

Vaccinegate:

Report stupefacente APDB in campione Gardasil 9



Presentazione in breve dei risultati

Nell'analizzare il vaccino anti papilloma virus Gardasil 9, sotto l'aspetto metagenomico e chimico, avevamo riscontrato molte non conformità che, a nostro avviso, dovrebbero imporre un'analisi da parte delle autorità. Quantomeno, andrebbero fatte secondo il nostro modesto parere delle verifiche dei lotti da noi analizzati e il ritiro immediato qualora venissero confermati i nostri dati, nonché una più ampia rivalutazione delle analisi da compiere su tutti i vaccini in commercio.

Da ciò che avevamo potuto evincere le problematiche erano, sotto il profilo metagenomico, la presenza di materiale genetico avventizio presente, come:

- Batteri
- DNA umano e di topo
- Virus avventizi quali fagi, retrovirus, batteri e lieviti

Oltre a ciò, ci aveva colpiti la presenza di frammenti L1 del virus del papilloma. Tali frammenti non dovrebbero essere presenti nel vaccino perchè il virus del papilloma è cancerogeno e la loro presenza insieme all'alluminio adiuvante è ritenuta la causa di alcune delle reazioni avverse gravi nei danneggiati.

Le stesse analisi chimiche, anche se sconvolgenti per il numero di potenziali contaminanti non residuali trovati, avevano lasciato un enorme punto di domanda. La strumentazione utilizzata nei laboratori da noi identificati, ci dava 338 segnali di cui solo il 22% noto. Mentre a molti è sembrato incredibile l'elenco dei composti probabili identificati, in realtà a noi creava enorme interesse il restante 78% non noto.

Dallo studio di questo 78% non noto, è partito un ulteriore approfondimento e, dopo ripetute analisi eseguite in due differenti laboratori e con due strumentazioni diverse (cd interlab), possiamo oggi dirvi che un segnale da noi riscontrato, rispetto a tre banche dati consultate, ci porta a determinare che in alcuni lotti di Gardasil 9, in particolare nel lotto R009338, si trova una contaminazione corrispondente ad uno stupefacente detto "APDB".

Per le attuali norme vigenti i nostri laboratori non potevano acquistare lo standard analitico certificato dell'amfetamina APBD: essendo appunto uno stupefacente non è acquisibile da soggetti non provvisti di apposita autorizzazione, pertanto attualmente è stato impossibile determinare con assoluta certezza che il segnale sia proprio l'amfetamina APDB. Tuttavia la corrispondenza degli spettri di frammentazione in più banche dati con questa molecola ci dà un grado molto elevato di probabilità.

Per questo motivo, prima di divulgare il presente report abbiamo in data odierna depositato una segnalazione al Comando Carabinieri per la Tutela della Salute (NAS), affinché possano verificare i nostri risultati con lo standard analitico (che ovviamente loro, a differenza di un privato, possono procurarsi ed utilizzare), e nei prossimi giorni aggiorneremo anche l'esposto "originario" già depositato ad agosto 2018 presso la Procura della Repubblica di Roma.



Report amfetamina APDB in campione Gardasil 9

Stato del lavoro svolto

E' stata utilizzata la metodica SANIST-CIMS, ¹⁻³ per eseguire una verifica intercentro della presenza di uno spettro di frammentazione (MS/MS) potenzialmente associabile allo stupefacente denominato **APDB**. ⁴

Materiali e metodi

Le analisi sono state effettuate utilizzando la SOP - Analisi AMCO urine a singolo step (Ver. 1.1 del 20/06/2018)

Strumenti

- MicroPipette Gilson (P200 e P20)
- Puntali per Pipette (METTLER TOLEDO, RAININ Racked Tips 20-250 µl)
- Vials coniche in Plastica da 300 µl (VWR, Microvials PP, cat.n° 548-0440)
- Tappini in plastica (tagliati con bisturi, VWR, Screw cap PP blue, cat n° 548-0896)
- Colonna Cromatografica: Phenomenex Luna C18 50X2.0mm (P. size 3 µm)

Sostanze

- ESI Tuning-mix Solution
- AGILENT (cod. G2431A)
- Acqua Osmotizzata (generatore interno)
- CH3CN (Sigma-Aldrich, cod. 34851-1L)
- Acido Formico (Amresco, cod. 0961-100ML)

Strumentazione

- MS (Bruker HCT-Ultra)
- MS (ThermoFisher, TSQ vantage)
- LC (HPLC- Dionex Ultimate 3000)

Campioni

Vaccino **Gardasil 9** lotto n. **R009338**. Dopo le analisi è stata conservata un aliquota del campione originale di volume pari a 100 µL.

Preparazione dei campioni

- 200 µL del vaccino devono essere centrifugati a 13 000 g per 10 minuti prima dell'esecuzione della procedura preparatoria.
- Sono stati prelevati 95 µL del surnatante e trasferiti in un vial con riduttore precedentemente siglato.
- Vengono aggiunti 5 µl della soluzione Agilent ESI Tuning Mix.
- Aggiungere nella vial contenente il campione 100 µl di H2O in modo da ottenere una diluizione 1:1



- Chiudere il vial con il tappino in plastica.
- Posizionare il vial nel rack dell'autosampler controllando che non vi siano bolle.

N.B. Il Bianco è preparato utilizzando la medesima procedura impiegata nel caso del campione trattato

STEP di Corsa cromatografica ed analisi MS

Setup Strumentale

Spettrometro di massa

- Le corse cromatografiche sono state acquisite in duplicato ed in modalità di acquisizione positiva.
- L'acquisizione è stata effettuata in modalità tandem mass spectrometry (MS/MS) frammentando lo ione avente rapporto m/z 178.1.

Dettagli della Corsa Cromatografica

A Fase mobile	H ₂ O + 0.2% Acido Formico
C Fase mobile	CH ₃ CN
Colonna	Phenomenex Luna C18 50 x 2.0 mm (P. size 3 µm)
Volume iniettato	15 µL

Gradiente		
Tempo (minuti)	%C	Flusso (mL/min)
0	2%	0.250
2.5	2%	0.250
3	80%	0.250
6	80%	0.250
7	2%	0.250
15	2%	0.250

Elaborazione dei Dati

- Terminate le corse, gli spettri di frammentazione sono stati estratti in formato *.MGF.
- Gli spettri ottenuti sono stati importati sul software di ricerca mzCloud (<https://www.mzcloud.org/>).
- Per eseguire la ricerca sono state utilizzate le banche dati NIST e HighChem.



Risultati e discussioni

E' stato rilevato un picco cromatografico associabile allo ione molecolare avente rapporto m/z 178 Figura 1. Lo spettro di frammentazione associabile a quest'ultimo è mostrato nella Figura 2. Dalla ricerca in banca dati effettuata caricando lo spettro MS/MS nel motore di ricerca mzCloud (<https://www.mzcloud.org/>) è stata ipotizzata la presenza del composto APDB (Figura 3). Lo score statistico di riconoscimento è risultato pari a 80.7 %. Non è stato possibile estrapolare la forma isomerica/isobarica, associata al composto, dall'analisi. Cio' e' stato dovuto al fatto che gli spettri di frammentazione, presenti in banca dati non sono discriminativi a livello isomerico/isobarico. Si specifica il fatto che, l'analisi è stata eseguita senza l'ausilio di standard analitici certificati. Infatti, essendo il composto APDB classificabile come stupefacente, non è acquisibile da soggetti non provvisti di apposita autorizzazione.

Figura 1: Cromatogramma di estrazione ionica ottenuto frammentando lo ione molecolare ad m/z 178.1

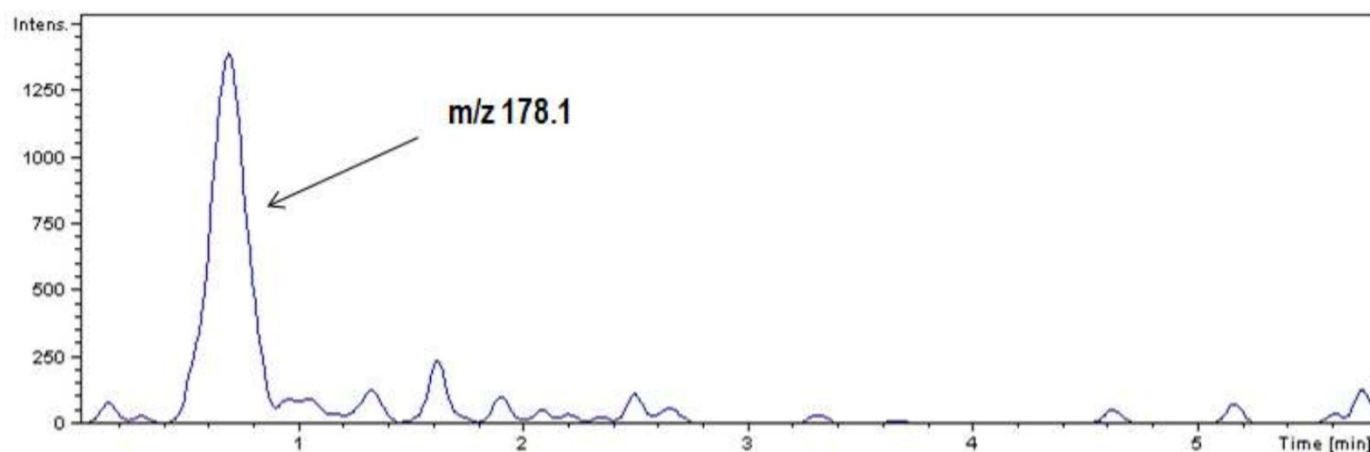


Figura 2: Spettro di frammentazione MS/MS relativo allo ione ad m/z 178.1

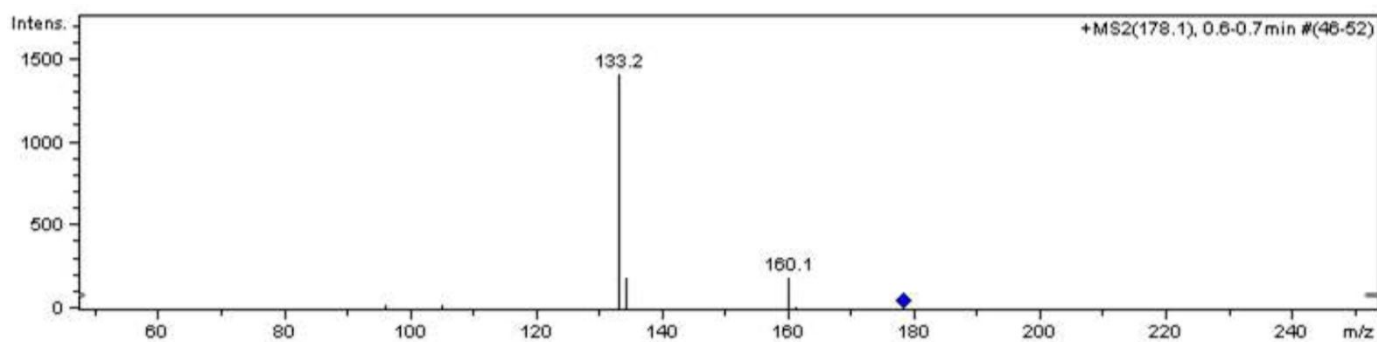
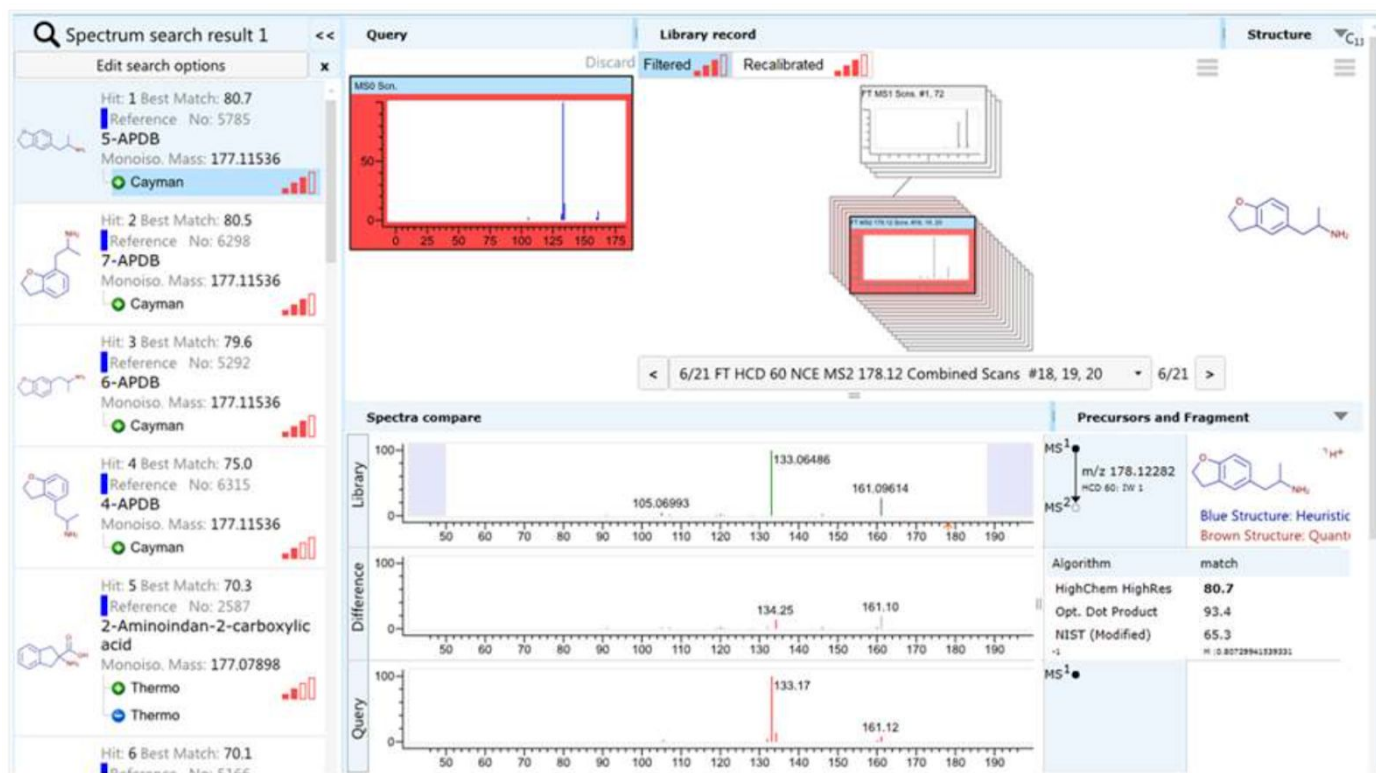


Figura 3: Ricerca in libreria effettuata utilizzando il motore mzCloud (<https://www.mzcloud.org/>).



Conclusioni

Da un'analisi eseguita mediante la tecnica liquido cromatografica accoppiata alla spettrometria di massa, impostata in modalità tandem (LC-MS/MS), è stato rilevato un segnale analitico il cui spettro di frammentazione è stato sottoposto ad una ricerca in banca dati utilizzando il motore mzCloud (<https://www.mzcloud.org/>).

I dati ottenuti sono stati eseguiti utilizzando due spettrometri di massa operanti in condizioni di scansione chimico fisica differenti (Trappola ionica e Triplo quadrupolo).

Riferimenti Bibliografici

1. Albini A, Briga D, Conti M, Bruno A, Farioli D, Canali S, Sogno I, D'Ambrosio G, Consonni P, Noonan DM. SANIST: a rapid mass spectrometric SACI/ESI data acquisition and elaboration platform for verifying potential candidate biomarkers. Rapid Commun Mass Spectrom. 2015 Oct 15;29(19):1703-10. doi: 10.1002/rcm.7270.
2. Cristoni S, Dusi G, Brambilla P, Albini A, Conti M, Brambilla M, Bruno A, Di Gaudio F, Ferlin L, Tazzari V, Mengozzi S, Barera S, Sialer C, Trenti T, Cantu M, Rossi Bernardi L, Noonan DM. SANIST: optimization of a technology for compound identification based on the European Union directive with applications in forensic, pharmaceutical and food analyses. J Mass Spectrom. 2017 Jan;52(1):16-21. doi: 10.1002/jms.3895.



3. Arzoni A, Bernardi LR, Cristoni S. In-source cloud ion mobility mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 2015 Apr 15;29(7):690-4. doi: 10.1002/rcm.7136.
4. Park JS, Rehman SU, Kim IS, Choi MS, Lee JS, In S, Yoo HH. Tentative identification of in vitro metabolites of 5-APDB, a synthetic benzofuran, by LC-Q/TOF-MS. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2016 Oct 15;1033-1034:296- 300. doi: 10.1016/j.jchromb.2016.08.043.

