

Vaccinegate:

Report analisi metagenomiche su Hexyon



Presentazione in breve dei risultati

Con queste analisi siamo arrivati alla conclusione dello screening di primo livello del vaccino Hexyon

Punti focali dei risultati

Analisi del DNA:

- **DNA proveniente dalle colture batteriche utilizzate per la produzione delle tossine (difterite, tetano e pertosse) e degli antigeni dell'*Haemophilus influenzae* B:** questo DNA è immunogeno ed è in grado di stimolare la formazione di citochine infiammatorie e quindi contribuire ad una consistente infiammazione sia nel sito d'iniezione che sistemica. Si pone il quesito se tali frammenti siano potenzialmente in grado di causare reazioni autoimmuni e integrarsi nel DNA umano causando mutazioni. Poiché è presente nel vaccino anche alluminio adiuvante, con molta probabilità questi frammenti sono legati all'alluminio, che ne protegge la degradazione potenziandone l'effetto biologico e tossicologico, ancora largamente sconosciuti.
- **DNA di scimmia Cercopithecidae:** questo DNA può essere derivato dalle cellule Vero, cioè immortalizzate. Questo DNA si trova in tracce ed è degradato, quindi non dovrebbe essere in grado di integrarsi nel DNA ospite. Resta il fatto che la sua presenza è una prova della reazione incompleta della formaldeide e glutaraldeide sul materiale genetico, che dovrebbe essere invece completamente distrutto, e la presenza dell'alluminio, come per l'altro materiale genetico, può renderlo stabile alla degradazione nel tempo, ampliando i potenziali effetti tossici.

Analisi dei Virus avventizi:

- **Fagi:** fago del tetano (*Clostridium phage phiCT453A*). Può potenzialmente causare malattie autoimmuni, soprattutto se legato all'alluminio.
- **Vettori utilizzati per il clonaggio, tra cui il vettore dell'SV40:** questi sono frammenti di RNA che provengono con molta probabilità dal processo di produzione dell'antigene dell'epatite B NB: in questo caso l'SV40 non è il virus avventizio che si trovava nel vaccino della polio attenuato, ma un vettore utilizzato normalmente per la ricombinazione genetica per la produzione di vaccini ingegnerizzati. La tossicologia di questi frammenti non è nota ma, se sono utilizzati per integrare frammenti di materiale genetico, potrebbero anche loro integrarsi nel DNA ospite. Poiché la quantità è molto ridotta l'effetto biologico non è impossibile da definire. Resta sembra l'impossibilità di definire la tossicità di questa contaminazione legata all'alluminio.

Analisi dell'RNA:

- **RNA proveniente dalle colture batteriche utilizzate per la produzione delle tossine (difterite, tetano e pertosse) e degli antigeni dell'*Haemophilus influenzae* B:** vale quanto detto sopra per il DNA. In realtà si tratta di DNA ed RNA batterici parzialmente degradati per l'effetto della formaldeide, e quindi non è possibile da questi dati comprendere se sono in grado di integrarsi nel DNA, mentre è molto probabile che siano in grado di causare infiammazione persistente e autoimmunità.
RNA di scimmia: l'RNA potrebbe essere in grado di formare proteine, ma queste non sono state rilevate in spettrometria di massa (o perché sotto il limite dei nanogrammi, o perché legate all'alluminio e quindi non sequenziabili e non identificabili, o perché questo RNA non è funzionante). Come per l'RNA batterico può legarsi all'alluminio e causare autoimmunità e infiammazione.
- **Poliovirus 1 e 2:** si suppone che siano disattivati dalla formaldeide e quindi non infettivi, tuttavia vale sempre il quesito: legati all'alluminio possono risultare neurotossici? Nella scheda tecnica si scrive che la potenza del poliovirus è definita dall'efficacia dell'antigene D. La risposta ricevuta da EMA (sempre in riferimento alle nostre prime analisi di agosto 2018) fa capire che non si dovrebbero più riscontrare i genomi dei virus.

Conclusioni

Nel complesso questa analisi ci dice che rispetto all'Infanrix hexa (l'altro esavalente analizzato) il trattamento con formaldeide è molto più blando, ed è presente materiale genetico proveniente dalle colture di partenza, che non dovrebbe proprio esserci. Questo può comportare un potenziale rischio per autoimmunità, infiammazione locale e sistemica, mutazioni genetiche.



Bibliografia

- J Am Soc Nephrol. 2004 Dec;15(12):3207-14. Short bacterial DNA fragments: detection in dialysate and induction of cytokines. Schindler R1, Beck W, Deppisch R, Aussieker M, Wilde A, Göhl H, Frei U.
- PLoS Genet. 2013;9(10):e1003877. A review of bacteria-animal lateral gene transfer may inform our understanding of diseases like cancer. Robinson KM1, Sieber KB, Dunning Hotopp JC.
- PLoS Comput Biol. 2013;9(6):e1003107. Bacteria-human somatic cell lateral gene transfer is enriched in cancer samples. Riley DR1, Sieber KB, Robinson KM, White JR, Ganesan A, Nourbakhsh S, Dunning Hotopp JC.
- PLoS One. 2017 Aug 11;12(8):e0182909. Comparative pathogenomics of Clostridium tetani. Cohen JE1, Wang R2, Shen RF2, Wu WW2, Keller JE1.
- Front Microbiol. 2018 Jun 27;9:1394. Beyond Bacteria: Bacteriophage-Eukaryotic Host Interactions Reveal Emerging Paradigms of Health and Disease. Chatterjee A1, Duerkop BA1.



Report analisi metagenomiche su Hexyon

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 - N3F138V

Nome prodotto:	Hexyon
Tipo di prodotto:	Vaccino difterite, tetano, pertosse, epatite B, poliomielite, Haemophilus influenzae tipo b.
Produttore:	Sanofi-Aventis GmbH
Composizione: ¹	Tossoidi: difterico e tetanico; antigeni Bordetella pertussis (tossoido Bordetella, emoagglutinina filamentosa); antigeni ricombinanti (prodotti in cellule di Saccharomyces) di superficie per epatite B; polisaccaride dell' H. influenzae; 3 tipi di Virus poliomielite (ssRNA) inattivati: tipo 1 (ceppo Mahoney)-tipo 2 (ceppo MEF-1)-tipo 3 (ceppo Saukkett), propagati in cellule VERO (scimmia) + dichiarate sostanze chimiche, aminoacidi essenziali, saccarosio e antibiotici.

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.

¹ <https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/bancadatifarmaci/farmaco?farmaco=042817>



Metodi e risultati

Estrazione DNA e RNA Hexyon lot. N3F138V

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.

La polvere contenuta nella fiala è stata risospesa in 500ul di soluzione fornita nella siringa assieme prodotto. Le quantità di partenza utilizzate per le estrazioni sono le seguenti:

- Estrazione DNA: 200 µl di sospensione iniettabile
- Estrazione RNA: 200 µl di sospensione iniettabile

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 N3F138V	0,79	0,74	0,05	55	2,75

La misurazione della concentrazione del DNA con fluorimetro Qubit ha evidenziato che Hexyon lotto N3F138V, contiene una quantità di gDNA di **circa 6,88 ng totali per dose**, così calcolata:

0.05 ng/µl (concentrazione determinata al Qubit) x 55 (volume di risospensione finale del DNA dopo estrazione, espresso in microlitri) x 2.5 (volume totale risospensione della polvere nella fiala/volume utilizzato per l'estrazione).

La quantificazione 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 e il RIN (RNA Integrity Number) misurati al Bioanalyzer:

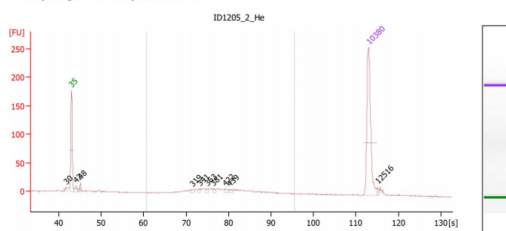
Sample ID	Bioanalyzer_pico_totale_ng/µl	RIN	volume_µl	Tot_amount_ng
RNA lot N3F138V	1,09	8,7	37	40,33

La **quantità di RNA** contenuta nella fiala di vaccino Hexyon lotto N3F138V è risultata essere di circa **100,8 ng**, così calcolata: 1,09 ng/µl (concentrazione determinata al Bioanalyzer) x 37 (volume di risospensione finale dell'RNA dopo estrazione, espresso in microlitri) x 2.5 (volume totale risospensione della polvere nella fiala/volume utilizzato per l'estrazione).

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. La libreria finale è stata quantificata con il fluorimetro Qubit 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA) e testata per qualità con il sistema Agilent 2100 Bioanalyzer, DNA High Sensitivity Analysis kit (Agilent technologies, Santa Clara, CA). Di seguito il tracciato della libreria ottenuta:

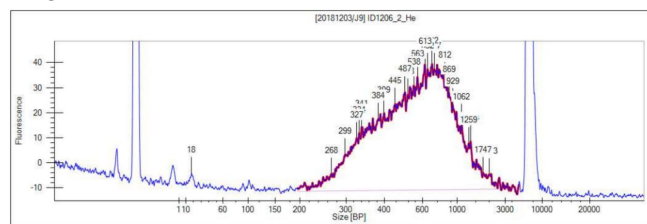
2100 expert_High Sensitivity DNA Assay_DEDAE00530_2018-12-04_10-45-54.xad Page: 2 of 6
Assay Class: High Sensitivity DNA Assay
Data Path: E:_2100_Sensitivity DNA Assay_DEDAE00530_2018-12-04_10-45-54.xad Created: 12/4/2018 10:45:53 AM
Electropherogram Summary Continued ... Modified: 12/7/2018 4:28:04 PM



Preparazione della libreria RNA-seq con tecnologia Illumina

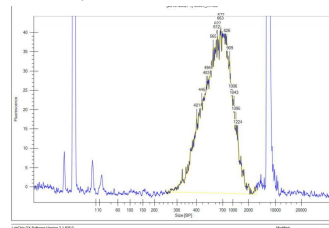
Per la preparazione delle librerie RNA-seq è stato usato il kit Ovation® RNA-Seq System V2 (Nugen, San Carlos, CA) per preparare il cDNA e il kit Ovation® Ultralow System V4 1–96 per preparare la libreria a partire da 10ng di cDNA. La libreria finale è stata quantificata con il fluorimetro Qubit 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA) e testata per qualità con il sistema Caliper GX (PerkinElmer, Waltham, MA).

Di seguito il tracciato della libreria ottenuta:



Preparazione di una libreria DNA-seq con tecnologia Illumina da un mix di DNA genomici di una comunità metagenomica a composizione nota

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-1003™) per costruire una libreria con il kit Ovation® Ultralow System V4 1–96 a partire da 10ng di DNA. Di seguito il tracciato su Caliper GX (PerkinElmer, Waltham, MA) 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.

Sono state prodotte 6.064.812 sequenze paired-end Illumina pari a 3.032.406 frammenti/reads identificative per la libreria DNA-seq; 8.649.434 sequenze paired-end Illumina pari a 4.324.717 frammenti/reads identificative per la libreria RNA-seq; 9.938.490 sequenze paired-end Illumina pari a 4.969.245 di frammenti/reads identificative per la libreria DNA-seq costruita a partire dal DNA dello standard Mix Genomic Material, ATCC® MSA-1003.

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/RNA con il software Kraken.

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

Le sequenze classificate con software Kraken sono state inoltre confermate manualmente con il software BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

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

Hexyon lot. N3F138V – analisi DNA

DNA Seq total fragments/reads	3032406		
Classification		n° reads	% reads
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> (Diphtheria)		596	0.02%
<i>Clostridium tetani</i> (Tetanus)		6306	0.2%
<i>Bordetella pertussis</i> (Pertussis)		380	0.01%
<i>Haemophilus influenzae</i>		103	0.003%
Pan		1798	0.06%
Cercopithecidae		3795	0.1%
Viruses*		1615	0.05%
*Viruses classification		n° reads	% reads
dsDNA viruses		255	0.008%
	Clostridium phage phiCT453A	236	0.007%
	cloning vectors and others (SV40 vector)	19	0.0006%



Hexyon lot. N3F138V – analisi RNA

RNA Seq total fragments/reads	4324717		
Classification		n° reads	% reads
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> (Diphtheria)		12	0.0003%
<i>Clostridium tetani</i> (Tetanus)		327	0.008%
<i>Bordetella pertussis</i> (Pertussis)		7345	0.2%
<i>Haemophilus influenzae</i>		87	0.002%
Viruses*		9334	0.2%
Cercopithecidae		2293	0.05%
*Viruses classification		n° reads	% reads
ssRNA viruses	1468		
	Human poliovirus 1	446	0.01%
	Human poliovirus 2	221	0.007%



**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-1003™)**

DNA Seq total fragments/reads	4,969,245		
Classification	n° reads	% reads	% declared by ATCC
Acinetobacter baumannii	10735	0,2%	0,18%
Actinomyces odontolyticus	2	0,00004%	0,18%
Bacillus cereus	176327	3,5%	1,8%
Bacteroides vulgatus	1088	0,02%	0,02%
Bifidobacterium adolescentis	489	0,01%	0,02%
Clostridium beijerinckii	123609	2,5%	1,8%
Cutibacterium acnes	6528	0,13%	0,18%
Deinococcus radiodurans	745	0,02%	0,02%
Enterococcus faecalis	704	0,01%	0,02%
Escherichia coli	929837	19%	18%
Helicobacter pylori	4738	0,1%	0,18%
Lactobacillus gasseri	4491	0,1%	0,18%
Neisseria meningitidis	9820	0,19%	0,18%
Porphyromonas gingivalis	578294	12%	18%
Pseudomonas aeruginosa	152307	3%	1,8%
Rhodobacter sphaeroides	1135927	23%	18%
Staphylococcus aureus	72598	1,5%	1,8%
Staphylococcus epidermidis	634940	13%	18%
Streptococcus agalactiae	31622	0,6%	1,8%
Streptococcus mutans	526420	11%	18%
Unassigned	14248	0,3%	0%



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, Beerenwinkel 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.

