza di ASD (Disturbi dello Spettro Autistico). Al fine di dimostrare causa ed effetto, o una relazione causale, piuttosto che una correlazione: 1) la causa deve verificarsi prima dell'effetto 2) la rimozione della causa deve comportare la rimozione dell'effetto, e 3) la reintroduzione della causa deve reintrodurre l'effetto. Il brusco calo e la ripresa della copertura MMR fornisce un esperimento naturale nel mondo reale per esaminare l'uso del vaccino fabbricato per via fetale e la prevalenza di ASD. Durante il periodo di sospensione e recupero della vaccinazione MMR, la prevalenza di ASD ha mostrato un calo dopo le nascite del 1998, seguito da una ripresa iniziata con i bambini nati negli anni 2001 e successivi. In particolare, esiste un'affascinante associazione tra le riduzioni della copertura MMR e i tassi più bassi di AD / ASD in Norvegia, Svezia e Regno Unito dopo la pubblicazione su *Lancet* di Wakefield nel 1998.⁵ Mentre i dati sulla prevalenza dell'ASD pubblicamente disponibili per questi tre paesi sono deludentemente scarsi durante questo periodo di tempo, l'apparente relazione di causa ed effetto illustrata qui richiede ulteriori studi e indagini.

Quali processi biologici noti potrebbero spiegare questa apparente relazione causale tra vaccini fabbricati da feti e prevalenza ASD? Sugeriamo che i frammenti cellulari fetali contaminanti e i frammenti di DNA così come i frammenti retrovirali di HERVK possano portare a un attacco autoimmune e / o mutagenesi inserzionale nei bambini. Questo documento si concentra sul potenziale di mutagenesi inserzionale.

In questo articolo riportiamo la presenza di frammenti di DNA nel Meruvax II e Havrix. Come mostrato in Figura 2, i residui nel Meruvax II sono lunghi circa 215 coppie di basi. La dimensione del contenuto di DNA residuo in Havrix non era misurabile. I nostri risultati dimostrano gli eccessivi livelli di ssDNA e dsDNA in Meruvax II e Havrix che sono significativamente più alti del limite suggerito dalla FDA.¹⁹ Questi residui eccessivi possono essere assorbiti da una cellula e trasferiti al nucleo. La possibilità per il DNA esogeno di entrare nel nucleo di una cellula e di inserirsi nel genoma di quella cellula è un processo biologico ben consolidato. Infatti, come accennato in precedenza, il trasferimento nucleare di frammenti di DNA mitocondriale è un processo continuo nei mammiferi, compresi gli esseri umani.⁶⁴ Gli sforzi per sviluppare la terapia genica hanno documentato che brevi frammenti di DNA possono e si inseriscono nel genoma del ricevente con un'efficienza fino al 20%. Yakubov et al. (2007) utilizzarono frammenti di DNA placentare umano di lunghezza da 200 a 3000 coppie di basi e dimostrarono l'assorbimento spontaneo e l'inserzione nel genoma della linea di cellule umane MCF-7 con efficienza dell'1-4% e dimostrarono anche la natura specifica di questa incorporazione genomica perché frammenti di DNA dello sperma di salmone non si integrarono nelle cellule umane MCF-7.¹⁸ In questo studio riportiamo tassi di incorporazione genomica che vanno da 0,2 a 0,6% del genoma ricevente, da 24 a 48 ore dopo l'aggiunta di frammenti di DNA di circa 350 paia di basi di lunghezza, a mezzo di coltura di cellule U937 o NCCIT. L'assorbimento del frammento di DNA era spontaneo e non richiedeva permeabilizzazione o trasfezione cellulare. Gli stimoli infiammatori (LPS) sono stati in grado di migliorare l'interiorizzazione, indicando l'importanza della salute generale di un bambino al momento della vaccinazione per la

suscettibilità di internalizzare i frammenti fetali e retrovirali iniettati. Inoltre, è stato dimostrato che piccoli frammenti di DNA si integrano efficacemente nel genoma *in vivo*. Jensen et al (2011) hanno portato e integrato con successo piccoli frammenti di DNA nel fegato di topo utilizzando per la somministrazione iniezioni in vena di coda.⁶⁵ Gli studi di Colosimo nel 2001 e nel 2007 hanno anche dimostrato l'1-10% di integrazione genica *in vivo* di piccoli frammenti omologhi nel 4% delle cellule epiteliali umane mutanti CFTR.^{66,67} McNeer et al (2013) hanno portato frammenti di DNA fino a 60 coppie di basi di lunghezza a topi mediante iniezione in vena di coda e hanno dimostrato un'integrazione genomica da 0,01 a 0,04% con solo DNA, percentuale aumentata fino all'1,2% con tripletta formante PNA. L'integrazione genomica era più alta nelle cellule del midollo osseo, della milza e del timo.⁶⁸ Inoltre, utilizzando queste stesse tecniche, McNeer et al (2013) hanno anche dimostrato efficienza di targeting del DNA *in vivo*, compresa tra 0.05% e 0.43% con un'iniezione endovenosa sistemica, utilizzando rispettivamente il sequenziamento del gene profondo del midollo osseo e della milza. McNeer et al (2013) hanno anche dimostrato la natura specie specifica dell'integrazione del DNA in quei topi chimerici per le cellule staminali umane CD34 + contenenti una mutazione CCR5 mostrando l'assorbimento del frammento iniettato solo nelle cellule staminali CD34 + umane ma non nelle cellule staminali CD34 + dei topi chimerici.⁶⁸

Il DNA libero può essere assorbito da cellule sane attraverso l'assorbimento mediato dai recettori o può penetrare spontaneamente nelle membrane cellulari che hanno la permeabilità alterata, ad esempio durante le reazioni infiammatorie. Si ritiene che l'assorbimento nucleare di frammenti di DNA liberi da cellule fornisca una fonte per il mantenimento dell'integrità del DNA durante il salvataggio di forcelle di replicazione collassate o di riparazione di lesioni di base. L'assorbimento del DNA extracellulare spontaneo è stato anche sfruttato per la terapia genica e per la correzione genica cellulare.^{9,18,69-72} Mentre l'assorbimento del DNA libero è stato usato vantaggiosamente, il processo è stato anche associato alla generazione di mutazioni e aberrazioni cromosomiche.⁷³ La nostra incorporazione genomica (da 0,003 a 0,04 picogrammi) dello 0,2% - 0,6% dell'intero genoma in 24-48 ore sembra alta a prima vista. Tuttavia, i nostri numeri sono coerenti con precedenti rapporti che dimostrano che il DNA esogeno ha sostituito fino all'1% dell'intero genoma entro 30 minuti.⁹ Sebbene le cellule HL-60 non abbiano assunto spontaneamente il DNA esogeno nei nostri esperimenti, la linea cellulare è stata utilizzata in passato come modello per l'assorbimento spontaneo del DNA⁷². L'assorbimento del DNA cellulare e nucleare nelle cellule HFF1 e nelle cellule NCCIT suggerisce che le cellule embrionali e neonatali sono più suscettibili all'assorbimento del DNA rispetto alle cellule di una fonte più matura. Questi risultati indicano la necessità di ulteriori studi sull'incorporazione del DNA da fonti esogene per confrontare la suscettibilità di neonati e bambini piccoli rispetto a adolescenti e adulti. Inoltre, l'aumentata assunzione di DNA dopo l'attivazione di LPS suggerisce che l'infiammazione sistemica o le risposte immunitarie potrebbero aumentare la suscettibilità per l'assorbimento del DNA esogeno. I vaccini che sono fabbricati utilizzando linee cellulari umane fetali sono contaminati da DNA esogeno e frammenti retrovirali,⁵⁷ e i vaccini provocano l'infiammazione sistemica e l'attivazione immunitaria, una combinazione che può essere particolarmente suscettibile alla mutagenesi inserzionale nei destinatari del vaccino.

Oltre a confermare precedenti rapporti sull'incorporazione del DNA in cellule umane, l'analisi genomica in questo documento indica che esistono regioni nel genotipo libero dalla

malattia in cui è probabile che si verificano mutazioni che potrebbero scatenare ASD (Tabelle 5 e 6) tenendo in considerazione la suscettibilità genomica a sviluppare ASD dal punto di vista delle sole firme specifiche per DSB. Che cosa potrebbe giustificare il più alto tasso di 13 mers (le firme specifiche per DSB) in AAG? È stato dimostrato da altri ricercatori che gli AAG sono caratteristicamente ipermutabili ⁷⁴, cosa che può essere il risultato dell'alta concentrazione di firme con specifiche DSB in questi geni. Per quanto riguarda il 'ASD sintomatico, alcuni fattori, oltre alla formazione programmata di DSB, come i DSB indotti nelle cellule somatiche, potrebbero facilmente manifestarsi e portare a mutazioni de novo, e questo studio suggerisce che i frammenti di DNA fetale nei vaccini potrebbero essere un fattore ambientale di questo tipo. In uno scenario simile, come nel caso di vari linfomi, ad esempio, l'aggiunta di una tossina o di un DSB indotto da chemioterapici a DSB programmati per lo switching di classe, porta al cancro.³⁰ In sintesi, i vaccini prodotti in linee cellulari fetali umane contengono livelli inaccettabili di contaminanti del frammento di DNA fetale. Frammenti di DNA umano di lunghezza simile e simile firma epigenetica si integrano spontaneamente nel genoma di linee cellulari primitive, un processo che può essere aumentato nel contesto dell'infiammazione. Il genoma umano contiene naturalmente regioni suscettibili di formazione di rottura a doppio filamento e mutagenesi inserzionale del DNA, regioni che sono particolarmente concentrate all'interno degli esoni di geni che sono stati dimostrati essere causativi o associati al fenotipo ASD. Lo “spavento di Wakefield” ha creato un esperimento naturale che indica una relazione causale tra i vaccini fabbricati da linee cellulari fetali e la prevalenza di ASD. Il nostro studio richiede ulteriori studi e indagini su questa potenziale relazione. Una soluzione a questo orribile problema di salute pubblica è prontamente disponibile: i vaccini possono essere fabbricati in modo sicuro ed efficace in linee cellulari di origine animale, o vegetale, o provenienti da insetti⁷⁵⁻⁷⁷ eliminando il pericolo di residui di DNA umano e contaminanti retro virali.

Referenze

- 1 Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, et al. Strong associations of de novo copy number mutations with autism. *Science*. 2007;316(5823):445.
- 2 Landa RJ. Diagnosis of autism spectrum disorders in the first 3 years of life. *Nature Clinical Practice Neurology*. 2008;4(3):138.
- 3 Deisher T, Koyama K, Bwabye S, Doan N. Impact of environmental factors on the prevalence of autistic disorder after 1979. *Journal of Public Health and Epidemiology*. 2014:271.
- 4 McDonald ME, Paul JF. Timing of increased autistic disorder cumulative incidence. *Environ Sci Technol*. 2010;44(6):2112.
- 5 Wakefield AJ, Murch SH, Anthony A, et al. Ileal-lymphoid-nodular hyperplasia, non-specific colitis, and pervasive developmental disorder in children. *Lancet*. 1998;351(9103):637.
- 6 Dannesbom E, Tegnell A, Hermansson G, Törner A, Giesecke J. Timeliness of MMR vaccination—influence on vaccination coverage. *Vaccine*. 2004;22(31):4228.
- 7 Trogstad L, Ung G, Hagerup-Jenssen M, Cappelen I, Haugen IL, Feiring B. The norwegian immunization register—SYSVAK. *Euro Surveillance: Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*. 2012;17(16).
- 8 Nagaraj A. Does qualitative synthesis of anecdotal evidence with that from scientific research help in understanding public health issues: A review of low MMR uptake. *Eur J Public Health*. 2006;16(1):85.
- 9 Yakubov LA, Deeva EA, Zarytova VF, et al. Mechanisms of oligonucleotide uptake by cells : Involvement of specific receptors? *Proc Nat'l Acad Sci*. 1989;6454-6458.
- 10 Vlassov VV, Balakireva LA, Yakubov LA. Transport of oligonucleotides across natural and model membranes. *Biochim Biophys Acta*. 1994;1197(2):95.
- 11 Orson FM, Thomas DW, McShan WM, Kessler DJ, Hogan ME. Oligonucleotide inhibition of IL2R alpha mRNA transcription by promoter region collinear triplex formation in lymphocytes. *Nucleic Acids Res*. 1991;19(12):3435.
- 12 Zamecnik PC, Goodchild J, Taguchi Y, Sarin PS. Inhibition of replication and expression of human T-cell lymphotropic virus type III in cultured cells by exogenous synthetic oligonucleotides complementary to viral RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(12):4143.

- 13 Stein S, Ott MG, Schultze-Strasser S, et al. Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease. *Nat Med.* 2010;16(2):198.
- 14 Postel EH, Flint SJ, Kessler DJ, Hogan ME. Evidence that a triplex-forming oligodeoxyribonucleotide binds to the c-myc promoter in HeLa cells, thereby reducing c-myc mRNA levels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(18):8227.
- 15 Clarenc JP, Lebleu B, Léonetti JP. Characterization of the nuclear binding sites of oligodeoxyribonucleotides and their analogs. *Journal of Biological Chemistry.* 1993;268(8):5600.
- 16 Leonetti JP, Degols G, Clarenc JP, Mechti N, Lebleu B. Cell delivery and mechanisms of action of antisense oligonucleotides. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1993;44:143.
- 17 Zendegui JG, Vasquez KM, Tinsley JH, Kessler DJ, Hogan ME. In vivo stability and kinetics of absorption and disposition of 3' phosphopropyl amine oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 1992;20(2):307.
- 18 Yakubov LA, Rogachev VA, Likhacheva AC, et al. Natural human gene correction by small extracellular genomic DNA fragments. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.).* 2007;6(18):2293.
- 19 FDA briefing document vaccines and related biological products advisory committee meeting – Cell lines derived from human tumors for vaccine manufacture. September 19, 2012.
- 20 O’Roak BJ, Vives L, Girirajan S, et al. Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature.* 2012;485(7397):246.
- 21 Cooper D, Krawczak M, Antonorakis S. The nature and mechanisms of human gene mutation. In: Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* 7th ed. McGraw-Hill; 1995:259.
- 22 Ozonoff S, Young GS, Carter A, et al. Recurrence risk for autism spectrum disorders: A baby siblings research consortium study. *Pediatrics.* 2011;128(3):e488.
- 23 Constantino JN, Zhang Y, Frazier T, Abbacchi AM, Law P. Sibling recurrence and the genetic epidemiology of autism. *Am J Psychiatry.* 2010;167(11):1349.
- 24 Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, et al. Strong associations of de novo copy number mutations with autism. *Science.* 2007;316(5823):445.
- 25 O’Roak BJ, Vives L, Fu W, et al. Multiplex targeted sequencing identifies recurrently mutated genes in autism spectrum disorders. *Science.* 2012;338(6114):1619.
- 26 Myers S, Bottolo L, Freeman C, McVean G, Donnelly P. A fine-scale map of recombination rates and hotspots across the human genome. *Science (New York, N.Y.).* 2005;310(5746):321.
- 27 Girirajan S, Rosenfeld JA, Cooper GM, et al. A recurrent 16p12.1 microdeletion supports a two-hit model for severe developmental delay. *Nat Genet.* 2010;42(3):203.
- 28 Hicks WM, Kim M, Haber JE. Increased mutagenesis and unique mutation signature associated with mitotic gene conversion. *Science (New York, N.Y.).* 2010;329(5987):82.
- 29 Myers S, Freeman C, Auton A, Donnelly P, McVean G. A common sequence motif associated with recombination hot spots and genome instability in humans. *Nat Genet.* 2008;40(9):1124.
- 30 Tsai AG, Lieber MR. Mechanisms of chromosomal rearrangement in the human genome. *BMC Genomics.* 2010;11:1.
- 31 Baudat F, Buard J, Grey C, et al. PRDM9 is a major determinant of meiotic recombination hotspots in humans and mice. *Science (New York, N.Y.).* 2010;327(5967):836.
- 32 Bradley WE, Raelson JV, Dubois DY, et al. Hotspots of large rare deletions in the human genome. *PLoS ONE.* 2010;5(2):1.
- 33 Choate KA, Lu Y, Zhou J, et al. Mitotic recombination in patients with ichthyosis causes reversion of dominant mutations in KRT10. *Science (New York, N.Y.).* 2010;330(6000):94.
- 34 Van der Burg M, Pac M, Berkowska MA, et al. Loss of juxtaposition of RAG-induced immunoglobulin DNA ends is implicated in the precursor B-cell differentiation defect in NBS patients. *Blood.* 2010;115(23):4770.
- 35 Huang XL, Zou YS, Maher TA, Newton S, Milunsky JM. A de novo balanced translocation breakpoint truncating the autism susceptibility candidate 2 (AUTS2) gene in a patient with autism. *Am J Med Genetics.Part A.* 2010;152A(8):2112.
- 36 Smith CL, Bolton A, Nguyen G. Genomic and epigenomic instability, fragile sites, schizophrenia and autism. *Curr Genomics.* 2010;11(6):447.
- 37 The Norwegian Institute of Public Health.
- 38 The National Board of Health and Welfare.
- 39 The Public Health England.
- 40 Isaksen J, Diseth TH, Schjølberg S, Skjeldal OH. Observed prevalence of autism spectrum disorders in two norwegian counties. *European Journal Of Paediatric Neurology: EJPN: Official Journal of the European Paediatric Neurology Society.* 2012;16(6):592.
- 41 Surén P, Bakken IJ, Aase H, et al. Autism spectrum disorder, ADHD, epilepsy, and cerebral palsy in norwegian children. *Pediatrics.* 2012;130(1):e152.
- 42 Surén P, Stoltenberg C, Bresnahan M, et al. Early growth patterns in children with autism. *Epidemiology.* 2013;24(5):660.
- 43 Statistiska centralbyran - Statistics Norway - Population.
- 44 Nygren G, Cederlund M, Sandberg E, et al. The prevalence of autism spectrum disorders in toddlers: A population study of 2-year-old swedish children... corrected] published erratum appears in *J Autism Dev Disord* 2012; 42(7):1498]. *Journal of Autism & Developmental Disorders.* 2012;42(7):1491.
- 45 Statistiska centralbyran - Statistics Sweden - Population.
- 46 Lingam R, Simmons A, Andrews N, Miller E, Stowe J, Taylor B. Prevalence of autism and parentally reported triggers in a north east london population. *Arch Dis Child.* 2003;88(8):666.

- 47 Latif AHA, Williams WR. Diagnostic trends in autistic spectrum disorders in the south wales valleys. *Autism: The International Journal of Research and Practice*. 2007;11(6):479.
- 48 Population estimates for England and Wales. Office of National Statistics.
- 49 Feng Z, Hensley L, McKnight KL, et al. A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes. *Nature*. 2013;496(7445):367.
- 50 Namuwulya P, Abernathy E, Bukenya H, et al. Phylogenetic analysis of rubella viruses identified in uganda, 2003-2012. *J Med Virol*. 2014;86(12):2107.
- 51 Qiagen. QIAamp viral RNA mini kit.
- 52 Strizzi L, Hardy KM, Seftor EA, et al. Development and cancer: At the crossroads of nodal and notch signaling. *Cancer Res*. 2009;69(18):7131.
- 53 Churbanov A, Voøechovský I, Hicks C. A method of predicting changes in human gene splicing induced by genetic variants in context of cis-acting elements. *BMC Bioinformatics*. 2010;11:1.
- 54 Basu SN, Kollu R, Banerjee-Basu S. AutDB: A gene reference resource for autism research. *Nucleic Acids Res*. 2009;37:D832.
- 55 The UCSC genome browser. <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTables?command=start2013>.
- 56 International hapmap project. <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/2013>.
- 57 Victoria JG, Wang C, Jones MS, et al. Viral nucleic acids in live-attenuated vaccines: Detection of minority variants and an adventitious virus. *J Virol*. 2010;84(12):6033.
- 58 Frank O, Giehl M, Zheng C, Hehlmann R, Leib-Mösch C, Seifarth W. Human endogenous retrovirus expression profiles in samples from brains of patients with schizophrenia and bipolar disorders. *J Virol*. 2005;79(17):10890.
- 59 Diem O, Schäffner M, Seifarth W, Leib-Mösch C. Influence of antipsychotic drugs on human endogenous retrovirus (HERV) transcription in brain cells. *PLoS ONE*. 2012;7(1):1.
- 60 Balestrieri E, Arpino C, Matteucci C, et al. HERVs expression in autism spectrum disorders. *PLoS ONE*. 2012;7(11).
- 61 Tai AK, O'Reilly EJ, Alroy KA, et al. Human endogenous retrovirus-K18 env as a risk factor in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* (13524585). 2008;14(9):1175-1180.
- 62 Freimanis G, Hooley P, Ejtehadi HD, et al. A role for human endogenous retrovirus-K (HML-2) in rheumatoid arthritis: Investigating mechanisms of pathogenesis. *Clinical & Experimental Immunology*. 2010;160(3):340.
- 63 Dickerson F, Rubalcaba E, Viscidi R, et al. Polymorphisms in human endogenous retrovirus K-18 and risk of type 2 diabetes in individuals with schizophrenia. *Schizophr Res*. 2008;104(1-3):121.
- 64 Chatre L, Ricchetti M. Nuclear mitochondrial DNA activates replication in *saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE*. 2011;6(3):1.
- 65 Jensen NM, Dalsgaard T, Jakobsen M, et al. An update on targeted gene repair in mammalian cells: Methods and mechanisms. *J Biomed Sci*. 2011;18(1):10.
- 66 Colosimo A, Goncz KK, Novelli G, Dallapiccola B, Gruenert DC. Targeted correction of a defective selectable marker gene in human epithelial cells by small DNA fragments. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*. 2001;3(2):178.
- 67 Colosimo A, Guida V, Antonucci I, Bonfini , Stuppia L, Dallapiccola B. Sequence-specific modification of a beta-thalassemia locus by small DNA fragments in human erythroid progenitor cells. *Haematologica*. 2007;92(1):129.
- 68 McNeer NA, Schleifman EB, Cuthbert A. et al. Systemic delivery of triplex-forming PNA and donor DNA by nanoparticles mediates site-specific genome editing of human hematopoietic cells in vivo. *Gene Ther*. 2013;20(6):658-669.
- 69 Filaci G, Gerloni M, Rizzi M, et al. Spontaneous transgenesis of human B lymphocytes. *Gene Ther*. 2004;11(1):42.
- 70 Lehmann MJ, Sczakiel G. Spontaneous uptake of biologically active recombinant DNA by mammalian cells via a selected DNA segment. *Gene Ther*. 2005;12(5):446.
- 71 Rogachev VA, Likhacheva A, Vratskikh O, et al. Qualitative and quantitative characteristics of the extracellular DNA delivered to the nucleus of a living cell. *Cancer Cell International*. 2006;6:23.
- 72 Yakubov LA, Petrova NA, Popova NA, Semenov DV, Nikolin VP, Os'kina IN. The role of extracellular DNA in the stability and variability of cell genomes. *Doklady.Biochemistry And Biophysics*. 2002;382:31.
- 73 Howe SJ, Mansour MR, Schwarzwaelder K, et al. Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *J Clin Invest*. 2008;118(9):3143.
- 74 Michaelson JJ, Shi Y, Gujral M, et al. Whole-genome sequencing in autism identifies hot spots for de novo germline mutation. *Cell*. 2012;151(7):1431.
- 75 Orenstein W, Reef SE. Rubella virus. In: Kaslow RA, Stanberry LR, Le Duc JW, eds. *Viral Infections of Humans: Epidemiology and Control*. Fifth ed. Springer; 2014:733-744
- 76 Shiraki K, Hayakawa Y, Mori H, et al. Development of immunogenic recombinant oka varicella vaccine expressing hepatitis B virus surface antigen *J Gen Virol*. 1991;72 (Pt 6):1393.
- 77 Diaz-Mitoma F, Le T, Anderson DE. Compositions and methods for treating hepatitis a. <http://www.google.com/patents/WO2010033812A1?cl=en>.

Figura 1

Prevalenza dell'autismo e copertura MMR nel Regno Unito, Norvegia e Svezia prima e dopo il documento di Wakefield del 1998 che suggeriva che l'MMR era legato alla malattia intestinale e all'autismo

Figura 1 - prevalenza AD/ASD media e copertura MMR nel Regno Unito, Norvegia e Svezia. Sia i dati MMR che quelli AD/ASD sono normalizzati alla massima copertura/prevalenza durante il

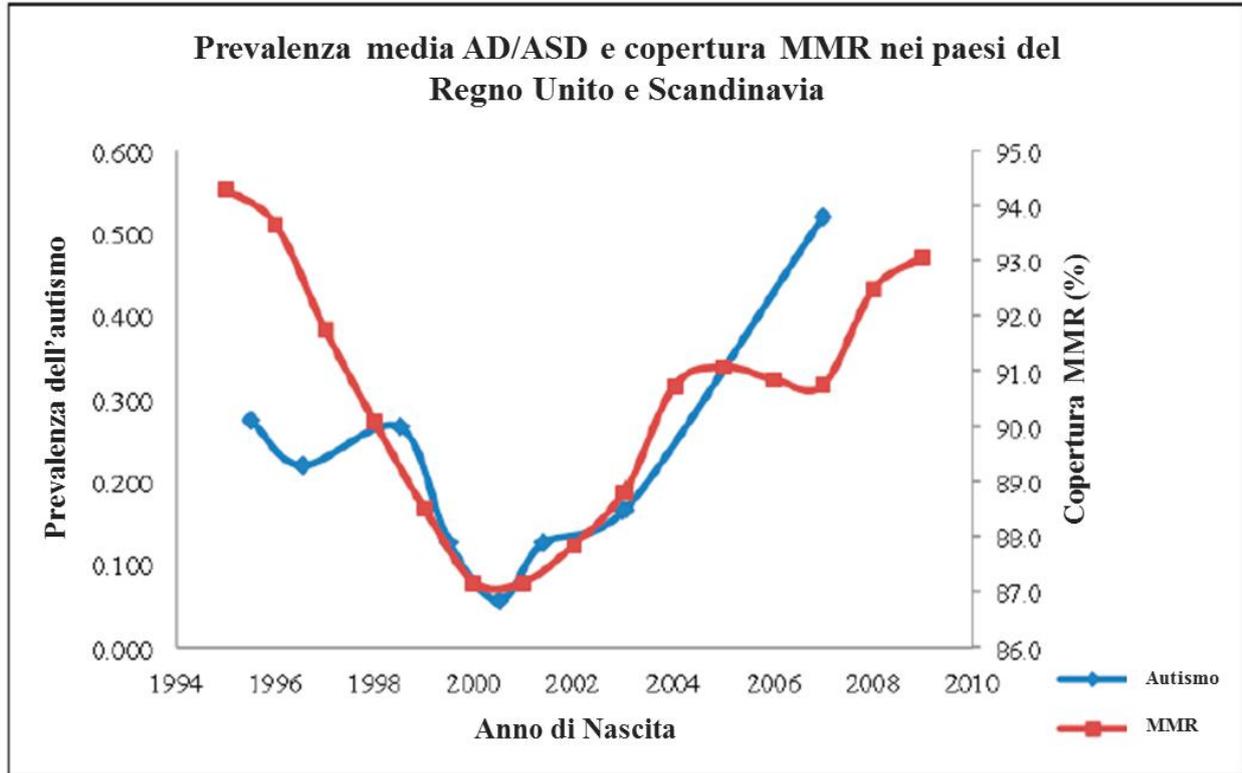


Tabella 1**Prevalenza dell'autismo in Norvegia, Regno Unito e Svezia**

Birth Year	Prevalence (%)	
<i>Norvegia</i>		
1999	0.14	
2000	0.05	Isaksen et al. 2012
2001	0.17	Suren 2012 & 2013
2002	0.26	
2003	0.29	
<i>Regno Unito</i>		
1995.5	0.274	
1196.5	0.219	Latif et al. 2007
1998.5	0.265	Lingam et al. 2003
1999.5	0.11	
2000.5	0.061	
2001.4	0.082	
<i>Svezia</i>		
1998	0.12	
2003	0.038	Nygren et al. 2012
2007	0.52	

Tabella 2**Copertura MMR nel Regno Unito, Norvegia e Svezia**

Anno di Nascita	Copertura MMR (%)
1995	94.3
1996	93.7
1997	91.8
1998	90.1
1999	88.5
2000	87.2
2001	87.2
2002	87.8
2003	88.8
2004	90.7
2005	91.1
2006	90.9
2007	90.8
2008	92.5
2009	93.1

Tabella 3

Livelli di DNA residuo umano a singolo filamento (saggio PicoGreen®) e DNA umano a doppio filamento (saggio OliGreen®) in vaccino Rosolia (Meruvax®II) e vaccino contro l'epatite A (Havrix®).

	MERUVAX®II (Vaccino per Rosolia)		HAVRIX® (Vaccino per Epatite A)	
	Merck & Co. Inc.		GlaxoSmithKline Biologicals	
	DNA a singolo filamento (ng/fiala)	DNA a doppio filamento (ng/fiala)	DNA a singolo filamento (ng/fiala)	DNA a doppio filamento (ng/fiala)
Fiala 1	135.66	59.34	844.58	112.69
Fiala 2	145.82	24.54	104.88	10.69
Fiala 3	-	36.052	213.6	15.32
Fiala 4	-	20.064	213.6	15.32
Fiala 5	118.54	-	213.6	15.32
Fiala 6	164.40	-	165.43	73.33
Fiala 7	145.82	-	176.31	7.49
Media	142.05	35.00	276.00	35.74

Figura 2

DNA purificato dopo elettroforesi su gel. Gel rappresentativi che mostrano la dimensione dei frammenti di DNA umano residuo per Meruvax®II (A) e Havrix® (B). Quando si opera nelle medesime condizioni di 2A, i frammenti di DNA tetale umano in Havrix® non migrano. Meruvax®II (Rosolia) con icati per un h DNA i migrazione del DNA lan DNA ladder e DNA frammenti di Havrix® (B) con DNA ® non sono migrati (2B)

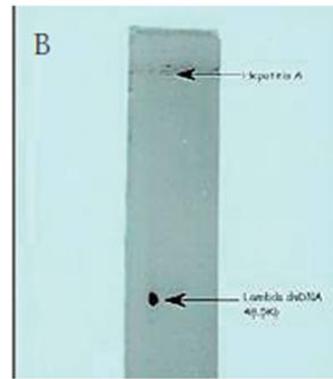
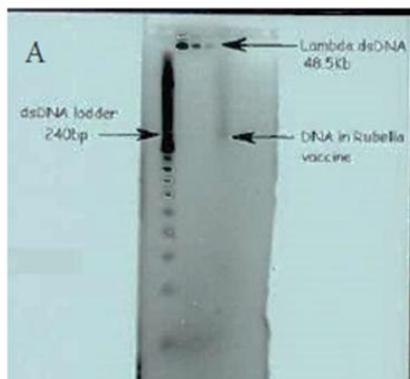


Tabella 4

Assorbimento di DNA Cot1 umano marcato con Cy3 in varie linee cellulari.

	Assorbimento Cellulare spontaneo	Assorbimento Nucleare spontaneo	Incorporazione nel DNA Genomico	Assorbimento Cellulare/Nucleare con LPS o saponina
HFF1	Si	Si	Non Eseguito	Aumenta/Aumenta
NCCIT	Si	Si (variabile)	0.0026 pg per cellula 24 0.04 pg per cellula 48	Uguale/Uguale
BE(2)-C	No	No	Non Eseguito	No/No
M059K	No	No	No	No/No
M059J	No	No	Non Eseguito	Si/No
U937	Si	Si	0.011 ± 0.003 pg per cellula 24	Uguale/Uguale
HL60	No	No	No	No

Tabella 4 - Il DNA umano Cot1 acquistato da Invitrogen con una dimensione media del frammento di 350 paia di basi (dati non mostrati), è stato marcato con Cy3 e incubato con varie linee cellulari umane. L'assorbimento cellulare, nucleare e genomico è stato seguito mediante microscopia a fluorescenza e fluorometria. L'assorbimento è stato determinato sia in condizioni di riposo che attivate.

Figure da 3 a 10

Assorbimento del frammento di DNA Cot1 del DNA marcato con Cy3 in varie linee cellulari umane che rappresentano fasi embrionali, neonatali e di trasformazione del cancro.

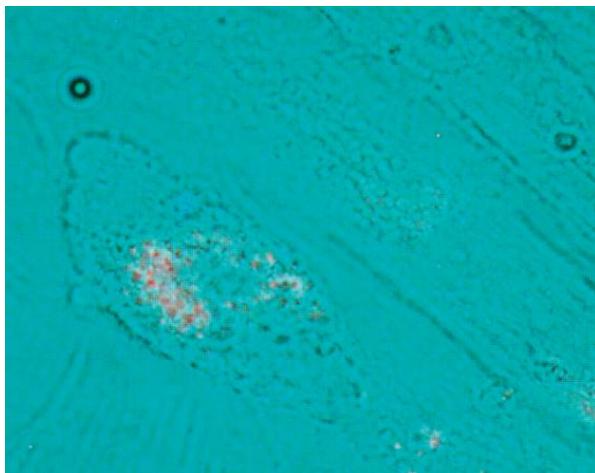


Figura 3 - Assorbimento spontaneo del DNA cellulare e nucleare dell'HFF1 (campo luminoso e sovrapposizione alla fluorescenza del rosso Cy3).

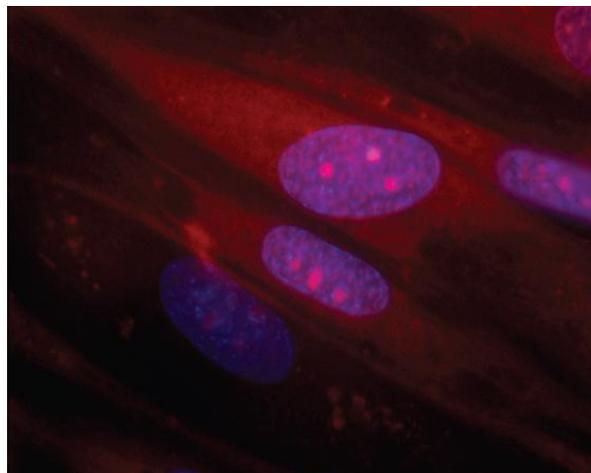


Figura 4 - Assorbimento del DNA cellulare e nucleare HFF1 dopo permeabilizzazione con saponina. (Sovrapposizione di fluorescenza blu di Cy3 red e nucleo Hoechst)

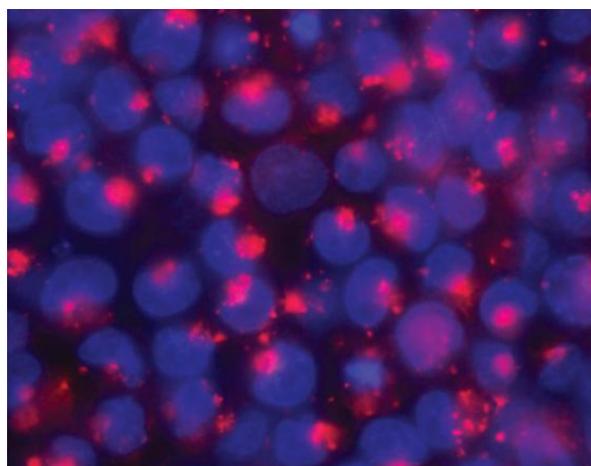
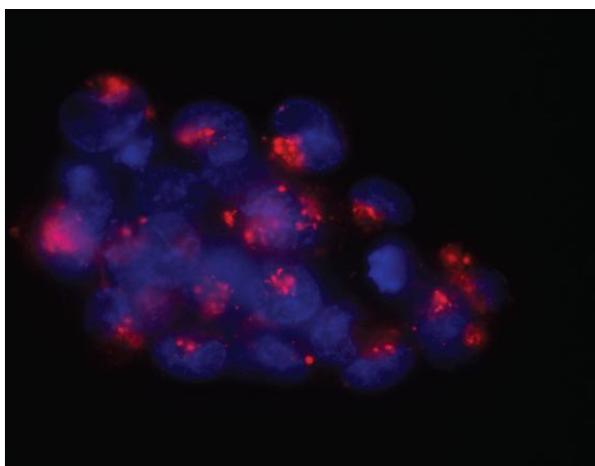


Figura 5 - Assorbimento del DNA cellulare spontaneo NCCIT (sovrapposizione di fluorescenza Cy3 rossa e nucleo blu)

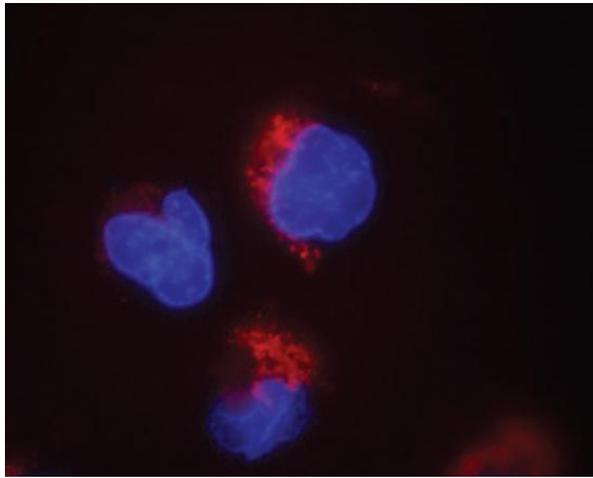


Figura 6 - Assorbimento del DNA cellulare NCCIT dopo l'attivazione del lipopolisaccaride (strato di fluorescenza blu di Cy3 red e nucleo Hoechst blu)

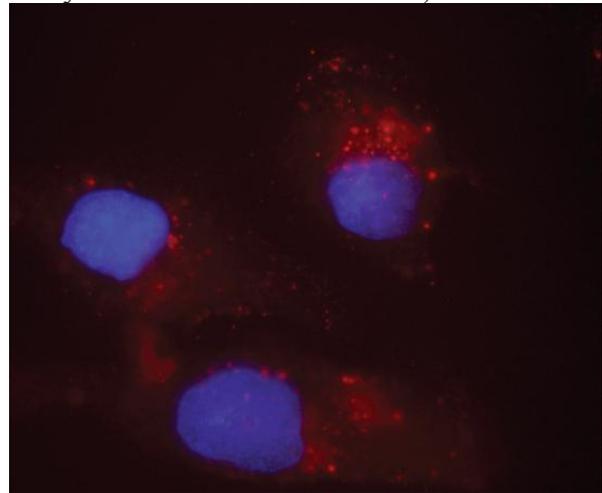


Figura 7 - Assorbimento del DNA cellulare M059J dopo l'attivazione del lipopolisaccaride (10 ng / 104 cellule) (sovrapposizione di fluorescenza blu di Cy3 red e nucleo Hoechst blu).

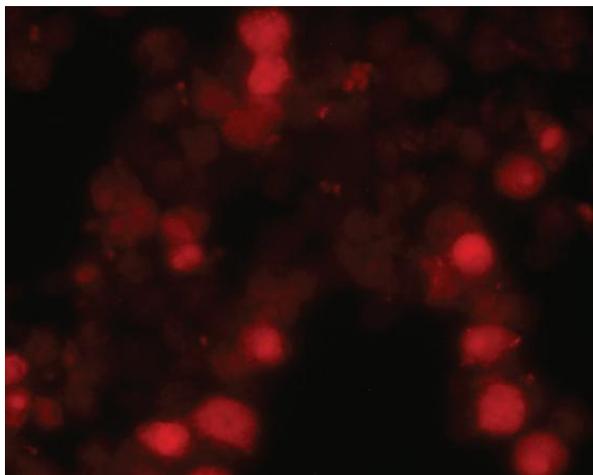


Figura 8 - Assorbimento del DNA cellulare M059J dopo l'attivazione del lipopolisaccaride (100 ng / 104 cellule). (Sovrapposizione di fluorescenza blu di Cy3 red e nucleo Hoechst).

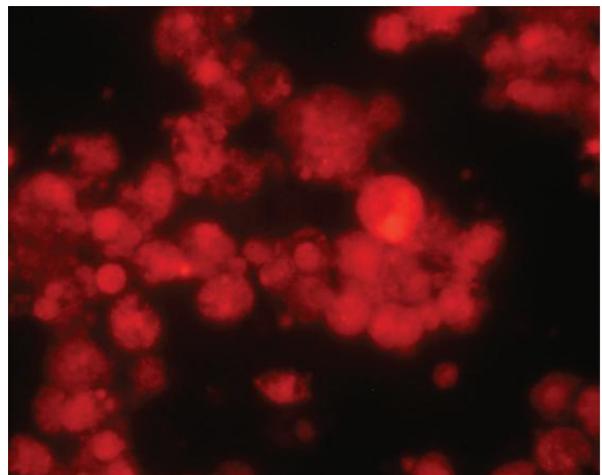


Figura 9 - Assorbimento spontaneo del DNA cellulare / nucleare U937 (Cy3 rosso)

Figura 10 - Nuclei purificati U937 contenenti DNA marcato con Cy3 prima della purificazione del DNA (Cy3 Red)

Tabella 5

Confronto delle concentrazioni cromosomiche medie degli hot spots e dei 13 mer

	Hotspots per Gene	13 mers per Gene	13 mers in Hotspot per Hotspot
Tutti i geni	2.38	16.8	1.63
AAGS	4.21	17.7	2.22

Tabella 6**Confronto della presenza di 13 mer all'interno di tutti i geni e dei geni associati all'autismo**

cromosoma	% Geni Contenenti HS		% Geni Contenenti 13 mer in HS		% Geni Contenenti 13 mer	
	Tutti i geni	AAGS	Tutti i geni	AAGS	Tutti i geni	AAGS
	1	23.42%	50.00%	13.05%	27.78%	72.97%
2	16.97%	62.50%	16.97%	45.83%	78.14%	95.83%
3	27.56%	60.87%	14.99%	52.17%	79.94%	86.96%
4	35.24%	50.00%	17.62%	32.14%	72.17%	78.57%
5	28.68%	36.67%	16.32%	20.00%	75.27%	83.33%
6	26.15%	33.33%	12.70%	23.33%	71.85%	83.33%
7	25.52%	63.00%	18.78%	54.00%	77.00%	97.00%
8	28.95%	53.85%	16.42%	30.77%	74.70%	92.31%
9	23.20%	75.00%	14.42%	62.50%	72.10%	75.00%
10	31.63%	60.00%	17.28%	40.00%	79.78%	90.00%
11	17.85%	36.00%	9.38%	24.00%	65.83%	92.00%
12	20.12%	37.50%	12.59%	37.50%	77.40%	100.00%
13	37.65%	77.78%	20.05%	66.67%	74.57%	88.89%
14	26.49%	66.67%	16.41%	66.67%	64.34%	100.00%
15	23.57%	46.67%	11.79%	46.67%	68.04%	86.67%
16	17.81%	46.15%	10.75%	38.46%	76.61%	92.31%
17	17.10%	26.67%	12.51%	20.00%	74.24%	100.00%
18	32.53%	0.00%	19.88%	0.00%	79.52%	100.00%
19	10.11%	0.00%	8.06%	0.00%	76.38%	100.00%
20	23.88%	44.44%	15.25%	33.33%	74.58%	77.78%
21	25.00%	100.00%	20.42%	100.00%	69.00%	100.00%
22	17.65%	11.11%	13.24%	11.11%	79.78%	100.00%
X	14.00%	45.00%	13.45%	39.00%	65.00%	95.00%
Media	24.43%	47.10%	14.95%	37.91%	74.28%	90.75%

Tabella 7

AAGs del cromosoma X con 13 mers in esoni e la loro distanza dall'inizio del hotspot più vicino (HS)

Gene	Inizio Gene	Fine Gene	Inizio Schema	Fine Schema	Schema	Filamento	Inizio Esone	Fine Esone
NLGN4X	5808082	6146706	5821352	5821364	gtggccacggcgg	-	5821117	5821900
AFF2	147582138	148082193	148048477	148048489	ccaccatcacctc	+	148048319	148048489
NLGN3	70364680	70391051	70386983	70386995	gtggatatgggg	+	70386860	70387600
MECP2	153287263	153363188	153296166	153296178	gtgggatgggg	-	153295685	153296178
FRMPD4	12156584	12742642	12739916	12739928	ccaccatggccgc	+	12738647	12742642
PHF8	53963112	54071569	54012352	54012364	ccaccatgtctc	-	54012339	54012364
RAB39B	154487525	154493852	154493567	154493579	cctccatggccgc	-	154493358	154493852
FRMPD4	12156584	12742642	12736309	12736321	ggggcaagggagg	+	12735619	12736321
GRPR	16141423	16171641	16170710	16170722	cctccgtggccac	+	16170378	16171641
AFF2	147582138	148082193	148079262	148079274	ccccctcaccac	+	148072740	148082193
SH3KBP1	19552082	19905744	19564111	19564123	cctccttacctc	-	19564039	19564123
PDZD4	153067622	153096003	153070331	153070343	cccccttctctc	-	153067622	153070343
SLC6A8	152953751	152962048	152960611	152960623	ccaccctgacccc	+	152960528	152962048
FMR1	146993468	147032647	147026533	147026545	gaggacaaggagg	+	147026463	147026545
HNRNPH2	100663120	100669128	100668241	100668253	gtggttatgggg	+	100666923	100669128
HNRNPH2	100663120	100669128	100668229	100668241	gtggttatggagg	+	100666923	100669128
HNRNPH2	100663120	100669128	100667689	100667701	gagggtatggagg	+	100666923	100669128
FMR1	146993468	147032647	146993528	146993540	gcggtgacggagg	+	146990948	146993540
CXCR3	70835765	70838367	70837189	70837201	gtgggcagggcgg	-	70835765	70837201
AR	66763873	66944119	66765398	66765410	ccgccgtggccgc	+	66763873	66765410