

# Vaccinegate: Report analisi metagenomiche su Priorix Tetra

## Introduzione

Come è noto, i vaccini sono farmaci biologici utilizzati per la prevenzione di alcune malattie infettive e sono costituiti da più componenti: gli antigeni (virus, batteri inattivati o attenuati, tossine inattivate, proteine o molecole complesse derivati dai virus e batteri, in grado di stimolare la risposta immunitaria), gli adiuvanti (sostanze che aumentano la capacità degli antigeni vaccinali di indurre la risposta immunitaria anticorpale), gli eccipienti (sostanze necessarie per formulare il vaccino, o per preservarlo dalle contaminazioni batteriche) e le contaminazioni (sostanze presenti in tracce provenienti dalle materie prime, es. linee cellulari per la crescita dei batteri e virus, o dal processo di lavorazione, es. formaldeide, antibiotici).

Durante la fase di registrazione di un farmaco biologico, il vaccino viene sottoposto ai controlli previsti dalle linee guida dell'EMA e concordati con l'ente regolatore in base al tipo specifico di vaccino. Tali controlli vengono poi effettuati su un numero rappresentativo di campioni su ciascun lotto prima della commercializzazione.

*La responsabilità della conformità del prodotto venduto è quindi del produttore e degli enti regolatori preposti al controllo.*

Poiché la sicurezza di un vaccino dipende dalla sua conformità ai criteri di qualità, soprattutto riguardanti il controllo dell'assenza di contaminazioni tossiche o potenzialmente tossiche (cioè per le quali non sono noti gli effetti sull'uomo) è di grande importanza che tale conformità venga rispettata in modo molto rigoroso.

Vari studi in letteratura hanno posto il problema della presenza di vari tipi di contaminazioni, sia di tipo chimico che microbiologico, aprendo quindi il quesito se effettivamente i vaccini sono conformi alle direttive imposte dagli enti regolatori, se a loro volta gli enti regolatori applicano il controllo per il rispetto di tali direttive e se gli enti regolatori hanno definito con linee guida efficaci i criteri per il controllo e il contenimento di tali contaminazioni.

Per rispondere a tali domande il Corvelva ha commissionato l'analisi delle contaminazioni biologiche, che non dovrebbero mai essere presenti nei vaccini, ad un centro altamente qualificato di servizi specializzato nel sequenziamento genomico di DNA e di RNA.

Lo studio commissionato dal Corvelva si è articolato su due tipi di analisi:

1. **Test di presenza di acidi nucleici (DNA/RNA)** di origine umana e animale e da microrganismi (virus, batteri) utilizzando la metodica Next Generation Sequencing, che ha permesso di quantificare in maniera altamente specifica e accurata la sequenza del materiale genetico contenuto nei vaccini esaminati
2. **Verifica di corrispondenza delle sequenze genomiche** dei batteri e virus vivi attenuati o inattivati presenti nei vaccini (presenza di varianti genetiche)

## Descrizione del metodo utilizzato per l'analisi

Il Next Generation Sequencing, noto anche come **deep sequencing**, genera una singola sequenza da ciascun frammento di DNA, o cDNA, presente in un campione. L'analisi bioinformatica a valle consente poi la differenziazione tra l'origine dei frammenti di sequenza, ad esempio umana, specie batteriche o un particolare virus. Questo significa che campioni biologici misti possono essere agevolmente risolti con questa tecnologia, ormai entrata nella routine della ricerca genomica e della diagnostica. Inoltre da dati NGS è possibile ricostruire l'intera sequenza di genomi virali a DNA e RNA e di genomi batterici presenti nel campione e confrontarlo con i genomi di riferimento presenti nei database pubblici.

I campioni esaminati sono riportati di seguito insieme ai risultati ottenuti, raggruppandoli per classi di vaccini simili:

\* ssRNA: single strand RNA, RNA a filamento singolo; dsDNA: double strand DNA, DNA a doppio filamento.

I termini sottolineati sono costituiti o contengono materiale genetico (DNA e/o RNA)



## Lotti Analizzati

Lotto #1 - A71CB205A e Lotto #2 - A71CB256A

<b>Nome prodotto:</b>	Priorix Tetra
<b>Tipo di prodotto:</b>	Vaccino tetravalente morbillo, parotite, rosolia, varicella
<b>Produttore:</b>	GlaxoSmithKline, Belgio
<b>Composizione:</b> <sup>1</sup>	virus vivi attenuati: Morbillo (ssRNA) ceppo Swartz, coltivato in colture di cellule embrionali di pollo; Parotite (ssRNA) ceppo RIT 4385, derivato dal ceppo Jeryl Linn, coltivato in colture di cellule embrionali di pollo; Rosolia (ssRNA) ceppo Wistar RA 27/3, coltivato in cellule diploidi umane (MRC-5); Varicella (dsDNA) ceppo OKA coltivato in cellule diploidi umane (MRC-5)

## Analisi richieste

Test di presenza di acidi nucleici (DNA/RNA) di origine umana e animale e da microrganismi (virus, batteri), utilizzando un approccio di tipo metagenomico/metatrascrittomico su piattaforma Illumina di tipo Next Generation Sequencing.

### Dal confronto di questi tre vaccini è possibile evidenziare le seguenti criticità:

Il Priorix Tetra è il vaccino con più alta quantità di DNA estraneo contaminante (DNA totale estratto da 3.7 µg a 1.7 µg, di cui il 88% è umano, quindi proveniente dalle cellule MRC-5, e il restante 12% proviene da microrganismi avventizi, quali virus, batteri, vermi).

Il DNA genomico umano è ad alto peso molecolare sopra i 60.000 bp. e la totale copertura in sequenza dell'intero genoma umano di riferimento (HG-19) **dimostra che è l'intero genoma delle cellule fetali utilizzate per la coltura dei virus vaccinici ad essere presente e non solo porzioni di esso.**

Dalla risposta dell'EMA al nostro quesito<sup>2</sup> sui limiti imposti ai residui di materiale genetico estraneo nei vaccini risulta che di fatto non ci sono dei limiti per ciascun vaccino ma solo per alcuni, riportati nelle monografie del prodotto; **il limite massimo previsto varia da 10 pg a 10 ng**, sulla base del calcolo teorico della possibilità da parte del DNA genomico estraneo di causare mutazioni oncogeniche.

È da notare che le autorità regolatorie non richiedono che queste contaminazioni vengano testate nel prodotto finale, ma solo nella fase di preparazione iniziale, e che per i vaccini a virus attenuati la purificazione di queste contaminazioni sono un passaggio critico<sup>3</sup>. L'EMA non ha fornito studi specifici sulla pericolosità del DNA residuo fetale, che consentano di valutare il rischio per la salute umana di queste contaminazioni, perciò tale limite rimane ad oggi arbitrario.

*Ne segue che per questi due lotti di Priorix Tetra risulta circa 140 volte superiore al limite massimo di 10 ng e ben 140.000 volte superiore al limite minimo di 10 pg.*

Sulla questione del DNA umano contaminante, il World Health Institute in un documento ufficiale del 2011 dal titolo 'Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks' sostiene che ciò che è necessario prendere in considerazione rispetto all'rcDNA (DNA cellulare residuo) nei vaccini è:

- A. una riduzione della quantità del DNA contaminante durante il processo di fabbricazione;
- B. una riduzione della dimensione del DNA contaminante durante il processo di fabbricazione;
- C. una inattivazione chimica dell'attività biologica del DNA avvenuta durante il processo di fabbricazione.

Tenendo in considerazione le tre richieste descritte sopra, il prodotto è considerato dai loro organi regolatori (NRA) e laboratori di controllo (NLC), essere ad un livello di rischio accettabile riguardo la presenza di DNA dal substrato cellulare, sulla base di (a) e/o (b) e/o (c), quando i dati dimostrino che livelli adeguati di sicurezza sono stati raggiunti.

In particolare nei 2 lotti di vaccino Priorix Tetra testati ad oggi, il punto A. non si verifica perché la quantità è circa 140 volte superiore a quella

<sup>1</sup> [https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer\\_000200\\_038200\\_RCP.pdf&retry=0&sys=m0b113](https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer_000200_038200_RCP.pdf&retry=0&sys=m0b113)

<sup>2</sup> Quesito EMA: <https://www.ivancatalano.eu/wp-content/uploads/2018/05/Letter.pdf>

<sup>3</sup> [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC500003322.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003322.pdf)

[http://www.who.int/biologicals/Cell\\_Substrates\\_clean\\_version\\_18\\_April.pdf](http://www.who.int/biologicals/Cell_Substrates_clean_version_18_April.pdf)

<http://www.who.int/biologicals/Molecular%20Methods%20Final%20Mtg%20Report%20April2005.pdf?ua=1>

<https://pdfs.semanticscholar.org/presentation/0be5/9f9c69baa35c0f24086936bc541809ebc6.pdf>



raccomandata dall'FDA (in Briefing Document September 19, 2012: Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee Meeting) e dall'EMA, cioè  $\leq 10\text{ng}$  per dose; il punto b) non si verifica perché il DNA è ad alto peso molecolare (la maggior parte  $>$  di 10.000 bp, come si può facilmente verificare utilizzando un semplice gel d'agarosio per il controllo della qualità del DNA estratto dal vaccino), cioè 50 volte superiore alla taglia raccomandata dall'FDA (200bp o inferiore). Infine nello stesso vaccino, il punto c) non si verifica perché, contenendo virus attenuati, un'eventuale inattivazione chimica del DNA, inattiverebbe anche i virus.

### Comparazione lotti Priorix Tetra

Lotto #1 - A71CB205A	Lotto #2 - A71CB256A
<p><b>Analisi del DNA</b></p> <p>DNA totale estratto: 1.7 <math>\mu\text{g}</math> totali per dose da 0.5mL</p> <p>Eseguita analisi DNA-seq tramite approccio metagenomico, su un totale di <b>3.830.074</b> di sequenze prodotte</p> <p>Presente DNA genomico di:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Varicella <b>14%</b></li> <li>Pollo <b>4%</b></li> <li>Uomo (MRC-5) <b>74%</b></li> <li>proteobatteri <b>1%</b></li> <li>virus a RNA <b>0.01%</b></li> <li>non assegnati <b>5%</b></li> </ul>	<p><b>Analisi del DNA</b></p> <p>DNA totale estratto: 3.7 <math>\mu\text{g}</math> totali per dose da 0.5mL</p> <p>Eseguita analisi DNA-seq tramite approccio metagenomico, su un totale di <b>5.836.297</b> di sequenze prodotte.</p> <p>Presente DNA genomico di:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Varicella <b>14%</b></li> <li>Uomo (MRC-5) <b>88%</b></li> <li>(circa 3,3 <math>\mu\text{g}</math> che equivale a circa 300.000 cellule fetali)</li> <li>virus a RNA <b>0.0003%</b></li> <li>non assegnati <b>0.5%</b></li> </ul>
<p><b>Analisi dell'RNA</b></p> <p>RNA totale estratto: non quantificabile con metodi fluorimetrici standard</p> <p>Eseguita analisi RNA-seq tramite approccio metatrascrittomico, su un totale di 10.445.038 di sequenze prodotte.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Morbillo <b>0.004%</b></li> <li>Parotite <b>0.008%</b></li> <li>Rosolia <b>0.00007%</b></li> <li>Varicella <b>5%</b></li> <li>altri virus circa <b>0.002%</b></li> <li>elminti <b>0.6%</b></li> <li>Pollo <b>0.2%</b></li> <li>Uomo <b>87%</b></li> <li>non assegnati <b>5%</b></li> </ul>	<p><b>Analisi dell'RNA</b></p> <p>RNA totale estratto: 200ng per dose da 0.5mL</p> <p>Eseguita analisi RNA-seq tramite approccio metatrascrittomico, su un totale di 6.171.266 di sequenze prodotte.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Morbillo <b>0.004%</b></li> <li>Parotite <b>0.008%</b></li> <li>Rosolia <b>nd%*</b></li> <li>Varicella <b>7%</b></li> <li>altri virus circa <b>0.001%</b></li> <li>nematoda <b>1.50%</b></li> <li>Proteobatteri <b>5.5%</b></li> <li>Uomo <b>68%</b></li> <li>non assegnati <b>6%</b></li> </ul> <p>*sequenziamento con 260.343.42 reads: 114 reads pari allo 0.00004%</p>



## Metodi e risultati

### Estrazione DNA e RNA Priorix Tetra lot. A71CB205A

Il lotto **lotA71CB205A** è stato processato a giugno 2018.

L'estrazione del DNA genomico è stata effettuata con il kit Maxwell® 16 Blood DNA Purification Kit rivenduto dall'azienda Promega e con l'estrattore automatico Maxwell® 16 IVD (Promega), seguendo il protocollo del produttore. L'estrazione dell'RNA è stata fatta utilizzando il kit PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen) seguendo il protocollo del produttore.

Le quantità di partenza utilizzate per le estrazioni sono le seguenti (a partire da una singola fiala di prodotto):

- Estrazione DNA: 125 µl su 500 µl totali di sospensione iniettabile
- Estrazione RNA: 125 µl su 500 µl totali di sospensione iniettabile

La quantificazione e il controllo di qualità del DNA e dell'RNA estratto è stata effettuata rispettivamente con il fluorimetro Qubit 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA) e con lo spettrofotometro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Di seguito il risultato delle quantificazioni (ND= NanoDrop 1000; QB= Qubit 2.0; HS= dsDNA HS Assay Kit)

Sample ID	ND A260/280	ND A260/230	QB_HS_ng/µL	volume_µl	Tot_amount_ng
DNA lot <b>A71CB205A</b>	1.54	1.31	9.41	45	423.45
RNA lot <b>A71CB205A*</b>	n.d.	n.d.	Out of range	50	0

\*Quantità di RNA sotto il limite di quantificazione del fluorimetro QBit.

La misurazione della concentrazione del DNA con fluorimetro QuBit ha evidenziato che il lotto **A71CB205A**, contiene una quantità di **gDNA di 1.7 µg totali per dose da 0.5mL**, così calcolata:

9.41ng/µl (concentrazione determinata al QuBit) x 45 (volume di risospensione finale del DNA dopo estrazione, espresso in microlitri) x 4 (il volume di partenza sottoposto alla procedura di estrazione è 1/4 del volume della dose contenuta nell'intera fiala pari a 0.5mL).

### Estrazione DNA e RNA Priorix Tetra lot. A71CB256A

Il lotto **A71CB206A** è stato processato a dicembre 2018. Sono stati apportati alcuni miglioramenti nella procedura, quali:

1. Utilizzo di una maggiore volume di soluzione iniettabile di partenza al fine di aumentare la quantità di RNA estratta (nell'estrazione dal lotto precedente la quantità di RNA ottenuta era sotto la soglia di rilevabilità con fluorimetro);
2. Eseguita una elettroforesi in campo pulsato, per avere un maggior dettaglio sulla dimensione del DNA genomico intero presente nel campione;
3. Utilizzata una modalità di misurazione per l'RNA più sensibile (Agilent RNA 6000 Pico Kit su Bioanalyzer Agilent).

L'estrazione del DNA genomico è stata effettuata con il kit Maxwell® 16 Blood DNA Purification Kit rivenduto dall'azienda Promega e con l'estrattore automatico Maxwell® 16 IVD (Promega), seguendo il protocollo del produttore. L'estrazione dell'RNA è stata fatta utilizzando il kit PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen) seguendo il protocollo del produttore.

Le quantità di partenza utilizzate per le estrazioni sono le seguenti, a partire da due fiale di prodotto dello stesso lotto:

- Estrazione DNA: 300µl su 500µl di sospensione iniettabile (fiala 1)
- Estrazione RNA: l'intero volume di polvere di una fiala è stato risospeso in 200 µl di soluzione fisiologica fornita nella confezione, invece che in 500 µl, e l'intero volume è stato utilizzato per l'estrazione dell'RNA (fiala 2).

La quantificazione e il controllo di qualità del DNA estratto è stata effettuata rispettivamente con il fluorimetro Qubit 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA) e con lo spettrofotometro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

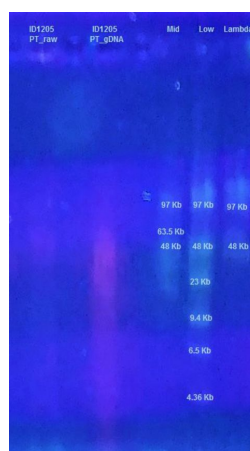
Di seguito il risultato delle quantificazioni del DNA (ND= NanoDrop 1000; QB= Qubit 2.0; HS= dsDNA HS Assay Kit)

Sample ID	ND A260/280	ND A260/230	QB_HS_ng/µL	volume_µl	Tot_amount_ng
DNA lot <b>A71CB256A</b>	1.95	2.12	40.8	55	2224

La misurazione della concentrazione del DNA con fluorimetro QuBit ha evidenziato che il lotto **A71CB256A**, contiene una quantità di **gDNA di 3.7 µg totali per dose da 0.5mL**, così calcolata:

40.8 ng/µl (concentrazione determinata al QuBit) x 55 (volume di risospensione finale del DNA dopo estrazione espresso in microlitri) x 5/3 (il volume di partenza sottoposto alla procedura di estrazione è sto di 300 µl su 500 µl di sospensione).

L'elettroforesi in campo pulsato (PFGE, 5-80Kb, corsa 14h in TBE 0.5x, 80V) del DNA estratto dal lotto A71CB256A, reso visibile grazie all'intercalante fluorescente SybrGreen, ha evidenziato la presenza di una ampia 'strisciata' di DNA genomico che arriva fino a pesi molecolari molto elevati, ma con una quantità rilevante di DNA nel range 20-60Kbp. In particolare nella foto sotto, il campione ID1205\_PT\_raw è il lisato del materiale contenuto nel vaccino prima della purificazione del DNA, mentre PT\_gDNA è il DNA genomico dopo estrazione; Mid, Low e Lambda sono 3 marcatori di peso molecolare commerciali.

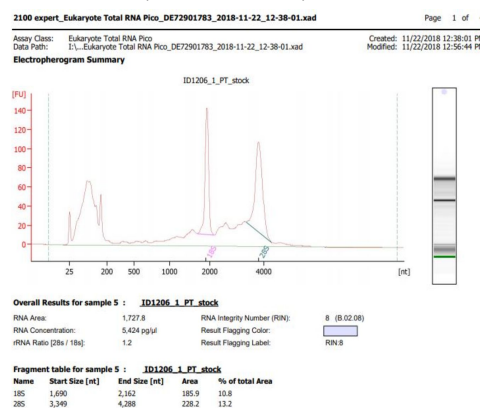


La quantificazione e il controllo di qualità dell'RNA estratto è stata eseguita su Agilent 2100 Bioanalyzer utilizzando l'Agilent RNA 6000 Pico Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Di seguito i valori di concentrazione, il RIN (RNA Integrity Number) misurati al Bioanalyzer:

Sample ID	Bioanalyzer_pico_totale_ng/µL	RIN	volume_µl	Tot_amount_ng
RNA lot <b>A71CB256A</b>	5	8	37	200.688

La quantità di RNA contenuta nella fiala di vaccino lotto **A71CB256A** è risultata essere di circa 200ng.

Il RIN pari a 8 indica un RNA di ottima qualità e un RNA eucariotico intatto, essendo presenti entrambi i picchi 18S e 28S tipici dell'RNA eucariotico:

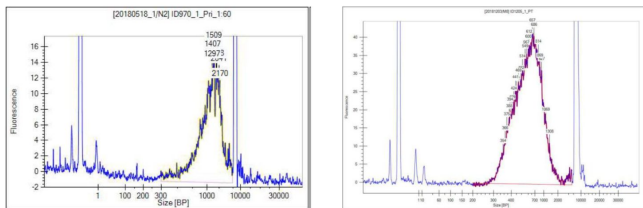


### Preparazione della libreria DNA-seq con tecnologia Illumina

Per la preparazione delle librerie è stato usato il kit Ovation® Ultralow System V4 1-96 (Nugen, San Carlos, CA) seguendo le indicazioni del produttore, a partire da 10ng di DNA genomico. Le librerie finali sono state quantificate con il

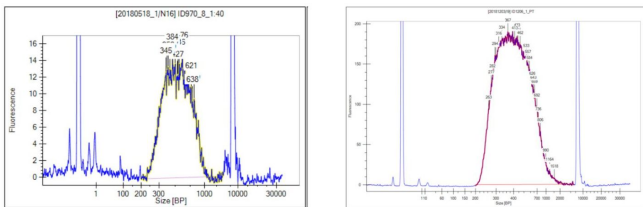


fluorimetro Qubit 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA) e testate per qualità con il sistema Caliper GX (PerkinElmer, Waltham, MA) per il lotto A71CB205A e Agilent 2100 Bioanalyzer, DNA High Sensitivity Analysis kit (Agilent technologies, Santa Clara, CA) per il lotto A71CB256A. Di seguito i tracciati per le due librerie ottenute:



### Preparazione della libreria RNA-seq con tecnologia Illumina

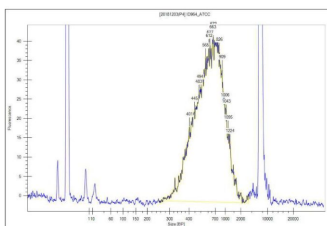
Per la preparazione delle librerie RNA-seq è stato usato il kit Ovation® RNA-Seq System V2 (Nugen, San Carlos, CA) per preparare il cDNA e il kit Ovation® Ultralow System V4 1–96 per preparare la libreria a partire da 10ng di cDNA. Le librerie finali sono state quantificate con il fluorimetro Qubit 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA) e testate per qualità con il sistema Caliper GX (PerkinElmer, Waltham, MA) per il lotto A71CB205A e Agilent 2100 Bioanalyzer, DNA High Sensitivity Analysis kit (Agilent technologies, Santa Clara, CA) per il lotto A71CB256A. Di seguito i tracciati per le due librerie ottenute:



**Lotto A71CB205A, libreria RNA-seq diluita 1:40  
corsa Caliper GX**

**Lotto A71CB256A, libreria RNA-seq  
corsa Bioanalyzer**

Al fine di validare il workflow di lavoro dalla preparazione della libreria fino all'analisi dei dati, è stato utilizzato uno standard ATCC (mix di DNA genomici a composizione nota, 20 Strain Staggered Mix Genomic Material, ATCC® MSA-1003TM) per costruire una libreria con il kit Ovation® Ultralow System V4 1–96 a partire da 10ng di DNA. Di seguito il tracciato al Bioanalyzer della libreria ottenuta:



### Sequenziamento

Le librerie sono state sequenziate su strumento Illumina HiSeq2500 in modalità 'paired-end 125bp', secondo le indicazioni standard Illumina. È stata utilizzata la versione 1.8.2 della pipeline Illumina CASAVA per processare le sequenze grezze.

### Analisi bioinformatica

#### Pulizia delle sequenze (trimming)

Le sequenze degli adattatori (cioè sequenze oligonucleotidiche 'artificiali' che vengono introdotte durante la preparazione della libreria Illumina) e delle basi di DNA lette a bassa qualità sono state rimosse usando i software **ERNE1** e **Cutadapt2**.

#### Identificazione degli organismi di origine delle sequenze di DNA e cDNA

L'analisi metagenomica è stata eseguita utilizzando il software **Kraken3** sul database 'Human-Virus-Bacteria\_25mer' (<https://ccb.jhu.edu/software/kraken/>).

Kraken è un classificatore che assegna etichette tassonomiche a brevi letture del DNA. Lo fa esaminando i k-mers all'interno di una lettura e interrogando un database con quei k-mers.

### Riferimenti bibliografici

1. Del Fabbro, C et al. 2013 An extensive evaluation of read trimming effects on Illumina NGS data analysis. Del Fabbro C, Scalabrin S, Morgante M, Giorgi FM. PLoS One. 2013 Dec 23;8(12):e85024. doi: 10.1371/journal.pone.0085024. eCollection 2013
2. Martin, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. EMBnet journal, [S.l.], 17 (1): 10-12 (2011). ISSN 2226-6089. Date accessed: 02 Apr. 2015. doi:<http://dx.doi.org/10.14806/ej.17.1.200> paper
3. Wood and Salzberg. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments Genome Biology 2014, 15:R46



## Risultati delle analisi DNA-seq e RNA-seq sui due lotto eseguite con il software Kraken

La presenza di DNA e RNA è espressa in termini di numero di reads e di percentuale di reads sul totale delle reads prodotte, attribuite dai database pubblici ai diversi organismi.

### Analisi DNA Lotto #1 A71CB205A (giugno 2018)

DNA Seq total reads 3.830.074

Classificazione		n° reads	% reads
▪ Homininae (Homo sapiens)		2.853.788	74%
▪ Viruses		538.112	14%
▪ Aves (Gallus gallus)		152.256	4%
▪ Proteobacteria (Bradyrhizobium) <sup>4</sup>		43.268	1%
▪ Unassigned		193.248	5%
<b>*Viruses classification</b>		<b>n° reads</b>	<b>% reads</b>
▪ dsDNA viruses		<b>538.112</b>	<b>14%</b>
	Human alphaherpesvirus 3	537.849	14%
▪ ssRNA viruses		<b>34</b>	<b>0,01%</b>
	Mumps rubulavirus	19	0.0005%
	Measles morbillivirus	12	0.0003%
	Rubella virus	3	0.00008%
▪ Microviridae <sup>5</sup>		<b>131</b>	<b>0.003%</b>
▪ Retroviridae		<b>26</b>	<b>0.0007%</b>
	Avian endogenous retrovirus EAV- HP	7	0.0002%
	Avian erythroblastosis virus	1	0.00003%
	Avian leukosis virus	5	0.0001%
	Human endogenous retrovirus HERV-K(II)	1	0.00003%
	Human endogenous retrovirus K	6	0.0002%
	Human endogenous retrovirus	3	0.00008%
▪ unclassified bacterial and environmental viruses		<b>4</b>	<b>0.0001%</b>

<sup>4</sup> <https://it.wikipedia.org/wiki/Proteobacteria>

<sup>5</sup> <https://en.wikipedia.org/wiki/Microviridae>



## Analisi RNA Lotto #1 A71CB205A

DNA Seq total reads **10.445.038**

Classificazione		n° reads	% reads
▪ Homininae (Homo sapiens)		9.036.993	87%
▪ Viruses		499.098	5%
▪ Platyhelminthes (Spirometra erinaceieuropaei)		57.805	0,6%
▪ Aves (Gallus gallus)		16.361	0,2%
▪ Unassigned		45.660	5%
<b>*Viruses classification</b>		<b>n° reads</b>	<b>% reads</b>
▪ dsDNA viruses		<b>497.498</b>	<b>5%</b>
	Human alphaherpesvirus 3	497.465	5%
▪ ssRNA viruses		<b>1.324</b>	<b>0,01%</b>
	Mumps rubulavirus	874	0.008%
	Measles morbillivirus	441	0.004%
	Rubella virus	7	0.00007%
▪ Microviridae		<b>247</b>	<b>0.002%</b>
▪ Retroviridae		<b>23</b>	<b>0.0002%</b>
	HERV-H/env60	9	0.0002%
	HERV-H/env62	2	0.00003%
	Human endogenous retrovirus K	6	0.0001%
	Human endogenous retrovirus	2	0.00003%
	Human immunodeficiency virus 1	3	0.0002%
	Alpharetrovirus (Avian viruses)	1	0.00008%
▪ unclassified bacterial and environmental viruses		<b>5</b>	<b>0.0001%</b>
▪ Hepatitis B virus		<b>1</b>	<b>0.00001%</b>



**Analisi DNA Lotto #2 A71CB256A**  
DNA Seq total reads **5.836.297**

Classificazione		n° reads	% reads
▪ Homininae (Homo sapiens)		5.150.674	88%
▪ Viruses		643.575	11%
▪ Unassigned		29.634	0,5%
<b>*Viruses classification</b>			
▪ dsDNA viruses		<b>643.549</b>	<b>11%</b>
	Human alphaherpesvirus 3	643.542	11%
▪ Retroviridae		<b>19</b>	<b>0.0003%</b>
	Avian endogenous retrovirus EAV-HP	13	0.0002%
	Mus musculus mobilized endogenous polytropic provirus	2	0.00003%
	Murine type C retrovirus	1	0.00002%
	Alpharetrovirus	1	0.00002%
▪ Bullavirinae		<b>5</b>	<b>0.00009%</b>
▪ Saccharomyces 20S RNA narnavirus		<b>1</b>	<b>0.00002%</b>
▪ Saccharomyces cerevisiae virus L-BC (La)		<b>1</b>	<b>0.00002%</b>

**Analisi RNA Lotto #2 A71CB256A**  
DNA Seq total reads **6.171.266**

Classificazione		n° reads	% reads
▪ Homininae (Homo sapiens)		4.210.032	68%
▪ Proteobacteria		336.053	5,5%
▪ Nematoda (Elaeophora elaphi)		92.290	1,5%
▪ Viruses		419.863	7%
▪ Unassigned		389.837	6%
<b>*Viruses classification</b>			
▪ dsDNA viruses		<b>418.104</b>	<b>7%</b>
	Human alphaherpesvirus 3	417.868	7%
▪ ssRNA viruses			0.01%
	Mumps rubulavirus	508	0.008%
	Measles morbillivirus	217	0.004%





	Rubella virus	Non Determ.	Non Determ.
	Influenza A virus	9	0.0001%
	Cupixi mammarenavirus	30	0.0005%
	Pneumoviridae	6	0.0001%
	Jamestown Canyon virus	12	0.0002%
	Hepacivirus C	30	0.0005%
	Kobuvirus	20	0.0003%
	Enterovirus	2	0.00003%
	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	3	0.00005%
	Coronavirinae	5	0.00008%
	Potyvirus	3	0.00005%
<b>■ Retroviridae</b>		<b>99</b>	<b>0.002%</b>
	Human immunodeficiency virus 1	36	0.0006%
	Human endogenous retrovirus K	16	0.0003%
	Simian immunodeficiency virus	1	0.00002%
	Equine infectious anemia virus	1	0.00002%
	Lymphoproliferative disease virus	25	0.0004%
	Avian leukosis virus	1	0.00002%
	Rous sarcoma virus	1	0.00002%
	HERV-H/env62	2	0.00003%
	Red clover bacilliform virus	2	0.00003%
<b>■ unclassified bacterial and environmental viruses</b>		<b>88</b>	<b>0.001%</b>
<b>■ dsRNA viruses</b>		<b>14</b>	<b>0.0002%</b>
Hepatitis B virus		2	0.00003%
unclassified RNA viruses ShiM-2016		9	0.0002%
Mollivirus sibericum		1	0.0002%

\*La libreria RNA-seq è stata successivamente sequenziata ad una profondità elevatissima (260.434.942 reads Illumina prodotte), solo al fine di evidenziare la presenza del virus della ROSOLIA. Sono state trovate 114 reads attribuibili al genoma della rosolia, corrispondenti ad una percentuale di reads pari allo 0.00004%.



Risultati dell' analisi DNA-seq eseguite con il software Kraken su uno standard genomico a composizione nota (20 Strain Staggered Mix Genomic Material, ATCC® MSA-1003TM)

DNA Seq total reads 4.969.245

Classificazione	n° reads	% reads	% declared by ATCC
▪ Acinetobacter baumannii	10.735	0,2%	0,18%
▪ Actinomyces odontolyticus	2	0,00004%	0,18%
▪ Bacillus cereus	176.327	3,5%	1,8%
▪ Bacteroides vulgatus	1.088	0,02%	0,02%
▪ Bifidobacterium adolescentis	489	0,01%	0,02%
▪ Clostridium beijerinckii	123.609	2,5%	1,8%
▪ Cutibacterium acnes	6.528	0,13%	0,18%
▪ Deinococcus radiodurans	745	0,02%	0,02%
▪ Enterococcus faecalis	704	0,01%	0,02%
▪ Escherichia coli	929.837	19%	18%
▪ Helicobacter pylori	4.738	0,1%	0,18%
▪ Lactobacillus gasseri	4.491	0,1%	0,18%
▪ Neisseria meningitidis	9.820	0,19%	0,18%
▪ Porphyromonas gingivalis	578.294	12%	18%
▪ Pseudomonas aeruginosa	152.307	3%	1,8%
▪ Rhodobacter sphaeroides	1.135.927	23%	18%
▪ Staphylococcus aureus	72.598	1,5%	1,8%
▪ Staphylococcus epidermidis	634.940	13%	18%
▪ Streptococcus agalactiae	31.622	0,6%	1,8%
▪ Streptococcus mutans	526.420	11%	18%
▪ Unassigned	14.248	0,3%	0%



### Dal confronto di questi due vaccini è possibile evidenziare le seguenti criticità:

Il Priorix Tetra è un vaccino con un'alta quantità di DNA estraneo contaminante di cui in media l'80% è umano, quindi proveniente dalle cellule MRC-5; nel Lotto #1 è presente anche il 4% di DNA proveniente dalle cellule embrionali di pollo; il restante 20% appartiene a virus (retrovirus, virus infettivi, e cancerogeni, fagi) e microorganismi avventizi quali batteri, e vermi; nel vaccino Priorix Tetra il DNA genomico umano è ad alto peso molecolare (>10.000bp) e la totale copertura in sequenza dell'intero genoma umano di riferimento (HG-19) **dimostra che è l'intero genoma delle cellule fetali utilizzate per la coltura dei virus vaccinici ad essere presente e non solo porzioni di esso.**

Dalla risposta dell'EMA al nostro quesito<sup>6</sup> sui limiti imposti ai residui di materiale genetico estraneo nei vaccini risulta che di fatto non ci sono dei limiti per ciascun vaccino ma solo per alcuni, riportati nelle monografie del prodotto; **il limite massimo previsto varia da 10 pg<sup>7</sup> a 10 ng**, sulla base del calcolo teorico della possibilità da parte del DNA genomico estraneo di causare mutazioni oncogeniche.

È da notare che le autorità regolatorie non richiedono che queste contaminazioni vengano testate nel prodotto finale, ma solo nella fase di preparazione iniziale, e che per i vaccini a virus attenuati la purificazione di queste contaminazioni sono un passaggio critico<sup>8</sup>. L'EMA non ha fornito studi specifici sulla pericolosità del DNA residuo fetale, che consentano di valutare il rischio per la salute umana di queste contaminazioni, perciò tale limite rimane ad oggi arbitrario.

*Nel Lotto #2 di Priorix Tetra il DNA fetale risulta circa 325 volte superiore al limite massimo di 10 ng e ben 325.000 volte superiore al limite minimo di 10 pg.*

Sulla questione del DNA umano contaminante, il World Health Institute in un documento ufficiale del 2011 dal titolo 'Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks' sostiene che ciò che è necessario prendere in considerazione rispetto all'rcDNA (DNA cellulare residuo) nei vaccini è:

- A. una riduzione della quantità del DNA contaminante durante il processo di fabbricazione;
- B. una riduzione della dimensione del DNA contaminante durante il processo di fabbricazione;
- C. una inattivazione chimica dell'attività biologica del DNA avvenuta durante il processo di fabbricazione.

Tenendo in considerazione le tre richieste descritte sopra, il prodotto è considerato dai loro organi regolatori (NRA) e laboratori di controllo (NLC), essere ad un livello di rischio accettabile riguardo la presenza di DNA dal substrato cellulare, sulla base di (a) e/o (b) e/o (c), quando i dati dimostrino che livelli adeguati di sicurezza sono stati raggiunti.

In particolare nei 2 lotti di vaccino Priorix Tetra testati ad oggi, il punto A. non si verifica perché la quantità è circa 140 volte superiore a quella raccomandata dall'FDA (in Briefing Document September 19, 2012: Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee Meeting) e dall'EMA, cioè ≤ 10ng per dose; il punto b) non si verifica perché il DNA è ad alto peso molecolare (la maggior parte > di 10.000 bp, come si può facilmente verificare utilizzando un semplice gel d'agarosio per il controllo della qualità del DNA estratto dal vaccino), cioè 50 volte superiore alla taglia raccomandata dall'FDA (200bp o inferiore). Infine nello stesso vaccino, il punto c) non si verifica perché, contenendo virus attenuati, un'eventuale inattivazione chimica del DNA, inattiverebbe anche i virus.

<sup>6</sup> Quesito EMA: <https://www.ivancatalano.eu/wp-content/uploads/2018/05/Letter.pdf>

<sup>7</sup> 10pg è la quantità indicativa di DNA contenuta in una cellula; ciò significa che nel vaccino è contenuta una quantità di DNA proveniente da ben 325.000 cellule fetali

<sup>8</sup> [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC500003322.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003322.pdf)

[http://www.who.int/biologicals/Cell\\_Substrates\\_clean\\_version\\_18\\_April.pdf](http://www.who.int/biologicals/Cell_Substrates_clean_version_18_April.pdf)

<http://www.who.int/biologicals/Molecular%20Methods%20Final%20Mtg%20Report%20April2005.pdf?ua=1>

<https://pdfs.semanticscholar.org/presentation/0be5/9fbc9c69baa35c0f24086936bc541809ebc6.pdf>



## Analisi delle Varianti Genetiche

Con la tecnologia Next Generation Sequencing è possibile ricostruire l'intera sequenza di genomi virali a DNA e RNA e di genomi batterici presenti nel campione e confrontarlo con i genomi di riferimento presenti nei database pubblici. La tecnologia può quindi anche permettere di monitorare nel tempo come e se muta la sequenza di un genoma virale o batterico durante la procedura di produzione di un vaccino.

Il risultato della chiamata delle varianti (singolo nucleotide e piccole inserzioni/delezioni) rispetto ai ceppi di riferimento reperibili nei database pubblici (NCBI, National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) effettuato nei campioni vaccinali contenenti virus o batteri vivi attenuati ha fornito i seguenti risultati:

### Campione 1. - Priorix Tetra

1. Il genoma del virus del **morbillo** contenuto nel vaccino è identico alla sequenza del **ceppo Edmonston Swartz** depositato nelle banche dati avente numero di accessione AF266291.1.  
Il numero di varianti rilevate è stato infatti pari a 0;
2. Il genoma del virus della **parotite** contenuto nel vaccino ha mostrato una singola mutazione rispetto al ceppo virale **Jeryl-Lynn** presente nelle banche dati pubbliche con il numero di accessione AF338106.1;
3. Il genoma del virus della **rosolia** non è stato rilevato;
4. Il genoma del virus della **varicella** contenuto nel vaccino ha mostrato quattro mutazioni rispetto al **Human herpesvirus 3** presente nelle banche dati pubbliche con il numero di accessione AB097932.1;

La sequenza degli antigeni/genomi virali è un dato strettamente confidenziale che non viene fornito dall'EMA. Non sono disponibili linee guida che regolamentano l'analisi delle mutazioni genetiche e lo studio degli effetti sulla salute umana.

L'elevata frequenza di mutazioni genetiche nei virus e nei batteri, nonché nel DNA delle linee cellulari in coltura, è un problema di grande rilevanza per quanto concerne la sicurezza, in quanto non è noto come le varianti eventualmente riscontrate possano modificare la capacità infettiva e la stimolazione del sistema immunitario verso reazioni autoimmuni.

Si porta ad esempio come l'Efsa richieda adesso la caratterizzazione genomica di ceppi di probiotici ad uso umano/animale e successivamente la dimostrazione della coincidenza, nel corso del tempo, della sequenza del microrganismo rispetto a quella dichiarata, mentre nel caso dei vaccini, come il Vivotif, sono tollerate ben 154 varianti genetiche rispetto a quella dichiarata nella scheda tecnica e presente nelle banche dati pubbliche come ceppo vaccinale di riferimento.

*La presenza di varianti genetiche in campioni vaccinali rispetto ai ceppi dichiarati può considerarsi a nostro avviso una non conformità dei farmaci.*

## Approfondimento

Nel recente articolo prepubblicato su F1000research “Do you cov me? Effect of coverage reduction on species identification and genome reconstruction in complex biological matrices by metagenome shotgun high-throughput sequencing” la tecnologia NGS è stata utilizzata per analizzare matrici biologiche di diverso tipo, tra cui anche due lotti del vaccino morbillo-parotite-rosolia-varicella PRIORIX TETRA (GlaxoSmithKline S.p.A), con lo scopo di dimostrare come, anche da un sequenziamento NGS a bassa copertura (cioè di qualche centinaio di migliaia di frammenti di sequenza a 1 milione), sia possibile caratterizzare la componente biologica in una matrice complessa. Il next-generation sequencing è stato già utilizzato su campioni vaccinali nella pubblicazione “Deep sequencing reveals persistence of cell-associated mumps vaccine virus in chronic encephalitis” per dimostrare la coincidenza tra il genoma del virus vaccinale della parotite e il virus ritrovato nel tessuto cerebrale di un bambino di 18 mesi affetto da SCID, deceduto per encefalite.

In particolare, nell'articolo prepubblicato su F1000research, si osserva come circa l'80% delle sequenze ottenute con tecnologia NGS sui due campioni vaccinali, sia costituita da DNA umano, quale impurezza presente nel processo di lavorazione; la quantità di DNA totale estraneo è di circa 2 microgrammi, proveniente dalla linea cellulare fetale umana MRC-5 utilizzata per fare crescere i virus della rosolia e della varicella). L'analisi metagenomica eseguita su questi due campioni evidenzia la potenziale presenza di DNA umano in tutti i vaccini contenenti virus cresciuti in linee fetali umane, peraltro già verificata con tecnologia diversa dall'NGS anche dalla D.ssa Deisher in “Epidemiologic and Molecular Relationship Between Vaccine Manufacture and Autism Spectrum Disorder Prevalence”.

Il gruppo della dr.ssa Theresa Deisher nell'articolo “Insertional mutagenesis and autoimmunity induced disease caused by human fetal and retroviral residual toxins in vaccines” afferma che i livelli di DNA residuo nei vaccini MPR, varicella ed epatite A disponibili negli Stati Uniti superano abbondantemente il limite previsto nell'attuale linea Guida OMS per il DNA proveniente da linee cellulari immortalizzate di 10 ng per dose di vaccino. Sebbene la linea guida EMA non preveda dei limiti massimi per il DNA fetale residuo nei vaccini, il gruppo della prof.ssa Deisher ha preso ugualmente come riferimento le dosi massime di 10 ng in conseguenza del fatto che i frammenti corti di DNA fetale presente nei vaccini presentano la capacità di integrarsi nel DNA dell'ospite e possono portare a mutagenesi e/o instabilità genomica così come una risposta autoimmune. Inoltre, è stata riscontrata in alcuni vaccini contro la varicella ed MPR la presenza di frammenti del Retrovirus umano endogeno K (HERVK), il quale può essere ri-attivabile e può facilitare l'integrazione del DNA libero nel genoma dell'ospite.

Come affermato dalla dr.ssa Deisher, la pericolosità dei frammenti retrovirali e del DNA diploide umano residuo non è stata ancora studiata nei destinatari del vaccino, sebbene la letteratura scientifica dimostri chiaramente l'alta probabilità di pericoli di mutagenesi autoimmune e/o inserzionale dovuta alla presenza di questi residui, e questo è un rischio per la salute umana che indubbiamente richiede una seria ricerca scientifica ed epidemiologica.

Questi risultati sono integrati con i nuovi dati sull'analisi di un nuovo campione di Priorix tetra e la rianalisi dei precedenti, in quanto è emersa una non conformità riguardante gli antigeni vaccinali e cioè la presenza dubbia dell'antigene della rosolia. Dall'analisi approfondita dei tre lotti è stato confermato che l'antigene della rosolia non è presente, in quanto il numero di copie per campione è del tutto trascurabile per avere un effetto immunostimolante.

Tale indagine più approfondita ha consentito di rilevare la presenza di DNA ed RNA avventizi, cioè proveniente da virus, batteri, funghi ed elminti in quantità sotto il limite di rilevabilità dello strumento, quindi in quantità residuali. Tuttavia, va sottolineato che la quantità media di DNA totale estraneo varia da 1.9 a 3.7 microgrammi, di cui circa l'80% proviene da DNA fetale umano e il restante 20% da DNA embrionale di pollo e di materiale genetico avventizio, quindi in quantità cumulativa non residuale.

Si fa presente che nei vari lotti è stata notata una notevole variabilità dei contaminanti avventizi, ma complessivamente sono state riscontrate le seguenti categorie di microrganismi avventizi:

▪ Batteri	▪ Proteobacteria
▪ Vermi	▪ Platyhelminthes ▪ Nematoda
▪ dsDNA viruses	▪ Virus della Varicella
▪ ssRNA viruses	▪ Virus della rosolia, della parotite e del morbillo ▪ Altri virus tra cui quello dell'Influenza A, Cupixi mammarenavirus, Pneumoviridae, Jamestown Canyon, Hepacivirus C, Kobuvirus Enterovirus, Porcine reproductive and respiratory syndrome virus
▪ Retrovirus	▪ retrovirus endogeni umani e aviari ▪ virus aviari ▪ virus dell'immunodeficienza umana e di scimmia ▪ virus murini



	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ virus dell'anemia infettiva del cavallo</li> <li>▪ virus della malattia linfoproliferativa</li> <li>▪ Rous sarcoma virus</li> </ul>
▪ Altri virus	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Human alphaherpesvirus 3</li> <li>▪ Epatite b virus</li> <li>▪ Virus del lievito</li> </ul>

### Riferimenti bibliografici

- Qin J, Li R, Raes J, et al.: A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature. Nature Publishing Group; 2010; 464(7285): 59–65
- Posada-Céspedes S, Seifert D, Beerwinkel N. Recent advances in inferring viral diversity from high-throughput sequencing data. Virus Res. 2017 Jul 15;239:17-32. doi: 10.1016/j.virusres.2016.09.016. Epub 2016 Sep 28. Review. PubMed PMID: 27693290.
- Cattonaro F, Spadotto A, Radovic S and Marroni F. Do you cov me? Effect of coverage reduction on species identification and genome reconstruction in complex biological matrices by metagenome shotgun high-throughput sequencing [version 1; referees: awaiting peer review]. F1000Research 2018, 7:1767 (<https://doi.org/10.12688/f1000research.16804.1>)
- Morfopoulou S, Mee ET, Connaughton SM, Brown JR, Gilmour K, Chong WK, Duprex WP, Ferguson D, Hubank M, Hutchinson C, Kaliakatsos M, McQuaid S, Paine S, Plagnol V, Ruis C, Virasami A, Zhan H, Jacques TS, Schepelmann S, Qasim W, Breuer J. Deep sequencing reveals persistence of cell-associated mumps vaccine virus in chronic encephalitis. Acta Neuropathol. 2017 Jan;133(1):139-147. doi: 10.1007/s00401-016-1629-y. Epub 2016 Oct 21. PubMed PMID: 27770235; PubMed Central PMCID: PMC5209397.
- Deisher TA, Doan NV, Koyama K, Bwabye S. Epidemiologic and Molecular Relationship Between Vaccine Manufacture and Autism Spectrum Disorder Prevalence. Issues Law Med. 2015 Spring;30(1):47-70. PubMed PMID: 26103708.
- Jarzyna P, Doan NV, Deisher TA. Insertional mutagenesis and autoimmunity induced disease caused by human fetal and retroviral residual toxins in vaccines. Issues Law Med. 2016 Fall;31(2):221-234. PubMed PMID: 29108182.

