

NOTE SULLA TOSSICITA' DI HEXAVAC

Il vaccino Hexavac è un farmaco prodotto dalla Sanofi Pasteur ed autorizzato all'immissione in commercio dall'EMA il 23.10.2000, sospeso dalla commercializzazione in via preventiva dall'EMA il 17.11.2005 e poi ritirato definitivamente su richiesta della ditta produttrice stessa il 28.6.2012; si tenga presente che l'EMA ha autorizzato l'immissione in commercio del vaccino esavalente Hexyon il 17.4.2013 prodotto sempre dalla Sanofi Pasteur; l'altro farmaco esavalente presente tuttora sul mercato è l'Infanrix Hexa prodotto dalla GlaxoSmithKline Biologicals e autorizzato all'immissione in commercio il 23.10.2000. ¹

Il motivo dichiarato dall'EMA per il ritiro del farmaco è il seguente:

“L'Agenzia europea per i medicinali (EMA) raccomanda come misura precauzionale la sospensione dell'autorizzazione all'immissione in commercio di Hexavac a causa di dubbi riguardanti la protezione a lungo termine contro l'epatite B. Hexavac è un vaccino per neonati e bambini contro la difterite, il tetano, la pertosse, il virus dell'epatite B, il virus della polio ed Haemophilus influenzae di tipo b.

La raccomandazione è stata fatta dal Comitato dell'Agenzia per i medicinali per uso umano (CHMP), nella riunione del 12-15 settembre 2005 a seguito dell'identificazione di una diminuita immunogenicità (capacità di un vaccino di stimolare una risposta immunitaria) del componente dell'epatite B. Questo potrebbe essere dovuto alla variabilità nel processo di produzione per il componente dell'epatite B nel vaccino, che potrebbe portare ad una diminuzione della protezione a lungo termine contro l'epatite B.

Questa cautela non riguarda la protezione contro la difterite, il tetano, la pertosse, la poliomielite e l'Haemophilus influenzae di tipo b” ²

Tale misura cautelativa è stata recepita e comunicata il giorno stesso dall'AIFA. ³

Il ritiro dal mercato in realtà segue uno studio epidemiologico retrospettivo che ha segnalato un aumento di morti in culla in neonati vaccinati con vaccini esavalenti; l'EMA ha risposto con un parere emesso nel 2003 in cui, pur rilevando un'associazione temporale tra vaccinazione e decessi, stabiliva la mancanza di un'associazione causale e di un rischio per la salute ⁴; tale parere però è stato fortemente contestato come si vedrà successivamente.

¹ Riassunto delle caratteristiche del prodotto dei vaccini esavalenti

1a EPAR Hexavac

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000298/WC500074582.pdf

1b RCP Infanrix Hexa

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000296/WC500032501.pdf

1c RCP Hexyon

http://www.ema.europa.eu/docs/it_IT/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002796/WC500145758.pdf

² European Medicines Agency recommends suspension of Hexavac Press release 20.09.2005

http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news_and_events/news/2009/12/news_detail_000855.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c1

³ Comunicato Stampa n°16 del 20.9.2005 AIFA: Sospeso dal commercio vaccino esavalente Hexavac

<http://www.agenziafarmaco.gov.it/sites/default/files/comunicatistampa/cs16.pdf>

⁴ EMA public statement: EMA update on hexavalent vaccines: Hexavac and Infanrix Hexa

Ne segue che per comprendere la motivazione legata alla sospensione dell'Hexavac è necessario approfondire i dati sull'**efficacia e la sicurezza** del vaccino.

STUDI SULL'EFFICACIA di HEXAVAC

Esaminiamo ora l'aspetto dell'**efficacia riguardante l'antigene dell'epatite B**:

In letteratura sono presenti alcuni studi che dimostrano un'efficacia ridotta del vaccino Hexavac rispetto ad Infanrix ⁵; in particolare uno studio del 2010 ⁶ ha dimostrato che su una media di 2.4 anni dopo la vaccinazione il 25.3% dei vaccinati con Hexavac presentava un livello di anticorpi anti-HBs <10 mIU/ml (95% CI 19.0-32.8), cioè ritenuto non protettivo, rispetto al 4.7% dei vaccinati con Infanrix hexa.

Inoltre, questi bambini avevano una risposta significativamente diminuita ad un successivo richiamo, rispetto ai bambini con maggiori titoli anticorpali dopo la prima somministrazione.

Poiché il picco del titolo anticorpale raggiunto dopo la prima somministrazione e dopo il richiamo, condiziona la durata del periodo durante il quale le concentrazioni rimangono entro l'intervallo di protezione (cioè con un livello di anticorpi anti-HBs > 10 mIU/ml), si è ipotizzato che una percentuale di bambini immunizzati con Hexavac non abbia ottenuto una protezione sufficiente contro l'epatite B durante l'adolescenza e l'età adulta. Di conseguenza, il vaccino venne ritirato dal mercato a scopo precauzionale per l'uso nei bambini. Inoltre, anche se l'Agenzia europea per i medicinali non ordinò la rivaccinazione

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Public_statement/2010/01/WC500059303.pdf

⁵ Epidemiol Infect. 2010 Nov;138(11):1621-9.

Low hepatitis B immunogenicity of an hexavalent vaccine widely used in Germany: results of the German Health Survey for Children and Adolescents, 2003-2006.

Jorgensen P¹, Poethko-Müller C, Hellenbrand W, Jilg W, Thierfelder W, Meyer C, an der Heiden M, Schlaud M, Radun D.

Hum Vaccin. 2006 Nov-Dec;2(6):249-54.

Persistence of antibodies in children primed with two different hexavalent diphtheria, tetanus, acellular pertussis, hepatitis B, inactivated poliovirus and Haemophilus influenzae type B vaccines and evaluation of booster vaccination.

Tichmann I¹, Grunert D, Habash S, Preidel H, Schult R, Pflutschinger U, Gildberg PK, Meurice F, Sängler R.

Clin Microbiol Infect. 2014 May;20 Suppl 5:76-85.

Hexavalent vaccines for immunization in paediatric age.

Esposito S¹, Tagliabue C, Bosis S, Ierardi V, Gambino M, Principi N.

⁶ Epidemiol Infect. 2010 Nov;138(11):1621-9.

Low hepatitis B immunogenicity of an hexavalent vaccine widely used in Germany: results of the German Health Survey for Children and Adolescents, 2003-2006.

Jorgensen P¹, Poethko-Müller C, Hellenbrand W, Jilg W, Thierfelder W, Meyer C, an der Heiden M, Schlaud M, Radun D.

immediata dei bambini che avevano ricevuto l'Hexavac, alcune autorità sanitarie raccomandarono la somministrazione di una dose di richiamo del vaccino contro l'epatite B per garantire un'adeguata protezione a lungo termine ⁷.

Tuttavia, ulteriori studi hanno chiarito le caratteristiche della risposta immunitaria evocata dall'antigene dell'epatite B di Hexavac, rendendo meno critica la ridotta produzione di anticorpi per i bambini nel primo anno di vita. Infatti, studi di sorveglianza iniziali non hanno segnalato un aumento di infezioni da HBV nei bambini vaccinati con Hexavac. In particolare in Italia in cui questo vaccino è stato largamente utilizzato, nessun caso è stato segnalato tra il 2000 e il 2009, vale a dire almeno 3-4 anni dopo l'ultima dose di vaccino ⁸. E' anche stato dimostrato che nei bambini vaccinati sani la memoria immunologica per HBsAg può persistere a prescindere dalla presenza di anticorpi protettivi, fornendo un'efficace protezione anche in quelli con un declino o una concentrazione non rilevabile di anti-HBs dopo la prima somministrazione di vaccino ⁹.

Lo studio effettuato da Zanetti et al., ¹⁰ comprendeva 831 bambini di 5-6 anni che avevano ricevuto Hexavac a 3, 5 e 11-12 mesi di età, ed ha rilevato che, nonostante il fatto che oltre il 60% di loro non presentava un titolo anti-HB protettivo al momento della somministrazione della dose di richiamo, veniva comunque evocata una risposta anticorpale protettiva (≥ 10 IU / L) nel 92,1% dei partecipanti allo studio.

⁷ Swissmedic. Notification to health experts, 20 September 2005: Swissmedic suspends the license of Hexavac vaccine. Swissmedic J 2005; 9: 678–679.

⁸ Lancet Infect Dis 2010; 10: 755–761
Hepatitis B immune memory in children primed with hexavalent vaccines and given monovalent booster vaccines: an open-label, randomised, controlled, multicentre study
Zanetti AR, Romano L, Giambi C et al.

⁹ Lancet Infect Dis 2010; 10: 755–761
Hepatitis B immune memory in children primed with hexavalent vaccines and given monovalent booster vaccines: an open-label, randomised, controlled, multicentre study
Zanetti AR, Romano L, Giambi C et al.

BMC Infect Dis 2008; 8: 100
A cohort study to evaluate persistence of hepatitis B immunogenicity after administration of hexavalent vaccines.
Giambi C, Bella A, Barale A et al.

Vaccine 2012; 30:5770–5775
Challenge with a hepatitis B vaccine in two cohorts of 4–7-year-old children primed with hexavalent vaccines: an open-label, randomised trial in Italy.
Zanetti A, Parlato A, Romano L et al

¹⁰ Vaccine 2012; 30:5770–5775
Challenge with a hepatitis B vaccine in two cohorts of 4–7-year-old children primed with hexavalent vaccines: an open-label, randomised trial in Italy.
Zanetti A, Parlato A, Romano L et al

Questa è stata considerata la migliore evidenza che anche in assenza di livelli di anticorpi protettivi, i bambini che avevano ricevuto Hexavac mantenevano la memoria di cellule T in grado di innescare la produzione di anti-HBs da parte delle cellule B quando venivano esposte all'antigene virale vaccिनico.

Lo studio concluse che, poiché l'epatite B ha un lungo periodo di incubazione, la memoria immunitaria che si sviluppa nei bambini vaccinati è sufficientemente efficace da assicurare la possibilità di sviluppare un'adeguata protezione contro la malattia acuta e lo sviluppo di un stato di portatore sano cronico, indipendentemente dal livello di anticorpi; di conseguenza una dose di richiamo del vaccino contro l'epatite B è stata considerata non obbligatoria nei partecipanti immunocompetenti che sono stati vaccinati con Hexavac ¹¹. Altri studi hanno invece dimostrato che la memoria immunitaria può diminuire nel corso del secondo decennio post-vaccinazione (in particolare nei bambini vaccinati alla nascita), suggerendo la necessità di una dose di richiamo durante l'adolescenza ¹². **Un'importante ricerca di Wu et al ¹³ ha dimostrato che il 15% degli adolescenti nati da madri HBsAg / HBeAg-positive che ha ricevuto la vaccinazione infantile sviluppò l'infezione cronica da HBV, e che uno su sei dei soggetti vaccinati era in grado di rispondere alla vaccinazione di richiamo, dopo aver perso la memoria immunologica.**

Uno studio comparativo tra Hexavac ed Infanrix Hexa ¹⁴ conferma quanto sopra esposto, cioè che dopo la vaccinazione anti-epatite B, le cellule B della memoria persistono anche quando gli anticorpi nel siero

¹¹ Vaccine 2012; 30:5770–5775

Challenge with a hepatitis B vaccine in two cohorts of 4–7-year-old children primed with hexavalent vaccines: an open-label, randomised trial in Italy.

Zanetti A, Parlato A, Romano L et al

¹² Vaccine 2007; 25: 8085–8090.

Hepatitis B seroprevalence and anamnestic response amongst Taiwanese young adults with full vaccination in infancy, 20 years subsequent to national hepatitis B vaccination.

Su FH, Cheng SH, Li CY et al.

J Infect Dis 2008; 197: 1419–1426

Humoral and cellular immune responses to a hepatitis B vaccine booster 15–18 years after neonatal immunization.

Lu CY, Ni YH, Chiang BL et al.

Hepatology. 2014 Jan;59(1):349

Chronic hepatitis B infection in adolescents vaccinated at birth: an alarm bell in favor of the need for a booster?

Romano L, Carsetti R, Tozzi AE, Mele A, Zanetti AR

¹³ Vaccine 2011; 29: 2302–2307.

Antibody levels and immune memory 23 years after primary plasma-derived hepatitis B vaccination: results of a randomized placebo controlled trial cohort from China where endemicity is high.

Wu Q, Zhuang GH, Wang XL, Wang LR, Li N, Zhang M.

¹⁴ Eur J Immunol. 2011 Jun;41(6):1800-8.

diminuiscono. In questo studio è stata confrontata la frequenza di cellule B della memoria specifiche anti-epatite che rimanevano nel sangue di 99 bambini di cinque anni dopo la somministrazione di Infanrix -hexa (n = 34) o Hexavac (n = 65) . Questi due vaccini differiscono nella loro capacità di generare livelli protettivi di anticorpi IgG, come già visto sopra, in quanto contengono rispettivamente 10 mcg e 5 mcg di antigene di superficie dell'epatite B. Ai bambini con anticorpi serici sotto il livello di protezione, (<10 mIU / mL), è stata somministrata una dose di richiamo del vaccino contro l'epatite B, e 2 settimane dopo è stato misurato il titolo delle cellule B della memoria e degli anticorpi serici. Ciò che si è visto è che le cellule B della memoria specifiche avevano un titolo simile in tutti i bambini, indipendentemente dal vaccino primario somministrato. I richiami hanno comportato l'aumento delle frequenza delle cellule B della memoria (da 11,3 a 28,2 in 10⁶ cellule, p <0,01) e degli anticorpi serici (concentrazione media geometrica: GMC da 2.9 a 284 mIU / ml), a dimostrazione che **le cellule B della memoria circolanti rispondono efficacemente alla presenza dell'antigene, anche quando gli anticorpi specifici cadono sotto la soglia di protezione.**

Quindi il ritiro precauzionale e la successiva sospensione non sono giustificabili solo sulla base di una scarsa efficacia vaccinale; si tenga presente che la Sanofi stava procedendo all'autorizzazione di un nuovo vaccino esavalente pronto per l'uso (Hexyon) durante il periodo di sospensione cautelativa, con il quale ha poi recuperato il mercato e la perdita finanziaria dovuta alla sospensione dell'Hexavac, aiutato anche dal ritiro di diversi lotti di Infanrix Hexa per rischio di contaminazione batterica pericolosa il 6 ottobre 2012.

I lavori scientifici sopra discussi confermano anche un altro dato molto importante, cioè l'evidenza che il titolo anticorpale non è un indice attendibile della protezione immunitaria contro un determinato agente infettivo; questo perchè la produzione di anticorpi da parte degli antigeni che sono contenuti nei vaccini segue un percorso diverso da quello indotto dagli antigeni dei virus e batteri patogeni.

Gli agenti patogeni entrano in contatto con l'organismo attraverso le mucose e attivano la prima linea di difesa del sistema immunitario, cioè la risposta innata tramite i fagociti e cellule NK, e successivamente attivano i linfociti che inducono la formazione di cellule della memoria e anticorpi; questa attivazione del sistema immunitario è diretta all'eliminazione dell'agente patogeno e a formare una riserva di cellule della memoria in grado di riconoscere gli antigeni patogeni, in caso di ulteriori infezioni.¹⁵

Switched memory B cells maintain specific memory independently of serum antibodies: the hepatitis B example.

Rosado MM¹, Scarsella M, Pandolfi E, Cascioli S, Giorda E, Chionne P, Madonne E, Gesualdo F, Romano M, Ausiello CM, Rapicetta M, Zanetti AR, Tozzi A, Carsetti R.

¹⁵ Meccanismo della risposta immunitaria

http://amsacta.unibo.it/3067/37/12_risposta_immunitaria_I_ed_ebook.pdf

ILAR J. 2005;46(3):230-40.

Basic concepts of immune response and defense development.

McCullough KC¹, Summerfield A.

I batteri e i virus vaccinici attenuati invece vengono introdotti per iniezione intramuscolare, senza passare per il primo contatto con le mucose; le conseguenze sono il loro accesso in ogni distretto dell'organismo e lo sviluppo di uno stato di infezione latente e subclinica che attiva il sistema immunitario in maniera cronica senza però eliminare il virus/batterio (si tenga presente che i virus/batteri vaccinici vengono manipolati in modo da non essere in grado di sviluppare la malattia, e quindi anche la stimolazione del sistema immunitario da parte degli antigeni presenti nei vaccini è diversa da quella naturale); ne segue che la risposta del sistema immunitario è più debole e limitata nel tempo perché la risposta innata è inferiore, (motivo per cui sono necessari più richiami di vaccino) e predispone sia allo sviluppo di autoanticorpi a causa della somiglianza tra parti dell'antigene modificato ed elementi dell'organismo (mimetismo molecolare) che all'insorgenza di patologie autoimmuni dovute all'accumulo di adiuvanti (es. alluminio e timerosale) come si vedrà più in dettaglio in seguito.

STUDI SULLA SICUREZZA DI HEXAVAC

L'Hexavac, oltre al problema dell'efficacia a lungo termine, ha presentato un rilevante problema di sicurezza come accennato sopra.

Infatti ulteriori dubbi circa l'utilizzo di Hexavac sono stati sollevati quando è stata sospettata una **possibile associazione tra l'immunizzazione con questo vaccino e il verificarsi di morti improvvise inattese** (SUD: Sudden Unexpected Death).¹⁶. Tre SUDs si sono verificate in Germania tra novembre 2000 e giugno 2003 in bambini entro 48 ore dalla somministrazione della dose di richiamo del vaccino. **I rapporti standardizzati di mortalità per i casi di SUD entro 1 giorno dalla vaccinazione sono stati 31,3** (95% CI 3,8-113,1; due casi osservati/0,06 casi attesi) e **23,5 entro 2 giorni dopo la vaccinazione** (95% CI 4,8-68,6; tre casi osservati/0,13 casi attesi); il rapporto standardizzato di mortalità è il rapporto tra il numero di casi di morte osservati e il numero di casi attesi; esprime l'eccesso (SMR maggiore di 1) o il difetto (SMR minore di 1) di mortalità esistente tra la popolazione osservata e la popolazione presa come riferimento; per un approfondimento si veda il link [http://www.epicentro.iss.it/biblio/gloss_fala_moro/Standard.htm#Rapporto Standardizzato di Mortalità](http://www.epicentro.iss.it/biblio/gloss_fala_moro/Standard.htm#Rapporto%20Standardizzato%20di%20Mortalit%C3%A0)). Un'altra segnalazione è stata pubblicata nella lettera all'editore "Unexplained cases of sudden infant death shortly after hexavalent vaccination" del 2006, in cui Zinka et al.¹⁷ riportarono **sei casi di morte improvvisa del lattante, che si sono verificati entro 48 ore dopo la vaccinazione con vaccini esavalenti;**

¹⁶ Eur J Pediatr 2005; 164: 61–69.

Sudden and unexpected deaths after the administration of hexavalent vaccines (diphtheria, tetanus, pertussis, poliomyelitis, hepatitis B, Haemophilus influenzae type b): is there a signal?
von Kries R, Toschke AM, Strassburger K et al.

¹⁷ Vaccine. 2006 Jul 26;24(31-32):5779-80.

Unexplained cases of sudden infant death shortly after hexavalent vaccination.
Zinka B, Rauch E, Buettner A, Ruëff F, Penning R.

l'analisi post-mortem dei bambini di età compresa fra i 4 ed i 17 mesi (cinque dei quali erano stati sottoposti a vaccinazione con Hexavac ed uno con Infanrix Hexa) ha rilevato delle anomalie patologiche a livello del sistema nervoso centrale quali: alterazioni della barriera emato-encefalica; congestione acuta; modesta infiltrazione di macrofagi e linfociti nelle leptomeningi; infiltrazione perivascolare linfocitaria; infiltrazione diffusa del ponte, mesencefalo e della corteccia da parte dei linfociti T, di microglia nell'ippocampo e ponte; necrosi nel cervelletto.

Quale meccanismo eziologico del danno da vaccino si accenna al fatto che l'aumento dei livelli di triptasi (descritto nei casi di SIDS) e del numero di granulociti eosinofili suggerisce che si sia sviluppata una reazione anafilattica post-vaccinica; tuttavia poiché il tempo trascorso dalla somministrazione della vaccinazione è superiore a quello che normalmente avviene in una reazione anafilattica acuta, il meccanismo d'induzione è più compatibile con una reazione immunitaria ritardata, in cui la manifestazione della reazione anafilattica è legata al tempo necessario per la sintesi di un allergene *de novo*, oppure ad un reazione in più fasi dovuta al rilascio graduale dell'allergene dal sito d'iniezione, o a un ritardato metabolismo dei costituenti del vaccino in allergeni.¹⁸

Tale meccanismo è stato confermato nel 2008 con lo studio scientifico "b-Tryptase and quantitative mast-cell increase in a sudden infant death following hexavalent immunization"¹⁹, in cui è **stato dimostrato il nesso causale fra il verificarsi della SIDS in seguito a shock respiratorio acuto e la vaccinazione esavalente** (Infanrix Hexa) eseguita nelle 24 ore precedenti; è stato esaminato un caso letale di una neonata di 3 mesi, deceduta entro 24 ore dalla vaccinazione con vaccino esavalente, in cui i dati clinici post-mortem (edema polmonare acuto, enfisema polmonare acuto), e le analisi di laboratorio riportanti un alto livello di β -triptasi nel siero, hanno permesso di concludere che l'insufficienza respiratoria acuta, temporalmente associata alla vaccinazione, è stata la causa della morte.

L'andamento della reazione immunitaria con cui la vaccinazione può indurre la morte improvvisa è stato dimostrato con l'uso di un'apparecchiatura per il monitoraggio del respiro²⁰ (Cotwatch breathing monitoring), che permetteva di rilevare e registrare le apnee (pause nel respiro) e ipopnee (ridotto volume di respiro).

¹⁸ J Clin Pathol. 2007 Jul;60(7):737-9.

Anaphylaxis as an adverse event following immunisation.

Erlewyn-Lajeunesse M, Bonhoeffer J, Rugeberg JU, Heath PT

¹⁹ Forensic Sci Int. 2008 Aug 6;179(2-3):e25-9.

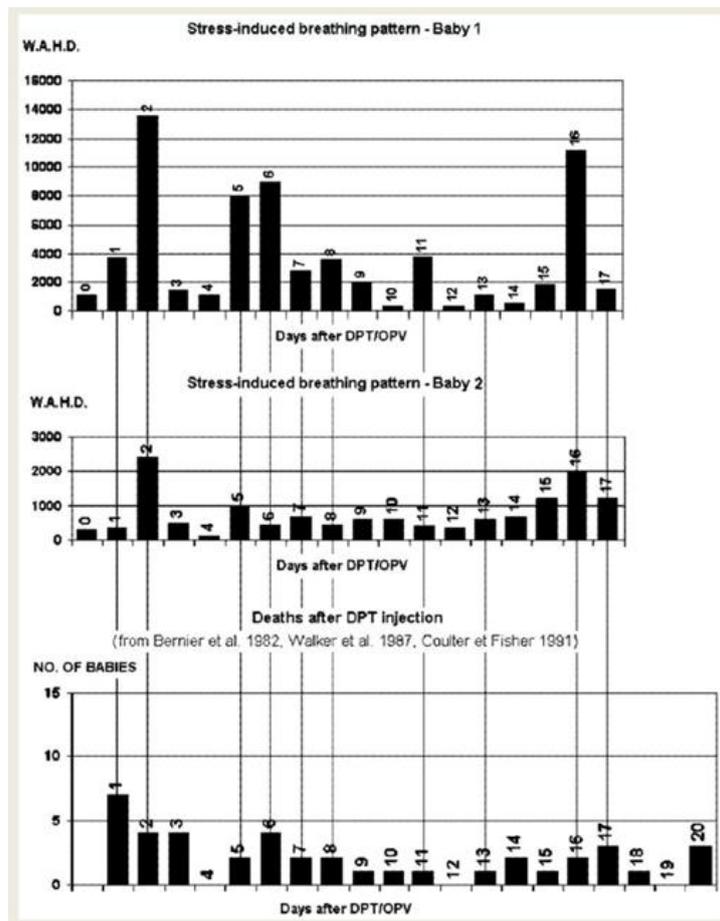
Beta-tryptase and quantitative mast-cell increase in sudden infant death following hexavalent immunization
D'Errico S¹, Neri M, Riezzo I, Rossi G, Pomara C, Turillazzi E, Fineschi V.

²⁰ J. Aust. Coll. Nutr. & Env. Med. Vol. 23 No. 3 (December 2004) pages 1-5

Dynamics of critical days as part of the dynamics of non-specific stress syndrome discovered during monitoring with Cotwatch breathing monitor.

Dr Viera Scheibner

Nella figura sotto riportata si può notare come i **picchi dello stress respiratorio post-vaccinale** siano **sovrapponibili all'andamento dei decessi**:



I primi due grafici in figura 3 sono i tabulati della registrazione degli eventi respiratori in due bambini: Baby 1 vaccinato con la terza dose di DPT (difterite-pertosse-tetano) e OPV (vaccino antipolio orale); e il Baby 2, vaccinato con la prima dose di DPT e OPV.

Il terzo grafico in figura 3 è di 41 morti reali, riportate dopo DPT e OPV; si può vedere che la distribuzione dei decessi segue da vicino la dinamica delle riacutizzazioni dello stress respiratorio dopo la somministrazione del vaccino DPT.

I grafici mostrano i risultati giorno per giorno sull'andamento della respirazione e maggiore è la colonna verticale (o il picco), maggiore è il livello di stress nella respirazione. Ci sono differenze individuali, e alcuni bambini reagiscono più di altri, ma il profilo delle riacutizzazioni dello stress respiratorio segue lo stesso andamento dei giorni critici. I grafici mostrano un numero di giorni in cui non esiste un livello di stress nella respirazione, a partire dal giorno zero quando il vaccino è stato somministrato. In tutti i casi c'è stata una reazione 48 ore dopo la vaccinazione con un picco. I giorni seguenti il livello di stress è diminuito fino a circa 5-7 giorni quando c'è stato un altro aumento del livello di stress. Un bambino ha avuto una reazione il giorno 7; uno i giorni 5 e 6, così ci sono differenze individuali, ma lo schema generale di queste reazioni è la stessa. Il livello di stress poi è andato giù nuovamente fino ad un picco al giorno 16. Dopo il sedicesimo

giorno il livello di stress è calato e c'è solo un leggero aumento del livello di sollecitazione verso il 24° giorno. Questi sono i giorni critici. Anche l'insorgenza di reazioni come le convulsioni si verificano in questi giorni critici. Anche i bambini che non hanno riportato febbre o pianto prolungato hanno presentato un leggero aumento del livello di stress, negli stessi giorni critici come quei bambini che hanno avuto reazioni più forti. Due su dieci bambini selezionati sono stati ricoverati in ospedale con gravi problemi respiratori durante questi giorni critici.

Questi dati confermano le ricerche di Takacs et al,²¹ il quale ha studiato i possibili meccanismi alla base dell'andamento ciclico di recidiva / remissione nell'encefalomielite allergica sperimentale (EAE), riportando un aumento delle cellule infiltranti il CNS (sistema nervoso centrale) e una risposta altamente proliferativa con aumento di IFN-gamma durante la fase di recidiva.

Nel 2011 è stato pubblicato su PlosOne un importante studio epidemiologico descrittivo (case series HERA study) italiano finanziato dal Ministero della Salute e dagli enti ad esso collegati ²², in cui sono stati analizzati circa 3 milioni di bambini nati nel periodo 1999-2004 (di cui 1.5 milioni hanno ricevuto l'esavalente), secondo il protocollo proposto da Farrington ²³.

Tutte le informazioni sono state fornite dai casi singoli e ogni soggetto ha anche agito come la sua / il suo proprio controllo: il periodo di osservazione è stato arbitrariamente diviso in un periodo pre-definito di rischio (corrispondente ai giorni immediatamente successivi alla vaccinazione) e il periodo di controllo (il periodo di osservazione rimanente). Ogni evento è stato classificato come "esposto" se si è verificato durante il periodo di rischio e "non esposto" se si è verificato nel periodo di controllo. I tassi di incidenza nel periodo rischio sono stati confrontati con il tasso di incidenza nel periodo di controllo per ottenere una stima del Rischio relativo o Rapporto d'Incidenza (RR: rapporto tra l'incidenza negli esposti e l'incidenza nei non esposti, dove per "esposizione" si intende la presenza di qualsiasi variabile che, in linea di ipotesi, può causare un certo effetto, e per incidenza la misura del numero di nuovi casi nel periodo di tempo di

²¹ Eur J Immunology 1997, 27:2927-2934 Relapsing and remitting experimental allergic encephalomyelitis: a focused response to the encephalitogenic peptide rather than epitope spread.

Takacs K, Chandler P and Altmann DM

²² PLoS ONE 2011; 6: e16363

Sudden unexpected deaths and vaccinations during the first two years of life in Italy: a case series study.

Traversa G, Spila-Alegiani S, Bianchi C et al

²³ Biostatistics. 2009 Jan;10(1):3-16.

Case series analysis for censored, perturbed, or curtailed post-event exposures.

Farrington CP¹, Whitaker HJ, Hocine MN.

22a- Descrizione dei vari tipi di studi clinici

http://www.mariafabiani.eu/wp-content/uploads/2013/03/studi_quantitativi.pdf

http://www.giornalediamd.it/pdf/2013_3_F/27.pdf

osservazione, la quale individua il rischio (cioè la probabilità) che il soggetto ha di contrarre la malattia in quel periodo di tempo.)^{22a}

Il periodo di osservazione (31-729 giorni) è stato diviso in periodi di rischio (i giorni immediatamente successivi alla vaccinazione) e il periodo di controllo (il restante periodo di osservazione fino a successiva vaccinazione o la morte). Secondo la segnalazione tedesca e l'ipotesi dell'esordio acuto, sono stati considerati tre diversi periodi di rischio: il giorno della vaccinazione e il giorno seguente (0-1 giorni); fino a 7 giorni dopo la vaccinazione (0-7 giorni); fino alla fine della seconda settimana dopo la vaccinazione (0-14 giorni).

Tale analisi ha rilevato che l'associazione tra la somministrazione del vaccino esavalente e il rischio di SUD durante i 14 giorni dopo la prima somministrazione del vaccino era significativamente inferiore a quello stimato in Germania (come già riportato a pag.5 i rapporti standardizzati di mortalità per i casi di SUD in Germania entro 1 giorno dalla vaccinazione sono stati 31,3 (95% CI 3,8-113,1; due casi osservati/0,06 casi attesi) e 23,5 entro 2 giorni dopo la vaccinazione (95% CI 4,8-68,6; tre casi osservati/ 0,13 casi attesi)) ed era limitato alla prima dose di vaccino, in un'età in cui l'incidenza di SUD è anche la più alta. **Lo studio ha analizzato 604 bambini morti di SUD, 244 (40%) dei quali avevano ricevuto almeno una vaccinazione. Quattro decessi si sono verificati entro due giorni dalla vaccinazione con i vaccini esavalenti, che rappresenta un aumento del 50% del rischio relativo. Il rischio relativo per SUD per i periodi 0-7 e 0-14 giorni è stato aumentato rispettivamente del 100% [2,0 RR] e del 50% [1,5 RR].** Lo studio ha concluso che vi è stato un aumento del rischio del 120% [2,2 RR] associato con la prima dose di vaccino esavalente.

In particolare, tra i soggetti immunizzati con Hexavac, un decesso si è verificato nel giorno della vaccinazione o il giorno seguente (RR = 0,7; 95% CI 0,1-5,5); 12 morti nel periodo di rischio 0-7 (RR = 2,8; IC 95% 1,4-5,3); e 13 decessi (RR = 1,6; 95% CI 0,8-3,1) per il periodo di rischio 0-14. Tuttavia è necessario evidenziare vari limiti di questo studio tra i quali: - l'impossibilità di confrontare i dati sull'incidenza della SUD con un gruppo di controllo MAI vaccinato, dato il numero esiguo rispetto alla popolazione vaccinati, indispensabile per ottenere una stima reale dell'incidenza nei vaccinati; - la mancanza di un referto autoptico per l'identificazione della SUD, indispensabile per la corretta diagnosi della causa del decesso.

- il breve periodo di esposizione considerato (fino a 14 giorni), in quanto si è assunto che la SUD sia causata da un evento ad esordio acuto, mentre abbiamo visto che le reazioni anafilattiche legate alla SUD possono essere ritardate nel tempo e ciò può generare una sottostima del danno.

Va considerato che la vaccinazione aumenta comunque il rischio relativo di SUD, nonostante le conclusioni riportate nella ricerca (l'aumento statisticamente significativo anche se ridotto di SUD dopo la prima dose di vaccino esavalente è stato attribuito a fattori confondenti legati all'età).

I dati riportati in questo studio sono stati in parte rielaborati da Kuhnert et al con un diverso metodo statistico (modified self controlled case series (SCCS)).

Il gruppo di ricerca di Kuhnert effettuò un primo test statistico pubblicato nel 2011²⁴ su 535 casi di **morti inaspettate improvvise inspiegabili (uSUD)** estratti dal data base dello studio tedesco TOKEN (www.tokenstudie.de) tra il 2005 ed il 2007.

Su un campione di 300 casi di uSUD a seguito della vaccinazione multipla penta o esavalente, è stato calcolato un aumento del rischio di 16 volte dopo la 4^a dose con una potenza $\geq 90\%$ e un aumento generale del rischio di 2 volte dopo tutte le dosi con una potenza dell'80%. (Tutti i test statistici assumono inizialmente la cosiddetta ipotesi zero (o ipotesi nulla) che prevede sempre che non esista alcuna differenza statisticamente significativa tra i gruppi in esame riguardo al parametro considerato, cioè che le differenze osservate siano dovute al caso e non sia presente associazione; La potenza di un test è la probabilità di rifiutare correttamente un'ipotesi nulla quando l'ipotesi nulla è falsa^{22a})

Venne quindi effettuata la rianalisi dello studio GeSID su 318 casi di SIDS vaccinati con vaccini esavalenti e pentavalenti.

Lo studio GeSID è stato condotto in Germania tra il 1998 e il 2001²⁵. Sono state intervistate 307 famiglie in cui un caso di sindrome della morte improvvisa del lattante (SIDS) si era verificato. Le successive analisi dello stato di immunizzazione hanno dimostrato che i casi SIDS erano stati immunizzati meno frequentemente e con una minore aderenza al programma di vaccinazione rispetto ai controlli. Poiché **si ottenne un OR di 0.51 (95% CI 0,25-1,00)** (odds ratio: misura dell'associazione tra due fattori, ad es tra un fattore di rischio (la vaccinazione) e una malattia (SIDS). Il calcolo dell'odds ratio prevede il confronto tra le frequenze di comparsa dell'evento (SIDS) rispettivamente nei soggetti esposti e in quelli non esposti al fattore di rischio in studio.^{22a}) **ciò venne interpretato come la riduzione della metà del rischio di SIDS con la vaccinazione.**

Dalla rielaborazione di Kuhnert risultò un aumento dei valori di OR nel periodo di controllo e nel periodo di esposizione dopo la vaccinazione, contestando quindi l'effetto protettivo riportato da Vennemann.

Nel 2013 Kuhnert et al. pubblicarono i risultati della rielaborazione statistica dello studio italiano HERA sopraccitato²⁶ e anche in questo caso venne rilevato un aumento del rischio per ciascuna dose di vaccino e per tutte le vaccinazioni.

²⁴ Stat Med. 2011 Mar 15;30(6):666-77

A modified self-controlled case series method to examine association between multidose vaccinations and death.

Kuhnert R¹, Hecker H, Poethko-Müller C, Schlaud M, Vennemann M, Whitaker HJ, Farrington CP.

²⁵ Vaccine. 2007 Jan 4;25(2):336-40.

Sudden infant death syndrome: no increased risk after immunisation.

Vennemann MM¹, Butterfass-Bahloul T, Jorch G, Brinkmann B, Findeisen M, Sauerland C, Bajanowski T, Mitchell EA; GeSID Group.

²⁶ Statistical Methods & Applications Nov 2013, Vol 22, Issue 4, pp 573-587

Ciò sottolinea come i risultati degli studi epidemiologici siano fortemente dipendenti dal metodo utilizzato e come diversi criteri di inclusione ed esclusione possano portare a conclusioni a volte anche opposte.

In seguito alle prime relazioni dell'EMA sull'associazione temporale tra morte improvvisa ed Hexavac, viene emanata in Italia la **Legge n. 31 del 2 febbraio 2006 "Disciplina del riscontro diagnostico sulle vittime della sindrome della morte improvvisa del lattante (SIDS) e di morte inaspettata del feto"** ²⁷, in base alla quale i lattanti deceduti improvvisamente entro un anno di vita senza causa apparente devono essere prontamente sottoposti a riscontro diagnostico, che deve essere effettuato nei centri autorizzati sulla base di uno specifico protocollo, predisposto dalla prima cattedra dell'Istituto di Anatomia Patologica dell'Università di Milano.

Per chiarezza si riporta la definizione di SIDS formulata nel Decreto del 2014:

"La sindrome della morte improvvisa infantile (Sudden Infant Death Syndrome - SIDS), conosciuta anche come morte in culla ("Crib death" e "Cot death") o morte improvvisa del lattante, consiste nel decesso improvviso di un bambino di età inferiore ad un anno, che rimane inspiegato dopo una approfondita indagine, comprensiva di un dettagliato esame delle circostanze e del luogo dove è avvenuta la morte, della revisione della storia clinica e di un'autopsia completa", mentre per SUD s'intende la morte inaspettata sopra l'anno di età.

Dal grande numero di vittime di morte improvvisa infantile (147 casi raccolti nel decennio 2000/2010), inviati presso il centro di ricerca preposto, sono stati selezionati 110 casi di età compresa tra 1 e 10 mesi postnatali e descritti in uno studio neuropatologico pubblicato su Current Medicinal Chemistry di settembre 2013. ²⁸

The association between multidose vaccinations and death: comparing case series methods when the first exposure changes the general risk of an event

Ronny Kuhnert, Stefania Spila-Alegiani, Gianpaolo Scalia Tomba, Giuseppe Traversa, Mechtild Vennemann, Hartmut Hecker

²⁷ **Legge n.31 - 02 febbraio 2006** Disciplina del riscontro diagnostico sulle vittime della sindrome della morte improvvisa del lattante (SIDS) e di morte inaspettata del feto

Decreto ministeriale - 21 dicembre 2007 Criteri di individuazione dei Centri di riferimento per il riscontro diagnostico sulle vittime della sindrome della morte improvvisa del lattante (SIDS) e di morte inaspettata del feto

Decreto 07 ottobre 2014 Protocolli diagnostici nei casi della morte improvvisa infantile e della morte inaspettata del feto

²⁸ Curr Med Chem. 2014 Mar;21(7):941-6.

Sudden infant death following hexavalent vaccination: a neuropathologic study.

Matturri L, Del Corno G, Lavezzi AM

Dall'analisi approfondita dei 110 casi, sono state estratte 13 vittime della SIDS (11,8%): 6 femmine e 7 maschi di età compresa tra 2-10 mesi decedute in associazione temporale con l'inoculazione del vaccino esavalente, senza particolari sintomi clinici. Solo in 2 casi sono stati segnalati lievi episodi di febbre e diarrea entro due giorni dopo la prima dose di vaccino.

La maggior parte di questi bambini sono deceduti a 2-3 mesi di vita (8 su 13), poco dopo la prima dose di vaccino (precisamente 6 casi entro i primi tre giorni e 2 casi rispettivamente nel quinto e sesto giorno). In 4 casi, di età compresa tra 4-5 mesi, si è verificato il decesso entro 3 giorni dalla seconda dose di vaccino e in 1 caso, 10 mesi di età, ad una settimana dopo la terza somministrazione.

L'esame approfondito del sistema nervoso autonomo (SNA), in particolare del tronco encefalico e del cervelletto, ha rilevato edema cerebrale e congestione in tutte le vittime. In nessun caso è stata osservata un'alterazione congenita delle principali strutture del SNA che controllano funzioni vitali, ad eccezione dell'ipoplasia del nucleo arcuato nel midollo allungato in 6 casi (difetto osservabile nei casi di morte improvvisa del lattante e del feto). Questi risultati hanno permesso di formulare una diagnosi di SIDS in 12 delle 13 vittime.

Si riporta la tabella che riassume tutti i dati relativi ai 13 casi con storia recente della somministrazione del vaccino esavalente.

Table 1. Features of the 13 Infants Suddenly Died in Temporal Association with Hexavalent Vaccination: Correlation with Autonomic Nervous System Findings, Prematurity and Maternal Smoking Habit

Case No.	Age at Death (Months)	Sex	Prematurity	Time Since Vaccination (Days)			Maternal Smoking	Neuropathologic Findings
				1 st dose	2 nd dose	3 rd dose		
1	2	F	-	2			-	Arcuate nucleus hypoplasia
2	3	F	-	1			-	Arcuate nucleus hypoplasia
3	3	F	-	6			-	-
4	3	M	-	3			-	-
5	5	F	-		3		-	-
6	3	M	-	1			-	Arcuate nucleus hypoplasia
7	3	M	-	2			-	Arcuate nucleus hypoplasia
8	3	M	-	5			-	Arcuate nucleus hypoplasia
9	10	F	-			7	-	-
10	4	M	-		2		-	-
11	3	M	-	3			-	Hyperacute encephalitis tractus solitarii nucleus
12	5	M	-		3		-	-
13	5	F	-		3		-	Arcuate nucleus hypoplasia

Recentemente lo stesso centro milanese ha pubblicato uno studio condotto su un grande campione di morti fetali e infantili (313 vittime tra cui 95 morti perinatali inaspettate, 140 SIDS e 78 controlli), in cui una o più anomalie congenite dell'SNA sono state rinvenute nel 90% delle vittime di SIDS. ²⁹ **Viene identificato quindi un nuovo sottogruppo di morti infantili, senza alterazioni congenite dei centri vitali del sistema nervoso, per il quale fattori genetici e costituzionali che determinano specifiche suscettibilità potrebbero predisporre a reazioni avverse ad un vaccino;** in particolare, come si vedrà in seguito è ipotizzabile che alcuni componenti del vaccino esavalente siano in grado di oltrepassare la barriera ematoencefalica, che nei primi mesi di vita è ancora immatura e permeabile, inducendo alterazioni a carico delle cellule dei centri del tronco cerebrale che regolano le funzioni vitali, con una conseguente disorganizzazione fatale del controllo respiratorio in neonati particolarmente vulnerabili.

Questi risultati confermano un lavoro pubblicato nel 2006 su Virchows Archives intitolato, “Sudden infant death syndrome (SIDS) shortly after hexavalent vaccination: another pathology in suspected SIDS?”³⁰

che metteva in discussione il metodo di valutazione diagnostica dei casi di SIDS post-vaccinale da Hexavac, utilizzato dal gruppo di lavoro dell'EMA, e **avvalga l'ipotesi che la SIDS si manifesta quando si hanno tre fattori di rischio concomitanti (detto anche modello del triplo rischio): la vulnerabilità biologica, fattori di stress esogeni (in questo caso la vaccinazione esavalente) e un periodo di sviluppo critico** ³¹

Quindi dall'esame dell'efficacia e della sicurezza di Hexavac risulta evidente che il vaccino presentava nel periodo di commercializzazione vari punti critici in via di valutazione da parte dell'EMA, valutazioni di cui l'AIFA era a conoscenza, in quanto riportati anche nella Discussione scientifica emessa dall'EMA per l'autorizzazione all'immissione in commercio del vaccino nel 2002 [1a].

Che il Ministero della Salute stia omettendo volontariamente di rispondere con dati inconfutabili riguardo l'efficacia e sicurezza del vaccino Hexavac è confermato dalla mancata risposta all'Interrogazione Parlamentare pubblicata il 22 gennaio 2014, nella seduta n. 173, della quale si riporta il testo integrale:

²⁹ Early Hum Dev. 2011 Mar;87(3):209-15.

Unexplained stillbirth versus SIDS: common congenital diseases of the autonomic nervous system pathology and nosology.

Matturri L¹, Lavezzi AM.

³⁰ Virchows Arch. 2006 Jan;448(1):100-4.

Sudden infant death syndrome (SIDS) shortly after hexavalent vaccination: another pathology in suspected SIDS?

Ottaviani G¹, Lavezzi AM, Matturri L.

³¹ Pediatrics. 2002 Nov;110(5):e64.

The triple risk hypotheses in sudden infant death syndrome.

Guntheroth WG¹, Spiers PS.

“Premesso che:

"Hexavac" è un vaccino esavalente utilizzato per la prevenzione delle infezioni causate da difterite, tetano, pertosse, poliomielite, epatite ed infezioni invasive causate da Haemophilus influenzae b, ed è stato prodotto e distribuito da Sanofi Pasteur MSD a partire dal 2000; il 17 novembre 2005 la Commissione europea ha sospeso l'autorizzazione all'immissione in commercio su raccomandazione del comitato dell'Agenzia per i medicinali per uso umano (CHMP) a causa del sospetto di inefficacia nell'indurre protezione a breve e lungo termine nei confronti dell'epatite, mentre l'11 aprile 2012 Sanofi Pasteur MSD ha volontariamente ritirato l'autorizzazione all'immissione in commercio di Hexavac; l'Agenzia europea dei medicinali (EMA) ha quindi impegnato la Sanofi Pasteur MSD a condurre un primo studio clinico per misurare il livello della risposta immunitaria al virus dell'epatite B nei bambini vaccinati nel corso del primo anno di vita. I risultati dello studio, condotto in 6 centri vaccinali italiani tra il 2008 e il 2009 e pubblicati sulla rivista "Vaccine", hanno rilevato come solo il 60,1 per cento dei bambini vaccinati presenta valori attestanti l'efficacia dell'immunizzazione; risulta agli interroganti che la Sanofi Pasteur MSD sia stata la responsabile dello studio dalla fase di progettazione fino all'analisi e all'interpretazione dei dati e quindi con un evidente conflitto di interessi; a seguito di questi risultati l'EMA ha chiesto alla Sanofi Pasteur MSD di eseguirne un secondo sui bambini vaccinati con Hexavac 10 anni prima per valutare se abbiano bisogno di una dose di richiamo o meno relativamente alla sola immunizzazione rispetto al virus dell'epatite B. Questo secondo studio è stato approvato sia dal comitato etico del centro coordinatore della ASL di Sassari il 21 maggio 2013 che dal comitato etico di pertinenza della ASL 5 Bassa friulana l'11 giugno 2013, nonché dall'Agenzia Italiana del farmaco il 5 luglio 2013; le aziende sanitarie coinvolte nello studio sottolineano la libera partecipazione, dopo un'adeguata informazione, e la raccolta del consenso degli aderenti. È però parere degli interroganti che l'informazione fornita agli aderenti non sia affatto adeguata. Nella scheda tecnica del vaccino si riporta testualmente che "poiché i dati relativi alla sicurezza del vaccino anti-epatite B sono insufficienti quando vengono somministrate dosi addizionali in eccesso rispetto alle serie raccomandate, la rivaccinazione eseguita dopo il completamento della prima serie non è raccomandata di routine. La rivaccinazione deve essere presa in considerazione per i soggetti ad alto rischio, dopo aver valutato il beneficio della vaccinazione rispetto al potenziale rischio di aumento delle reazioni avverse locali o sistemiche." A questo proposito il secondo studio presenta una particolarità: non prevede due fasi, una prima fase di acquisizione dei dati sullo stato immunitario ed una seconda con l'eventuale risposta alla rivaccinazione dei soggetti non protetti; il protocollo prevede infatti un prelievo di sangue per valutare lo stato immunitario e contemporaneamente la somministrazione della dose di richiamo. Un secondo prelievo è invece effettuato dopo 21-35 giorni per stabilire se la nuova immunizzazione ha avuto successo o meno. Per le famiglie che partecipano è prevista infine la consegna di un omaggio che comprende: un termometro digitale, un righello, una tessera identificativa ed un diario dove annotare la temperatura del bambino ed eventuali reazioni locali nei 14 giorni successivi all'iniezione; il vaccino contiene idrossifosfato amorfo di

alluminio solfato e, secondo quanto si apprende dalla scheda tecnica, può contenere tracce di formaldeide e potassio tiocianato, sostanze che possono essere utilizzate nel processo di produzione. Le possibili reazioni avverse comprendono dolore, rossore, gonfiore ma anche effetti collaterali di maggiore gravità quali dolore alle articolazioni, parestesie, neuriti e disordini del sistema nervoso centrale quali la sclerosi multipla; appare agli interroganti quantomeno improbabile che genitori efficacemente informati accettino tali rischi senza la preventiva dimostrazione che lo stato immunitario del proprio figlio richiede effettivamente una dose di richiamo,

si chiede di sapere:

se il Ministro in indirizzo sia al corrente delle ragioni per le quali il secondo studio sulla durata dell'immunizzazione del vaccino al virus dell'epatite B non preveda una prima fase di acquisizione dei dati sullo stato immunitario dei soggetti vaccinati e, solo dopo, una seconda fase di somministrazione ai soli soggetti che ne hanno bisogno;

se non ritenga opportuno attivarsi con urgenza, per quanto di sua competenza, al fine di rendere la procedura di valutazione della copertura vaccinale il più trasparente possibile e libera da conflitti d'interesse;

se non ritenga opportuno promuovere una verifica volta ad accertare che i genitori aderenti al secondo studio siano effettivamente informati dei maggiori rischi che i loro figli corrono nell'assumere una nuova dose di vaccino senza averne preventivamente valutato lo stato immunitario.”

Questa Interrogazione Parlamentare, anche se mira ad ottenere informazioni sull'efficacia del vaccino, pone anche il problema del consenso informato dei genitori ad un aumento del rischio di reazioni avverse, in caso di rivaccinazione.

Ciò si collega alla seguente discussione riguardante la sicurezza del vaccino.

ANALISI DELLA TOSSICITA' DEL VACCINO HEXAVAC

Per poter comprendere più chiaramente come il vaccino sia in grado di indurre reazioni avverse, da moderate fino al decesso, è necessario esaminare la tossicità dei singoli componenti e il metodo di preparazione di Hexavac.

Si riporta di seguito la composizione del vaccino come descritta nell'RCP (Riassunto delle Caratteristiche del Prodotto):

Ciascuna dose da 0.5 ml di vaccino adiuvato contiene:

Principi attivi:

- Tossoide difterico purificato uguale o superiore a 20 UI* (30 Lf)
- Tossoide tetanico purificato uguale o superiore a 40 UI* (10 Lf)

- Tossoide pertussico purificato 25 mcg
 - Emoagglutinina filamentosa pertussica purificata 25 mcg
 - Antigene di superficie del virus dell'Epatite B ** 5,0 mcg
 - Poliovirus inattivato di tipo 1 (Mahoney) 40 unità † di antigene D ^
 - Poliovirus inattivato di tipo 2 (MEF 1) 8 unità † di antigene D ^
 - Poliovirus inattivato di tipo 3 (Saukett) 32 unità † di antigene D ^
 - Polisaccaride dell'Haemophilus influenzae di tipo b (poliribosilribitol fosfato) 12 mcg coniugato con il tosoide tetanico (24 mcg)
- Adiuvato su idrossido di alluminio (0,3 mg)
- * Limite inferiore dell'intervallo di confidenza (p = 0,95).
- ** Antigene di superficie del virus dell'epatite B prodotto da un ceppo ricombinante 2150-2-3 del lievito *Saccharomyces cerevisiae*.
- ^ Quantità di antigene nel bulk finale del prodotto, in accordo con l'O.M.S. (TRS 673, 1992)
- † o di una quantità antigenicamente equivalente determinata con un appropriato metodo immunochimica.

Eccipienti

La formulazione contiene: idrossido di alluminio ed una soluzione tampone a base di fosfato bisodico, fosfato monopotassico, carbonato di sodio, bicarbonato di sodio, trometamolo, saccarosio, medium 199 (miscela complessa di aminoacidi, sali minerali, vitamine ed altri ingredienti) ed acqua per preparazioni iniettabili.

La preparazione degli antigeni sotto riportata è quella indicata nel report dell'EMA per l'autorizzazione all'immissione in commercio di Hexavac ^{1a}; i componenti sottolineati in carattere italico possiedono una documentata tossicità.

- Tossoide difterico: Il tosoide difterico si ottiene inattivando la tossina (prodotta da *Corynebacterium diphtheriae*) con formaldeide a 37°C in ambiente leggermente alcalino e purificandola mediante precipitazione con solfato di ammonio
- Tossoide tetanico: Il tosoide tetanico si ottiene con lo stesso procedimento del tosoide difterico (il *Clostridium tetani* è un batterio sporigeno anaerobio obbligato e produce la tetanospasmina, una tossina neurotrofa che agisce attraverso il blocco delle sinapsi inibitorie della contrazione muscolare riflessa)
- Tossoide pertussico: i componenti del vaccino antipertosse acellulare (tossoide pertussico ed emoagglutinina filamentosa FHA) sono ottenuti per estrazione e purificazione di colture di fase I di *Bordetella pertussis*, un coccobacillo aerobio in grado di produrre quattro tossine: la tossina della pertosse, la tossina adenilato-ciclasica, la tossina dermonecrotica, la citotossina tracheale e due tipi

di lipopolisaccaride; per la preparazione del vaccino acellulare si purifica e utilizza solo la tossina della pertosse insieme alla proteina di adesione FHA, seguita da detossificazione irreversibile della tossina della pertosse tramite trattamento con glutaraldeide; i due componenti sono poi adsorbiti su idrossido di alluminio.

- Antigene di superficie dell'epatite B: è prodotto da colture di *Saccharomyces cerevisiae* utilizzate per l'espressione del vettore plasmidico geneticamente modificato che codifica per il gene dell'antigene maggiore di superficie del virus dell'epatite B; il processo di produzione include la fermentazione, una prima fase di purificazione (estrazione con detergenti dell'antigene), una seconda fase di purificazione mediante cromatografia e la rimozione delle proteine del lievito. L'antigene viene poi denaturato con formaldeide e adsorbito su idrossido di alluminio.
- Virus della poliomielite (inattivati) Il vaccino Salk, o polio inattivato (IPV), si basa su tre ceppi selvaggi, virulenti di riferimento: Mahoney (poliovirus di tipo 1), MEF-1 (poliovirus di tipo 2), e Saukett (poliovirus tipo 3), coltivati nella *linea cellulare VERO*: si tratta di una linea cellulare immortalizzata ottenuta nel 1962 dai reni di scimmie africane adulte (cercopitechi); per la produzione del vaccino le cellule vengono sottoposte a 130-140 passaggi di propagazione, (basso livello di propagazione, si tenga presente che oltre i 200 passaggi la linea cellulare diventa cancerogena nei topi); il terreno di coltura per la crescita della linea VERO è di derivazione animale e quindi va testato per la presenza di virus e prioni contaminati, mentre per la crescita del virus si usa il Medium 199 che non contiene sostanze di derivazione animale. Dopo essere stati isolati e purificati i virus vivi vengono inattivati con formaldeide.
- Polisaccaride dell'Haemophilus influenzae tipo b: il polisaccaride PRP (poliribosil ribitolo fosfato) è estratto da colture del ceppo batterico di Hi di tipo b (esistono ceppi non capsulati, non tipizzabili, e ceppi capsulati, antigenicamente distinti in 6 tipi diversi denominati con le lettere dell'alfabeto dalla a alla f. Le infezioni più frequenti e meno gravi provocate dall'Hib sono quelle che interessano le prime vie respiratorie, e sono sostenute usualmente da ceppi non capsulati. Le infezioni invasive, come le meningiti sono invece causate prevalentemente da ceppi capsulati, soprattutto di tipo b), il quale viene cresciuto in un medium di coltura sintetico; dopo la purificazione il PRP viene attivato con bromuro di cianogeno, derivatizzato con uno spaziatore idrazide-adipico e accoppiato con il tossoide tetanico; dopo il processo di coniugazione il prodotto ottenuto viene ulteriormente purificato. La coniugazione con il tossoide del tetano è necessaria per conferire l'antigenicità al polisaccaride, in quanto modifica il polisaccaride da antigene T-indipendente ad antigene T-dipendente.

Il prodotto finito si ottiene mescolando i vari componenti antigenici con gli eccipienti in condizioni sterili.

Il Trometamolo (tris-(2-idrossimetil)-amminometano cloridrato o TRIS) è un agente tamponante, usato frequentemente nelle preparazioni farmaceutiche.

Come riportato sopra il vaccino Hexavac è costituito da:

- antigeni modificati opportunamente in modo da stimolare la produzione di anticorpi senza indurre attivamente l'infezione
- adiuvanti: sostanze che hanno la funzione di aumentare l'efficacia del vaccino.
- eccipienti: servono per migliorare le caratteristiche del prodotto o per permetterne la lavorazione
- contaminazioni: provengono dal ciclo produttivo o dalle materie prime

Tra i componenti presenti in Hexavac, gli adiuvanti hanno una documentata neurotossicità, in particolare in questo caso l'alluminio.³², presente in quantità pari a 0.306 mg.

Si tenga innanzitutto presente che l'alluminio utilizzato come adiuvante si trova nella forma di nanoparticelle di Al idrossido e/o Al fosfato (da ora abbreviato in NA), e che la sicurezza dell'alluminio come adiuvante si è basata su studi relativi alla sua ingestione, per la quale si ha uno scarso assorbimento (circa 0,3%)³³, rispetto alla somministrazione intramuscolare che raggiunge un assorbimento di circa il 100%.³⁴

³² Lupus. 2012 Feb;21(2):223-30.

Mechanisms of aluminum adjuvant toxicity and autoimmunity in pediatric populations.
Tomljenovic L¹, Shaw CA.

J Inorg Biochem. 2009 Nov;103(11):1555-62.

Aluminum hydroxide injections lead to motor deficits and motor neuron degeneration.
Shaw CA¹, Petrik MS.

Front Neurol. 2015 Feb 5;6:4.

Biopersistence and brain translocation of aluminum adjuvants of vaccines.
Gherardi RK¹, Eidi H¹, Crépeaux G¹, Authier FJ¹, Cadusseau J¹.

Arch Toxicol. 2004 Oct;78(10):565-74.

Mitochondrial viability and apoptosis induced by aluminum, mercuric mercury and methylmercury in cell lines of neural origin.
Toimela T¹, Tähti H.

Immunol Res. 2013 Jul;56(2-3):304-16.

Aluminum in the central nervous system (CNS): toxicity in humans and animals, vaccine adjuvants, and autoimmunity.
Shaw CA¹, Tomljenovic L.

Pediatr Nephrol. 1992 Jul;6(4):383-93.

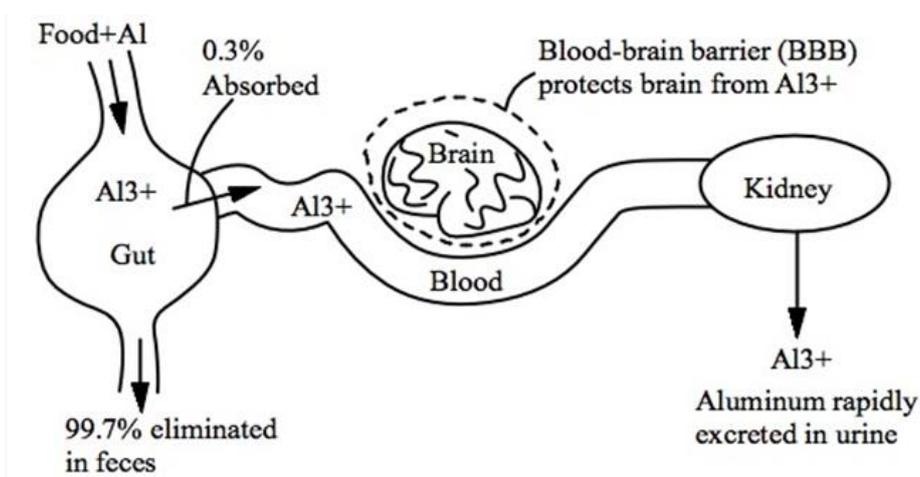
Aluminum toxicity in childhood.
Sedman A¹.

³³ Food Chem Toxicol. 2008, 46(6), 2261-2266

Aluminum bioavailability from basic sodium aluminum phosphate, an approved food additive emulsifying agent, incorporated in cheese.
Yokel, R.A.; Hicks, C.L.; Florence, R.L.

Cinetica dell'alluminio ingerito

L'alluminio ingerito entra nel sangue attraverso l'intestino. Nel sangue, l'alluminio assimilato per via orale è in forma ionica solubile in acqua, tipicamente Al^{3+} o come complesso di alluminio (es. con aminoacidi, ferritina ect). L'alluminio ionico è tossico ma la sua penetrazione nel cervello è bloccata dalla barriera ematoencefalica (BBB), e viene poi rapidamente filtrato dal sangue nei reni senza causare un'eccessiva tossicità, se in quantità ridotte.



L'alluminio ha un basso assorbimento, è rapidamente eliminato nelle urine e non passa la BBB. Queste difese naturali sono adeguate per proteggere il cervello da normali livelli presenti in natura di alluminio ingerito.

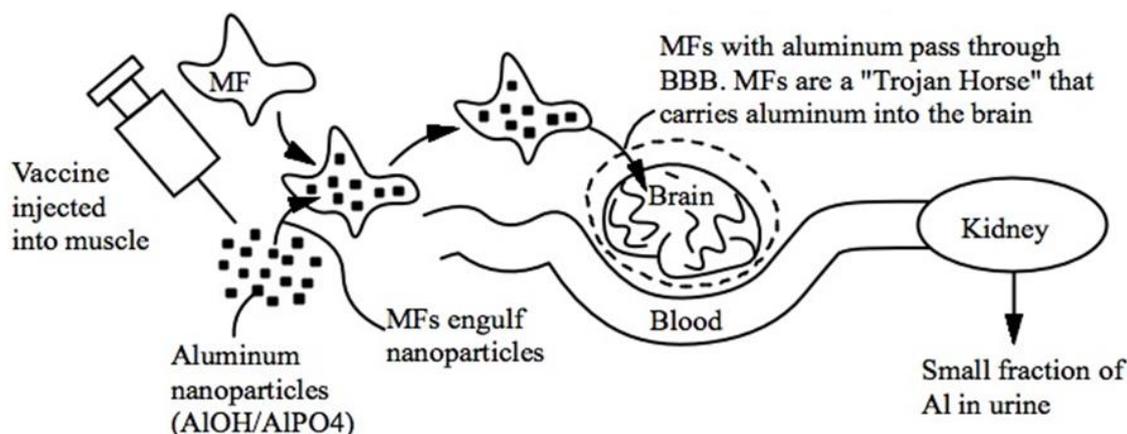
Sulla base della cinetica dell'alluminio ingerito è stato per lungo tempo assunto che le NA seguissero una via simile di eliminazione, invece le NA non possono essere filtrate dai reni (sono troppo grandi) e non si dissolvono rapidamente nei liquidi corporei per formare Al^{3+} . Ne segue che questo modello farmacocinetico per le NA è errato.

Cinetica dell'alluminio somministrato per via intramuscolare

Quando invece l'alluminio viene iniettato a livello intramuscolare, le NA vengono fagocitate dai macrofagi prima che queste possano andare in soluzione; la fagocitosi è il meccanismo con cui i macrofagi presentano gli antigeni di batteri e altri agenti patogeni alle altre cellule del sistema immunitario; il problema delle NA è che non vengono digerite dagli enzimi dei macrofagi e quando sono al loro interno vanno in soluzione

³⁴ Pharmacol Toxicol. 2001, 88(4), 159-167.
Aluminium toxicokinetics: an updated minireview.
Yokel, R.A.; McNamara, P.J.

molto più lentamente. Le NA quindi persistono per lungo tempo e i macrofagi lasciano fuoriuscire lentamente l'alluminio. I macrofagi che fagocitano le NA diventano quindi dei veicoli di alluminio altamente contaminanti, in quanto lo diffondono in ogni distretto del corpo, compreso il cervello perchè sono in grado di attraversare la barriera ematoencefalica. Una volta all'interno del cervello, l'alluminio danneggia le cellule cerebrali, e le sostanze tossiche prodotte a loro volta innescano un'inflammatione che attira altri macrofagi che possono trasportare altro alluminio e instaurano così un circolo vizioso che porta ad un danno cerebrale sempre più vasto.



Prima che le nanoparticelle di alluminio possano dissolvere, vengono ingerite dai macrofagi (MFs). Gli MFs poi trasportano le nanoparticelle di alluminio in tutto il corpo, incluso il cervello. Le MFs attraverso la BBB. All'interno del cervello l'alluminio viene liberato lentamente dalle MFs e causano danno cerebrale.

Le evidenze scientifiche a supporto di questo meccanismo di veicolazione/traslocazione e tossicità dell'alluminio

Si tenga presente che il cervello è un organo estremamente sensibile all'alluminio; concentrazioni di alluminio pari a 10-100 nanoM (pari a 270 nanogrammi/L di alluminio) sono in grado di causare inflammatione rispettivamente delle cellule dei vasi sanguigni³⁵ e dei neuroni umani.³⁶

L'evidenza scientifica per questo meccanismo di veicolazione è inequivocabile e replicata; sono stati provati da più studi svolti da Università e laboratori finanziati con fondi governativi i seguenti passaggi: l'incorporazione delle NA da parte dei macrofagi, la traslocazione dei macrofagi nel cervello e l'osservazione che i macrofagi trasportano le nanoparticelle nel cervello.

³⁵ J Inorg Biochem. 2015 Nov;152:210-3.

Nanomolar aluminum induces expression of the inflammatory systemic biomarker C-reactive protein (CRP) in human brain microvessel endothelial cells (hBMECs).

Alexandrov PN¹, Kruck TP², Lukiw WJ³.

³⁶ J Inorg Biochem. 2005 Sep;99(9):1895-8.

Nanomolar aluminum induces pro-inflammatory and pro-apoptotic gene expression in human brain cells in primary culture.

Lukiw WJ¹, Percy ME, Kruck TP.

Inoltre è stato dimostrato anche l'intero processo: le NA iniettate in animali da esperimento sono state rilevate e fotografate nel cervello.

Si riportano di seguito i risultati di alcuni dei numerosi studi:

Studio di Flarend et al³⁷: sono stati utilizzati conigli del peso di 2.5-2.8 kg all'inizio dello studio e 3.2-3.7 kg al termine, ai quali sono stati somministrati 0.85 mg di alluminio marcato con Al²⁶ (sottoforma di fosfato e idrossido di Al adiuvante) per IM e alluminio citrato marcato per IV. Il massimo aumento della concentrazione plasmatica di alluminio da una dose di 0.85 mg per entrambi gli adiuvanti era di circa 2 ng/mL, che nel caso dell'alluminio idrossido si mantiene piuttosto costante a partire da un'ora dopo dalla somministrazione fino al termine dell'esperimento (28 giorni); anche dopo un mese solo il 6% (di alluminio idrossido) e il 22% (di alluminio fosfato) è eliminato con le urine, mentre l'alluminio nel sito d'iniezione può permanere per anni.

Va considerato che con l'alluminio idrossido il rilascio nel circolo e l'escrezione è tre volte inferiore rispetto a quella dell'alluminio fosfato e così pure l'accumulo nel cervello; entrambi gli adiuvanti presentano un rilascio continuativo e piuttosto costante durante l'esperimento; l'assorbimento nei tessuti è riportato nella seguente figura (fig. 3):

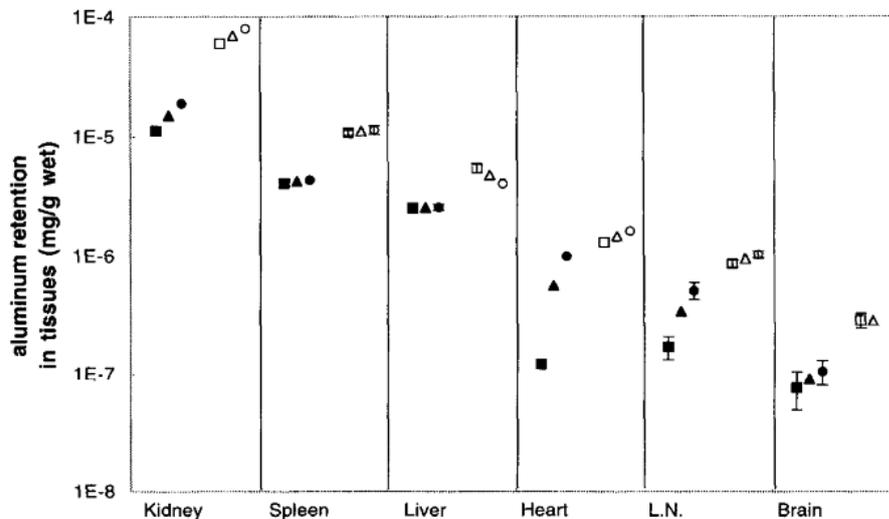


Figure 3 Aluminium tissue concentration 28 days after administration of ²⁶Al-labelled aluminium hydroxide adjuvant: ■, rabbit 1; ●, rabbit 2; ▲, mean; or aluminium phosphate adjuvant: □, rabbit 3; ○, rabbit 4; △, mean. L.N., lymph node. Error bars of < 5% are not shown

³⁷ Vaccine. 1997 Aug-Sep;15(12-13):1314-8.

In vivo absorption of aluminium-containing vaccine adjuvants using ²⁶Al.

Flarend RE¹, Hem SL, White JL, Elmore D, Suckow MA, Rudy AC, Dandashli EA.

Si è visto che l'emivita dell'alluminio somministrato con una singola iniezione IV che si è accumulato nel cervello è di circa 150 giorni ³⁸, *quindi dosi di alluminio adiuvante somministrate nel primo anno di vita si possono considerare cumulative.*

Oltre all'assorbimento attraverso il circolo sanguigno, l'alluminio può raggiungere direttamente il cervello attraverso il sistema linfatico, cosa che nello studio di Flarens ha avuto un minimo riscontro perché l'alluminio è stato iniettato in una zona distante dai linfonodi, e quindi la concentrazione dell'alluminio nel cervello in questo studio (10^{-7} mg/g di tessuto) è ridotta rispetto a quanto dimostrato in studi più recenti di cui si discuterà successivamente.

Studio di Movsas et al (2013) ³⁹: sono stati misurati i livelli di alluminio nelle urine e nel sangue prima e dopo le vaccinazioni di routine con 120 mcg di alluminio a due mesi di età. Non sono stati rilevati cambiamenti dei livelli osservati. Tale risultato si spiega se si considera che l'alluminio viene incorporato nei macrofagi, i quali si muovono nel sistema linfatico.

Sono disponibili vari studi che supportano l'ipotesi che i macrofagi incorporano l'alluminio, in quanto è stato possibile colorare opportunamente, fotografare e identificare con vari metodi le NA all'interno dei macrofagi, una caratteristica peculiare di queste cellule quando vengono coltivate in presenza di nanoparticelle di qualsiasi composizione.

Tra gli studi presenti in letteratura sono da riportare:

Mold et al (2014 ⁴⁰ e 2016 ⁴¹) hanno dimostrato per la prima volta l'inequivocabile identificazione di nanoparticelle di alluminio adiuvante all'interno delle cellule THP-1 (monocytic T helper 1 cell line) e che un

³⁸ Toxicol Sci. 2001 Nov;64(1):77-82.

Entry, half-life, and desferrioxamine-accelerated clearance of brain aluminum after a single (26)Al exposure.

Yokel RA¹, Rhineheimer SS, Sharma P, Elmore D, McNamara PJ.

³⁹ JAMA Pediatr. 2013 Sep;167(9):870-2. doi: 10.1001/jamapediatrics.2013.108.

Effect of routine vaccination on aluminum and essential element levels in preterm infants.

Movsas TZ¹, Paneth N, Rumberiha W, Zyskowski J, Gewolb IH.

⁴⁰ Sci Rep. 2014 Sep 5;4:6287. doi: 10.1038/srep06287.

Unequivocal identification of intracellular aluminium adjuvant in a monocytic THP-1 cell line.

Mold M¹, Eriksson H², Siesjö P³, Darabi A³, Shardlow E¹, Exley C¹.

Sci Rep. 2016 Aug 12;6:31578.

Insight into the cellular fate and toxicity of aluminium adjuvants used in clinically approved human vaccinations.

Mold M¹, Shardlow E¹, Exley C¹.

sovraccarico di alluminio idrossido nel citoplasma delle cellule THP-1, pur senza indurre una citotossicità immediata può favorire il suo successivo trasporto attraverso il corpo compreso l'accesso al cervello.

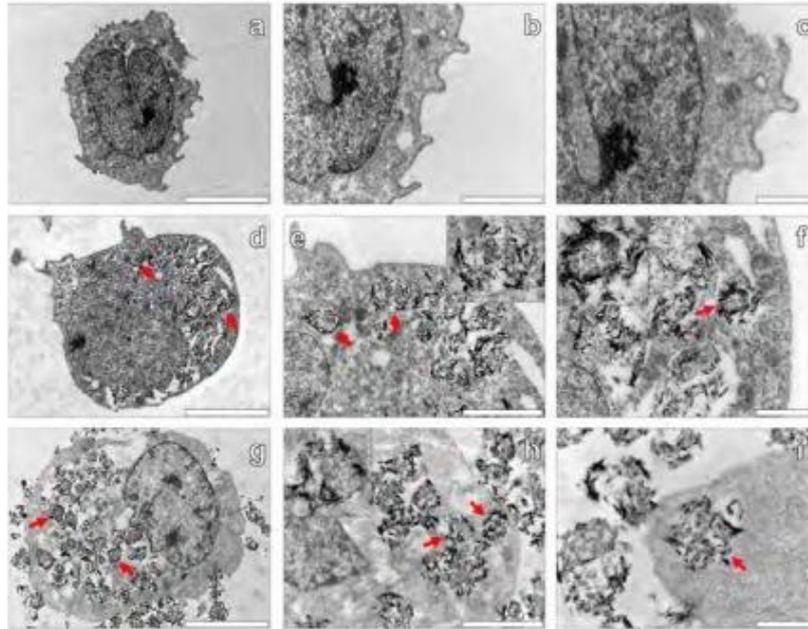


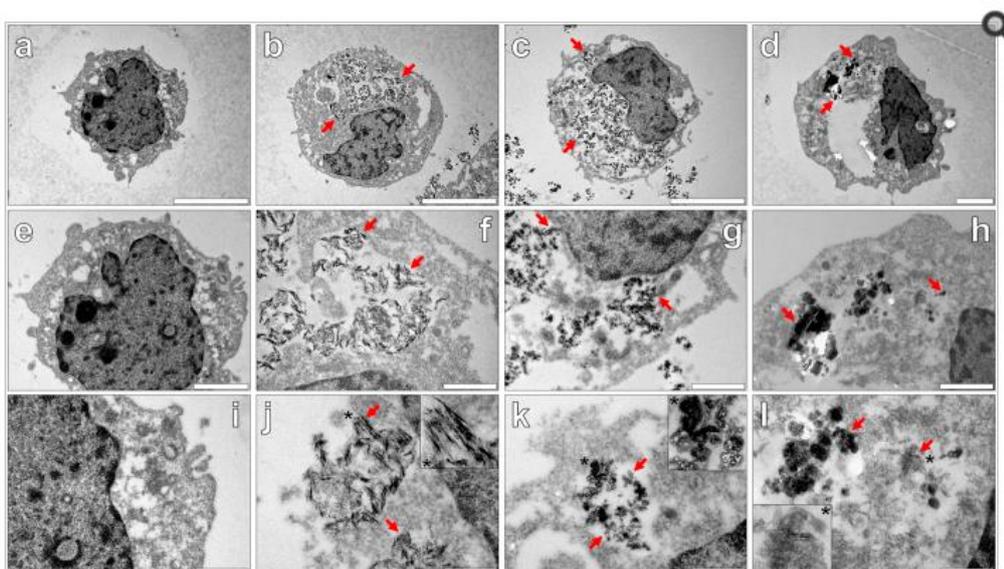
Figure 5 | Representative electron micrographs from TEM of Spurr resin-sectioned (100 nm sections) native THP-1 cells (a-c), THP-1 cells co-cultured with 50 µg/mL AlO(OH)^{Si6000} adjuvant (24 h) (d-f) & THP-1 cells co-cultured with 200 µg/mL AlO(OH)^{Si6000} adjuvant (24 h) (g-i). Cell resin-sections were stained for 20 min with 2% ethanolic uranyl acetate, rinsed with 30% ethanol followed by ultrapure water and finally allowed 24 h drying time prior to analysis via TEM. Inserts show close-ups of intracellular adjuvant particles contained within vesicle-like structures and the red arrows highlight their presence within the respective cell images. Magnification & scale bars: (a), (d), & (g). × 8 K, 5 µm, (b), (e), & (h). × 20 K, 2 µm, (c), (f), & (i). × 30 K, 1 µm, respectively.

⁴¹ Sci Rep. 2016 Aug 12;6:31578.

Insight into the cellular fate and toxicity of aluminium adjuvants used in clinically approved human vaccinations.

Mold M¹, Shardlow E¹, Exley C¹.

Figure 8



Representative electron micrographs from TEM of Spurr resin-sectioned (100 nm sections) native THP-1 cells (a,e,i), THP-1 cells co-cultured with 50 µg/mL Alhydrogel® (24 h) (b,f,j) and 50 µg/mL Adju-Phos® (Brenntag Biosector, Denmark) adjuvant (24 h) (c,g,k) and 50 µg/mL Inject™ Alum (Pierce, Thermo Scientific) adjuvant (24 h) (d,h,l). Cell resin-sections were stained for 20 min with 2% ethanolic uranyl acetate, rinsed with 30% ethanol followed by ultrapure water and finally allowed 24 h drying time prior to analysis via TEM. Inserts show close-ups of intracellular adjuvant particles contained within vesicle-like structures and the red arrows highlight their presence within the respective cell images. Magnification and scale bars: (a–c) X 8 K, 5 µm, (d) X 10 K, 2 µm, (e) X 15 K, 2 µm, (f–h) X 30 K, 1 µm, (i) X 30 K, 1 µm and (j–l) X 60 K, 0.5 µm, respectively.

Immagini di microscopia elettronica di nanoparticelle di alluminio adiuvante all'interno dei macrofagi, i quali ingeriscono (fagocitano) le nanoparticelle

Fig. 5 da Mold et al. 2014

Fig. 8 da Mold et al. 2016

Questi studi del gruppo di Mold e di altri,⁴² hanno permesso di dimostrare che la fagocitosi è uno dei meccanismi più riconosciuti che governa l'internalizzazione cellulare e la successiva degradazione di microparticelle di alluminio adiuvante, attraverso il processo molecolare di autofagia. Nelle ultime fasi dell'autofagia, la maturazione degli autofagosomi in autolisosomi acidifica i risultanti compartimenti vescicolari formati a circa pH 4,0- 4,5. Ciò provoca la degradazione del particolato di alluminio adiuvante internalizzato nei lisosomi, liberando in tal modo Al³⁺ (aq) nel citosol cellulare. Il rilascio dell'enzima

⁴² J Trace Elem Med Biol. 2015 Apr;30:90-5.

The binding, transport and fate of aluminium in biological cells.

Exley C¹, Mold MJ².

J Inorg Biochem. 2013 Nov;128:229-36.

Aluminium based adjuvants and their effects on mitochondria and lysosomes of phagocytosing cells.

Ohlsson L¹, Exley C, Darabi A, Sandén E, Siesjö P, Eriksson H.

J Immunol Methods. 2015 Jul;422:87-94.

Al adjuvants can be tracked in viable cells by lumogallion staining.

Mile I¹, Svensson A², Darabi A³, Mold M⁴, Siesjö P³, Eriksson H⁵.

catepsina B agisce come segnale di pericolo endogeno, il quale insieme ai prodotti di degradazione dell'alluminio adiuvante che inducono la produzione di molecole immunostimolatorie (damage associated molecular patterns: DAMPs), *trasformano le cellule presentanti l'antigene in cellule infiammatorie; tale effetto aumenta la mortalità cellulare in vitro e potrebbe essere responsabile dell'infiammazione nel sito d'iniezione.*

Studi di Gherardi et al ⁴³

Un primo studio ⁴⁴ in pazienti affetti da miofasciite macrofagica (MMF) ha rilevato NA all'interno dei macrofagi nel punto delle iniezioni intramuscolari del vaccino. Campioni di tessuto muscolare sono stati ottenuti dalla biopsia da tre mesi a 8 anni dopo l'iniezione vaccinale (media: 36 mesi). La presenza di alluminio all'interno dei macrofagi è stata confermata mediante 3 metodi diversi. L'alluminio era presente solo nei macrofagi e non nelle cellule muscolari.

⁴³ Toxicology. 2017 Jan 15;375:48-57.

Non-linear dose-response of aluminium hydroxide adjuvant particles: Selective low dose neurotoxicity.

Crépeaux G¹, Eidi H², David MO³, Baba-Amer Y⁴, Tzavara E⁵, Giros B⁵, Authier FJ⁴, Exley C⁶, Shaw CA⁷, Cadusseau J⁸, Gherardi RK⁴.

Morphologie. 2016 Jun;100(329):85-94.

Aluminum adjuvants of vaccines injected into the muscle: Normal fate, pathology and associated disease.

Gherardi RK¹, Aouizerate J¹, Cadusseau J², Yara S², Authier FJ³.

Front Neurol. 2015 Feb 5;6:4.

Biopersistence and brain translocation of aluminum adjuvants of vaccines.

Gherardi RK¹, Eidi H¹, Crépeaux G¹, Authier FJ¹, Cadusseau J¹.

BMC Med. 2015 Jun 17;13:144.

Fluorescent nanodiamonds as a relevant tag for the assessment of alum adjuvant particle biodisposition.

Eidi H^{1,2}, David MO³, Crépeaux G⁴, Henry L⁵, Joshi V⁶, Berger MH⁷, Sennour M⁸, Cadusseau J^{9,10}, Gherardi RK¹¹, Curmi PA¹².

Bull Acad Natl Med. 2014 Jan;198(1):37-48; discussion 49-53.

[Biopersistence and systemic distribution of intramuscularly injected particles: what impact on long-term tolerability of alum adjuvants?]. [Article in French]

Gherardi RK, Cadusseau J, Authier FJ.

BMC Med. 2013 Apr 4;11:99.

Slow CCL2-dependent translocation of biopersistent particles from muscle to brain.

Khan Z¹, Combadière C, Authier FJ, Itier V, Lux F, Exley C, Mahrouf-Yorgov M, Decrouy X, Moretto P, Tillement O, Gherardi RK, Cadusseau J.

⁴⁴ Brain. 2001 Sep;124(Pt 9):1821-31.

Macrophagic myofasciitis lesions assess long-term persistence of vaccine-derived aluminium hydroxide in muscle.

Gherardi RK¹, Coquet M, Cherin P, Belec L, Moretto P, Dreyfus PA, Pellissier JF, Chariot P, Authier FJ.

(B)

Electron microscope image of thin muscle section.

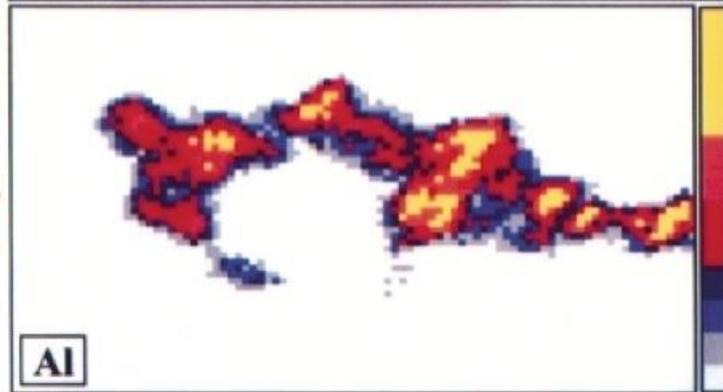
Dark areas: Al adjuvant inside macrophages

Light area: muscle fibers



Nuclear microprobe image of same sample as above. Color indicates density of aluminum.

Nuclear microprobe image is produced by scanning focused proton beam, and imaging the resulting X-rays



Immagini al Microscopio elettronico (in alto) e microsonda nucleare (o emissione di raggi X protone-indotta (PIXE); in basso) di sezioni sottili di muscolo prelevati da pazienti affetti da miofasciite macrofagica (MMF). Questo studio ha mostrato che le NA rimangono all'interno macrofagi (MFS) nel tessuto muscolare per 8 anni dopo l'iniezione intramuscolare. Da Gherardi et al. 2001

L'infiammazione causata dal movimento dei macrofagi:

Un studio del 2009 di D'Mello et al.⁴⁵ ha dimostrato che l'infiammazione specifica del fegato (danno del fegato dovuto dal blocco del dotto biliare) causava l'ingresso di macrofagi periferici all'interno del SNC.

In particolare, in presenza di infiammazione epatica i topi presentavano livelli elevati di MCP-1 (monocyte chemoattractant protein o CCL2⁴⁶) e un aumento del numero di monociti circolanti esprimenti CCR2 (CCR2: recettore per CCL2⁴⁷; monociti: sono i precursori dei macrofagi⁴⁸).

Si ricorda che l'MCP-1 è anche un marcatore predittivo dell'esito fatale della sepsi e il suo aumento è associato al grado d'infiammazione sistemica.⁴⁹

In questo modello d'infiammazione, la microglia (la componente macrofagica residente nel SNC⁵⁰) era attivata e produceva MCP-1/CCL2 prima dell'infiltrazione dei monociti, e si è visto che tale stimolazione era mediata dalla via del segnale del TNF-alfa periferico (mediatore dell'infiammazione)⁵¹.

In altre parole, la microglia nel SNC è in grado di rilevare l'infiammazione epatica e di attivarsi per mezzo del TNF-alfa prodotto a livello periferico; la microglia attivata rilascia MCP-1 che attrae i macrofagi nel cervello dalla periferia. Questa è una delle modalità con cui le NA vengono trasportate dai macrofagi nel SNC. *I risultati di tale studio identificano l'esistenza di una nuova via di comunicazione sistema immunitario-SNC che avviene nel corso di infiammazioni localizzate in organi periferici e può avere specifiche implicazioni nello sviluppo di alterazioni della neurotrasmissione cerebrale che s'incontrano in varie patologie infiammatorie che avvengono fuori del SNC; quindi un'infiammazione in qualsiasi parte del corpo può far penetrare nel cervello macrofagi che veicolano NA.*

⁴⁵ J Neurosci. 2009 Feb 18;29(7):2089-102.

Cerebral microglia recruit monocytes into the brain in response to tumor necrosis factor alpha signaling during peripheral organ inflammation.

D'Mello C¹, Le T, Swain MG.

⁴⁶ <https://en.wikipedia.org/wiki/CCL2>

⁴⁷ <https://it.wikipedia.org/wiki/Chemochine>

⁴⁸ <https://it.wikipedia.org/wiki/Macrofago>

⁴⁹ Tohoku J Exp Med. 2017;241(2):139-147.

Plasma Monocyte Chemoattractant Protein 1 as a Predictive Marker for Sepsis Prognosis: A Prospective Cohort Study. Zhu T¹, Liao X, Feng T, Wu Q, Zhang J, Cao X, Li H.

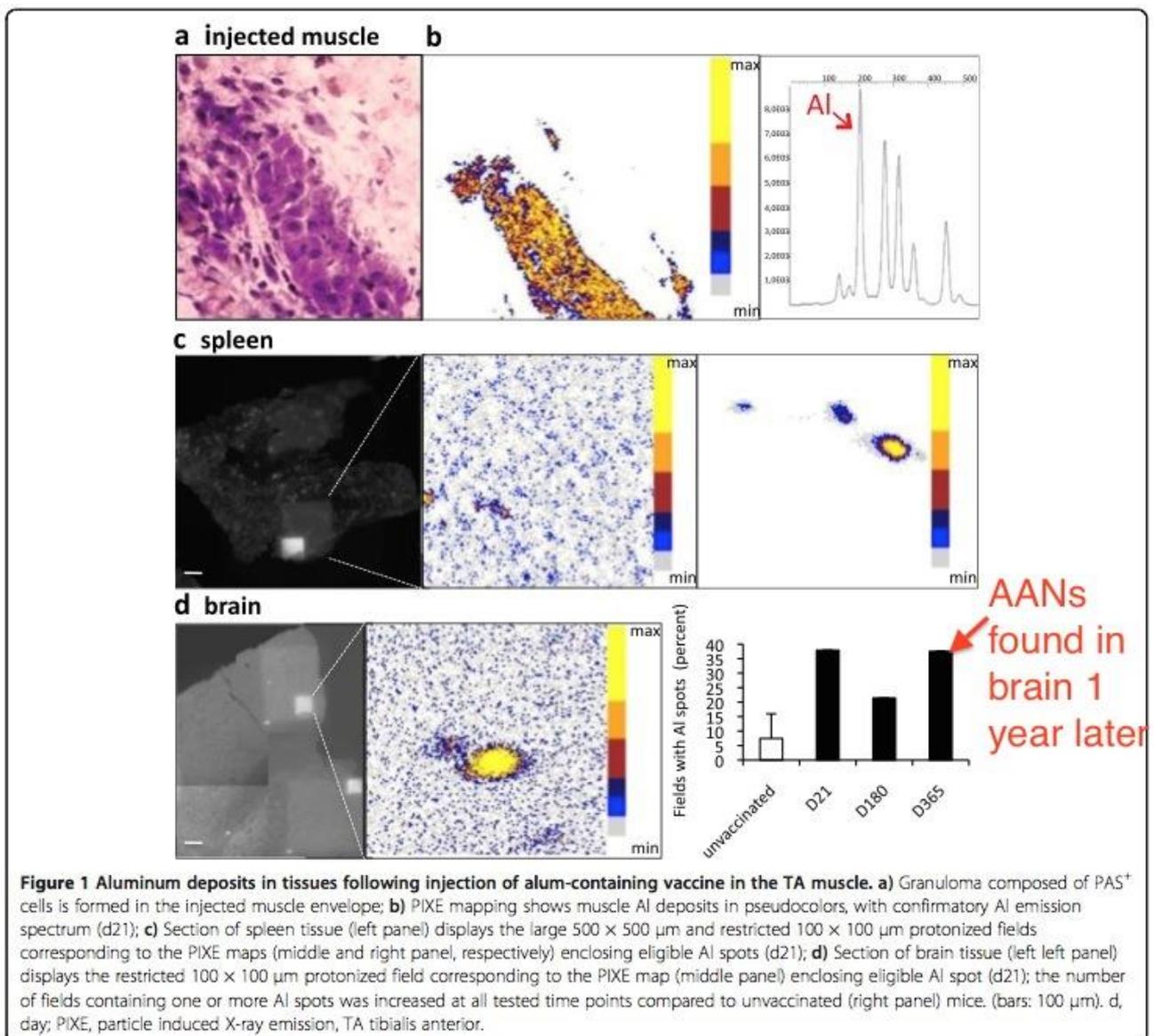
⁵⁰ <https://it.wikipedia.org/wiki/Microglia>

⁵¹ <http://didattica.uniroma2.it/assets/uploads/corsi/145556/citoimmuninnatal.pdf>

Le nanoparticelle di alluminio adiuvante fotografate nel tessuto cerebrale di topo:

Un importante lavoro di Khan et al.⁵² ha permesso di documentare in modo inequivocabile che le NA e altre nanoparticelle (es. Latex) iniettate per via intramuscolare penetravano all'interno del cervello e nei reni e potevano essere rilevate fino ad un anno dopo l'iniezione. Questi risultati contraddice un assunto riguardo l'assenza di tossicità dell'alluminio adiuvante inoculato per via IM, cioè che l'alluminio rimane nel punto d'iniezione senza causare danno.

Di seguito è riportata la foto che mostra le NA nel cervello e nei reni:



⁵² BMC Med. 2013 Apr 4;11:99.

Slow CCL2-dependent translocation of biopersistent particles from muscle to brain.

Khan Z¹, Combadière C, Authier FJ, Itier V, Lux F, Exley C, Mahrouf-Yorgov M, Decrouy X, Moretto P, Tillement O, Gherardi RK, Cadusseau J.

Khan ha inoltre osservato che il trasporto delle NA nel SNC e nei tessuti è MCP-1- dipendente, e questo fatto è un'ulteriore evidenza che i macrofagi sono responsabili del trasporto delle nanoparticelle.

Sebbene la traslocazione dell'alluminio adiuvante avvenga a bassi livelli in condizioni normali, va considerato che dosi cumulative di questo composto scarsamente degradabile diventano tossiche nel caso di overimmunizzazione e un'alterata/immaturo barriera ematoencefalica come si ha nei neonati e in presenza di fattori di suscettibilità, che inducono sottili alterazioni della barriera ematoencefalica e un progressivo aumento della produzione di CCL2.

E' da tenere presente che la produzione di CCL2 / MCP-1 è stimolata dall'attivazione immunitaria. Quindi, un vaccino che stimola CCL2 / MCP-1 può causare lo spostamento delle NA (già presenti nel corpo o provenienti dal vaccino) nel cervello.

Le NA provenienti dai vaccini possono rimanere "dormienti" nel sito di iniezione per anni, fino a quando un evento di attivazione immunitaria stimola la produzione di MCP-1. Questo farà sì che i macrofagi contenenti NA si mobilizzino e trasportino le NA al cervello e altri tessuti sensibili. Questo potrebbe spiegare alcuni dei danni da vaccino MPR.

E' noto che il vaccino del morbillo stimola la produzione di MCP-1 ⁵³ (altri antigeni vaccinali che stimolano la produzione di MCP-1 sono il meningococco A e il pneumococco 23 valente ⁵⁴); **ne segue che il vaccino MPR può stimolare il movimento di NA (ricevuto dai vaccini precedenti) nel cervello.** Questo può essere uno dei meccanismi con cui l'MPR causa l'autismo o altri danni neurologici. Di conseguenza, il vaccino MPR può essere più pericoloso quando viene somministrato dopo i vaccini contenenti alluminio (come avviene in tutti i programmi vaccinali infantili).

A conferma di quanto detto è importante sottolineare che è stato dimostrato nelle ricerche di Vargas et al. che *l'MCP-1/CCL2 è elevato nel cervello e nel liquido cerebrospinale di pazienti autistici* ⁵⁵.

⁵³ PLoS One. 2014 May 16;9(5):e97536.

A randomized trial of an early measles vaccine at 4½ months of age in Guinea-Bissau: sex-differential immunological effects.

Jensen KJ¹, Søndergaard M², Andersen A³, Sartono E⁴, Martins C², Garly ML², Eugen-Olsen J⁵, Ullum H⁶, Yazdanbakhsh M⁴, Aaby P⁷, Benn CS⁸, Erikstrup C⁹.

⁵⁴ Vaccine. 2006 Feb 27;24(9):1291-7.

Hexa-acylation and KDO(2)-glycosylation determine the specific immunostimulatory activity of Neisseria meningitidis lipid A for human monocyte derived dendritic cells.

Zughaier S¹, Agrawal S, Stephens DS, Pulendran B.

Eur Cytokine Netw. 2007 Mar;18(1):23-30.

Polyvalent 23 epitope polysaccharide pneumonia vaccine induced effective protection through strain-adapted effector mechanisms as demonstrated by the different cytokine responses in mice challenged with two different strains of Streptococcus pneumoniae.

Mohler J¹, Moine P, Azoulay-Dupuis E, Henin D, Fantin B.

⁵⁵ Ann Neurol. 2005 Jan;57(1):67-81.

Il meccanismo con cui le nanoparticelle vengono veicolate attraverso i macrofagi in tutti i distretti dell'organismo (meccanismo detto del "cavallo di Troia") è oggetto di studio per l'applicazione farmaceutica, al fine di portare farmaci nel cervello attraverso la BBB. Gli studi hanno dimostrato che le nanoparticelle (ad esempio contenenti serotonina, farmaci contro il cancro, o farmaci anti-HIV) possono essere trasportate attraverso la BBB utilizzando i macrofagi come carrier ⁵⁶; un'altra importante applicazione delle nanoparticelle è la diagnostica in vivo dell'infiammazione cerebrale ⁵⁷

Ne segue che il trasporto di nanoparticelle veicolate dai macrofagi nel cervello è un fenomeno ampiamente accettato e verificato. I macrofagi però fanno la stessa cosa con le NA provenienti dai vaccini. Dal momento che l'alluminio è una potente neurotossina e stimola fortemente l'infiammazione del cervello, ⁵⁸ ciò è una seria preoccupazione per la sicurezza dei vaccini.

Alcuni studi recenti sulla somministrazione di Al adiuvante nei topi ha rivelato una maggiore complessità del trasporto dell'Al adiuvante. ⁵⁹

Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism.
Vargas DL¹, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA.

⁵⁶ J Neuroimmune Pharmacol. 2017 Mar;12(1):1-5.
Nanomedicines for the Treatment of CNS Diseases.
Reynolds JL¹, Mahato RI².

Cancer Nanotechnol. 2012 Dec;3(1-6):47-54.
Delivery of nanoparticles to brain metastases of breast cancer using a cellular Trojan horse.
Choi MR¹, Bardhan R, Stanton-Maxey KJ, Badve S, Nakshatri H, Stantz KM, Cao N, Halas NJ, Clare SE.

⁵⁷ Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Nov 15;113(46):13227-13232.
In vivo nanoparticle imaging of innate immune cells can serve as a marker of disease severity in a model of multiple sclerosis.
Kirschbaum K^{1,2}, Sonner JK¹, Zeller MW^{3,4}, Deumelandt K¹, Bode J^{5,6}, Sharma R^{5,6}, Krüwel T^{5,6}, Fischer M², Hoffmann A², Costa da Silva M^{7,8,9}, Muckenthaler MU^{7,8}, Wick W^{10,11}, Tews B^{5,6}, Chen JW^{3,4}, Heiland S², Bendszus M², Platten M^{1,10}, Breckwoldt MO^{12,2}.

⁵⁸ J Inorg Biochem. 2015 Nov;152:210-3.
Nanomolar aluminum induces expression of the inflammatory systemic biomarker C-reactive protein (CRP) in human brain microvessel endothelial cells (hBMECs).
Alexandrov PN¹, Kruck TP², Lukiw WJ³.

Curr Aging Sci. 2012 Dec;5(3):209-17.
Aluminum excitotoxicity and neuroautoimmunity: the role of the brain expression of CD32+ (FcγRIIa), ICAM-1+ and CD3ξ in aging.
Jovanova-Nesic K¹, Shoenfeld Y, Spector NH.

⁵⁹ J Inorg Biochem. 2015 Nov;152:199-205.

Tali studi hanno evidenziato che:

1) il trasporto dipende dal sito d'iniezione (la traslocazione è maggiore in seguito all'iniezione sottocutanea rispetto all'iniezione intramuscolare). Inoltre l'intervallo di dosaggio che provoca il trasporto nel cervello può variare a seconda della sede anatomica dell'iniezione.

2) il trasporto dipende inversamente dal dosaggio. Un dosaggio di 200 mcg / kg ha provocato il trasporto nel cervello (e cambiamenti comportamentali) mentre il dosaggio di 400 mcg / kg non ha avuto effetti analoghi. Ciò può essere dovuto al fatto che la mobilità dei macrofagi viene compromessa ad alte dosi. Una maggiore infiammazione locale al sito di iniezione può causare una ridotta mobilità dei macrofagi.⁶⁰

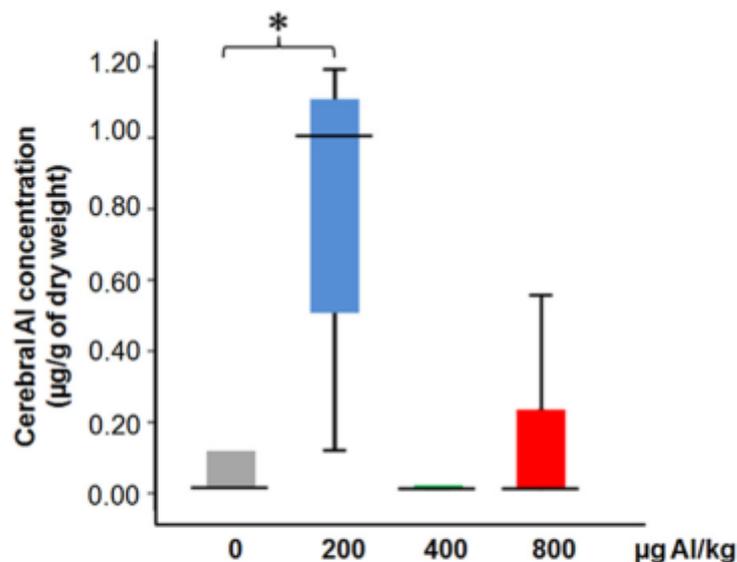


Fig. 3. Aluminium level determination in brain ($\mu\text{g/g}$ of dry weight). Increased cerebral concentrations of aluminium were selectively observed with 200 $\mu\text{g/kg}$ low Alhydrogel[®] dose. 5 mice/group; results expressed as median and range values, with quartiles boxes; non parametric Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney test. * $p < 0.05$.

Highly delayed systemic translocation of aluminum-based adjuvant in CD1 mice following intramuscular injections.

Crépeaux G¹, Eidi H², David MO³, Tzavara E⁴, Giros B⁴, Exley C⁵, Curmi PA³, Shaw CA⁶, Gherardi RK⁷, Cadusseau J⁸.

BMC Med. 2015 Jun 17;13:144.

Fluorescent nanodiamonds as a relevant tag for the assessment of alum adjuvant particle biodisposition.

Eidi H^{1,2}, David MO³, Crépeaux G⁴, Henry L⁵, Joshi V⁶, Berger MH⁷, Sennour M⁸, Cadusseau J^{9,10}, Gherardi RK¹¹, Curmi PA¹².

⁶⁰ Toxicology. 2017 Jan 15;375:48-57.

Non-linear dose-response of aluminium hydroxide adjuvant particles: Selective low dose neurotoxicity.

Crépeaux G¹, Eidi H², David MO³, Baba-Amer Y⁴, Tzavara E⁵, Giros B⁵, Authier FJ⁴, Exley C⁶, Shaw CA⁷, Cadusseau J⁸, Gherardi RK⁴.

3) l'estrema persistenza biologica delle particelle adiuvante Al. Le particelle sono state osservate in tessuti e organi periferici fino a 270 giorni dopo la somministrazione, inclusi il cervello, la milza e i linfonodi.⁶¹

Gli studi di Keith e Mitkus

Gli studi di Keith et al e Mitkus et al sono calcoli teorici dell'assunzione ed escrezione di alluminio. Viene calcolato l'accumulo di alluminio, e confrontato con un livello considerato sicuro (determinato da esperimenti su animali trattati con alluminio somministrato per via orale). Mitkus et al hanno svolto un calcolo più dettagliato e utilizzano un livello inferiore di esposizione all'alluminio definito come "sicuro" rispetto allo studio di Keith et al⁶², motivo per cui si esaminerà quest'ultimo.⁶³

L'analisi svolta da Mitkus si basa sui seguenti passaggi:

1) Trovare il livello più alto al quale "non si osservano effetti avversi" (NOAEL: no-observed adverse effects level) in seguito all'ingestione di Al da studi su animali. Mitkus fa riferimento ad un unico studio (Golub 2001), il quale ha riportato che 26 mg/kg/die non producono effetti avversi negli animali. Così il NOAEL di riferimento è uguale a 26 mg/kg/giorno.

La dose di 26 mg/kg/day utilizzata da Mitkus proviene dal rapporto del 2008 dell'ATSDR⁶⁴

2) Dividere il NOAEL per un fattore 30 di sicurezza (10 per le variazioni nell'uomo, e 3 per le differenze tra specie topo-umano), per applicarlo agli esseri umani. In base a questo calcolo, gli esseri umani (inclusi i neonati) potrebbero ingerire circa 1 mg/kg/die di alluminio senza manifestare effetti negativi. E' anche preso in considerazione il tasso di assorbimento dello 0,2-0,3% per l'Al nel calcolo, per determinare la quantità di Al che entra nel corpo. Questo valore è usato per determinare un "livello di rischio minimo" (LMR). Un'assunzione di Al inferiore alla MRL è ritenuta sicura.

3) Calcolare il "carico corporeo" per l'alluminio adiuvante proveniente dai vaccini, sulla base del dosaggio, la velocità di dissoluzione e di escrezione. Le nanoparticelle di alluminio adiuvante (NA) non sono considerate parte del "carico corporeo", solo l'alluminio disciolto (cioè rilasciato lentamente dalla

⁶¹ Vaccines and Autoimmunity June 2015, Wiley-Blackwell
Yehuda Shoenfeld, Nancy Agmon-Levin, Lucija Tomljenovic
Pag 261-270

⁶² Vaccine. 2002 May 31;20 Suppl 3:S13-7.
Aluminum toxicokinetics regarding infant diet and vaccinations.
Keith LS¹, Jones DE, Chou CH.

⁶³ Vaccine. 2011 Nov 28;29(51):9538-43.
Updated aluminum pharmacokinetics following infant exposures through diet and vaccination.
Mitkus RJ¹, King DB, Hess MA, Forshee RA, Walderhaug MO.

⁶⁴ <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp22.pdf> (pag 24)

dissoluzione delle NA) è incluso nel "carico corporeo" calcolato da Mitkus. Questo è un errore critico, come si spiegherà in seguito.

- 4) Confrontare il "carico corporeo" proveniente dai vaccini con la curva MRL derivata dal NOAEL. Se il carico corporeo si trova al di sotto della curva MRL, l'alluminio adiuvante può essere considerato sicuro.

L'analisi Mitkus è il modo corretto per stimare la tossicità e la ritenzione di sali di alluminio disciolti (come ioni Al^{3+}), ma non riesce a stabilire la sicurezza delle particelle di alluminio adiuvante.

Nell'articolo di Mitkus sono riportati alcuni grafici che dimostrano chiaramente che il carico corporeo di alluminio proveniente dai vaccini è di gran lunga inferiore alla curva di MRL e quindi si può affermare che l'alluminio adiuvante è estremamente sicuro.

Di seguito sono riportate la curva di livello di rischio minimo (MRL) e la curva adiuvante Al proveniente dal fosfato di alluminio adiuvante. L'area rosa ombreggiata mostra il margine di sicurezza calcolato.

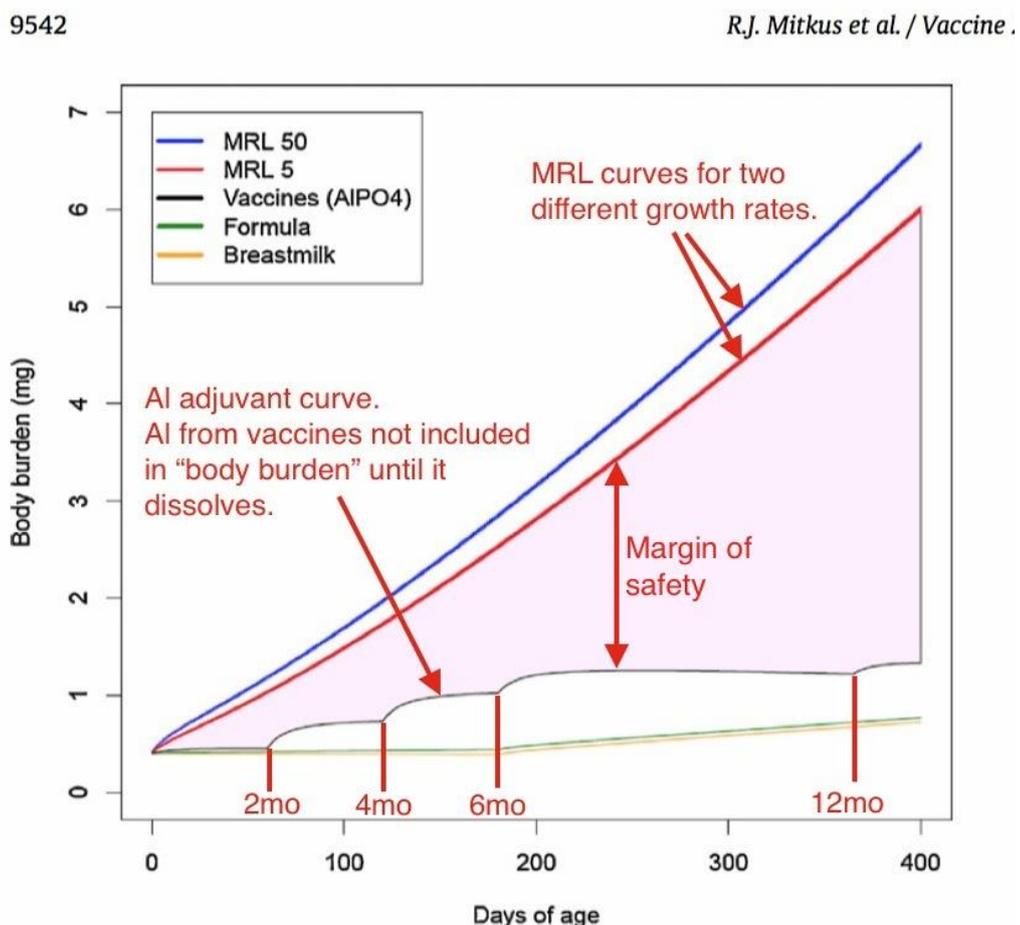


Fig. 3. Body burden contributions of aluminum from diet and vaccines (constant absorption of aluminum phosphate over 56 days based on results of Flarend et al. [27]) relative to current MRL level intake in new born infants. Margin of exposure in pink. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Le curve del "livello di rischio minimo" (LMR) sono calcolate dal NOAEL di ingestione nei topi. Il NOAEL è diviso per un fattore di sicurezza 30 per l'applicazione agli esseri umani. 30 è un fattore di sicurezza ragionevole per la comparazione topi-esseri umani. La curva di alluminio adiuvante indica la quantità di alluminio disciolto dalle nanoparticelle di alluminio adiuvante che è trattenuta nel corpo. La curva dell'Al adiuvante non include le NA non disciolte nel corpo, che Mitkus assume erroneamente essere innocue. Sono mostrati i tempi di vaccinazione a 2, 4, 6, e 12 mesi.

Lo studio di Mitkus presenta diverse criticità quali:

1) La curva di MRL è derivata da esperimenti in cui l'alluminio veniva somministrato per via orale, non da esperimenti con NA iniettate. La sicurezza dell'alluminio adiuvante somministrato per via iniettiva (im o sc) non può essere confrontata con esperimenti eseguiti con sali di alluminio ingeriti. Come già dettagliato sopra, vari studi scientifici ⁶⁵, oltre a quelli già descritti, hanno dimostrato che l'alluminio adiuvante iniettato ha proprietà tossiche uniche e cinetiche che non sono confrontabili con l'alluminio assorbito per via orale.

Pertanto, la curva MRL di Mitkus non rappresenta un limite di sicurezza superiore per le nanoparticelle di alluminio adiuvante iniettato, ma può essere utilizzato solo per stimare la sicurezza dell'alluminio ingerito.

2) 26 mg/kg/ giorno non è un NOAEL (dosaggio sicuro) per gli animali. Il NOAEL indicato è il fondamento dell'analisi di Mitkus, ma non è corretto. Gli animali vengono danneggiati da dosaggi di alluminio molto inferiori a 26mg/kg/ giorno. La letteratura scientifica riporta effetti avversi da dosaggi di alluminio ingeriti di 3.4, 4, 5.6, 6, 10 e 20 mg/kg/die. ⁶⁶ I dosaggi indicati sono espressi in alluminio

⁶⁵ Neuromolecular Med. 2007;9(1):83-100.

Aluminum adjuvant linked to Gulf War illness induces motor neuron death in mice.
Petrik MS¹, Wong MC, Tabata RC, Garry RF, Shaw CA.

J Inorg Biochem. 2009 Nov;103(11):1555-62.

Aluminum hydroxide injections lead to motor deficits and motor neuron degeneration.
Shaw CA¹, Petrik MS.

J Inorg Biochem. 2013 Nov;128:237-44.

Administration of aluminium to neonatal mice in vaccine-relevant amounts is associated with adverse long term neurological outcomes.
Shaw CA¹, Li Y, Tomljenovic L.

⁶⁶ Mol Neurobiol. 2016 Feb 20. [Epub ahead of print]

Neuroprotective Effect of Nanodiamond in Alzheimer's Disease Rat Model: a Pivotal Role for Modulating NF-κB and STAT3 Signaling.
Alawdi SH^{1,2}, El-Denshary ES³, Safar MM⁴, Eidi H⁵, David MO⁵, Abdel-Wahhab MA⁶.

Chemosphere. 2016 May;151:289-95.

Aluminum chloride induces neuroinflammation, loss of neuronal dendritic spine and cognition impairment in developing rat.

Cao Z¹, Yang X¹, Zhang H¹, Wang H¹, Huang W¹, Xu F¹, Zhuang C¹, Wang X², Li Y³.

elementare: poiché $\text{AlCl}_3=20,2\%$ di alluminio elementare, 100 mg di AlCl_3 contengono 20,2 mg di alluminio.

Si noti che 2 articoli (Bilkei-Gorzo 1993 e Sethi et al 2008) sono stati pubblicati prima dell'articolo di Mitkus del 2011, e hanno evidenziato effetti tossici di Al ingerito di gran lunga al di sotto della dose presunta sicura di 26mg/kg/die. Così l'analisi Mitkus si basava su presupposti non validi nel momento in cui è stata pubblicata.

La curva di MRL è quindi troppo alta. Poiché 3.4 mg/kg/die è il dosaggio più basso (finora rilevato) che determina effetti negativi, la curva MRL di Mitkus eccede di un fattore di almeno $26 / 3,4 = 7,6$. Va sottolineato che 3,4 mg /kg/die in realtà non è un NOAEL, in quanto sono stati osservati effetti avversi a questo dosaggio, quindi il NOAEL deve essere decisamente inferiore a 3,4 mg/kg/giorno.

Il grafico di Mitkus rielaborato sulla base di un valore soglia di 3.4mg/kg/die per Al fosfato adiuvante è il seguente:

Neurotoxicology. 2008 Nov;29(6):1069-79.

Aluminium-induced electrophysiological, biochemical and cognitive modifications in the hippocampus of aging rats.

Sethi P¹, Jyoti A, Singh R, Hussain E, Sharma D.

BMC Neurosci. 2013 Mar 11;14:26.

Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 is a key modulator of aluminum-induced neuroinflammation.

Zaky A¹, Mohammad B, Moftah M, Kandeel KM, Bassiouny AR.

Food Chem Toxicol. 1993 May;31(5):357-61.

Neurotoxic effect of enteral aluminium.

Bilkei-Gorzó A¹.

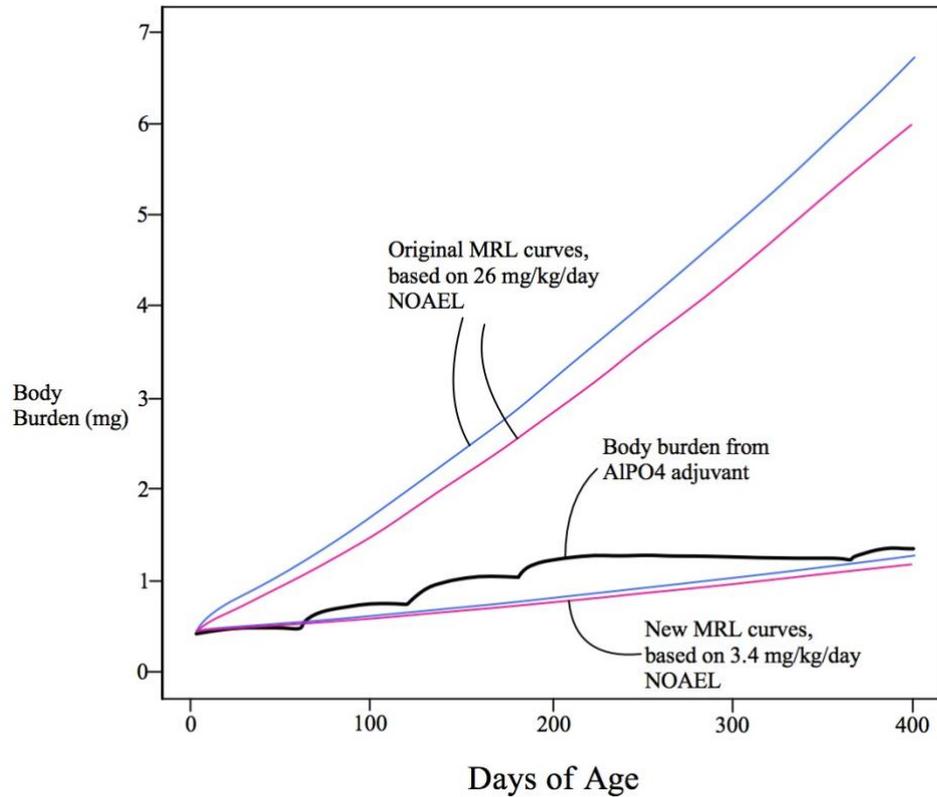
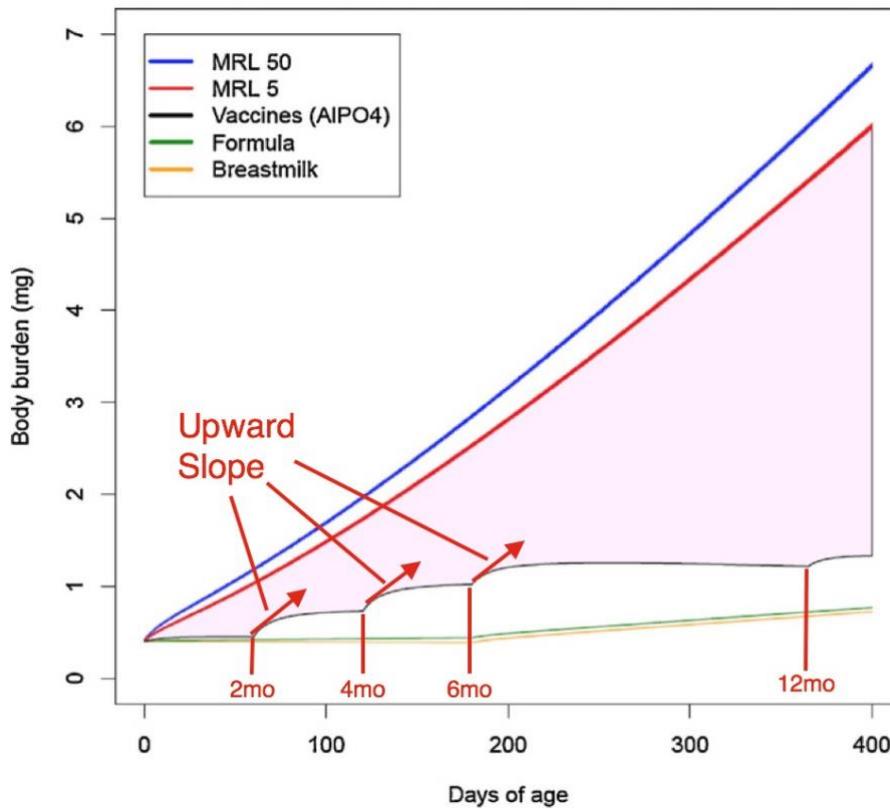
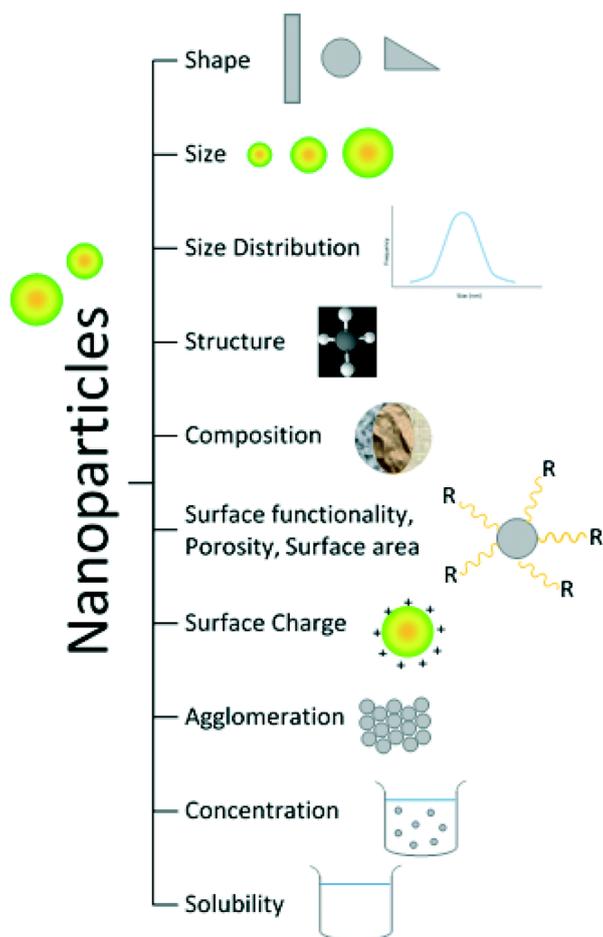


Figura di Mitkus per $AlPO_4$ corretta in conformità con il dato che l'ingestione di 3,4 mg/kg/die di Al provoca effetti negativi. Ora il carico corporeo supera la curva MRL per quasi tutto il primo anno di vita, indice di tossicità. Il margine di sicurezza per l' $AlPO_4$ è superato.

- 3) Mitkus presuppone che l'alluminio adiuvante abbia una tossicità pari a zero, sebbene sia in forma di nanoparticelle. Nell'analisi di Mitkus, l'alluminio contribuisce al carico corporeo solo dopo la sua dissoluzione nel sangue (cioè quando viene rilasciato dalle NA come ione Al^{3+}). Questo è il motivo per cui la curva dell'Al adiuvante ha una pendenza verso l'alto dopo ogni somministrazione vaccinale. Il carico corporeo aumenta man mano che le NA si dissolvono e rilasciano Al ionico in circolo. Nel grafico sotto riportato si evidenzia questo effetto:



Come abbiamo già discusso, le nanoparticelle di adiuvante non sono innocue, nè inerti! Sono invece biologicamente attive, e questo è il motivo per cui vengono utilizzate nei vaccini. Le NA causano infiammazione e attivazione del sistema immunitario (polarizzazione Th2 del sistema immunitario, produzione di citochine infiammatorie, attivazione del complemento), e come già visto viaggiano in tutte le parti del corpo (incluso il cervello che è protetto dalla barriera ematoencefalica dall'ingresso degli ioni Al^{3+}). Inoltre, è ben noto che la tossicità delle nanoparticelle dipende dalle dimensioni e altre proprietà quali:



e non è soltanto una funzione degli ioni rilasciati ⁶⁷.

⁶⁷ Chem Soc Rev. 2012 Mar 21;41(6):2323-43.

Toxicity of nanomaterials.

Sharifi S¹, Behzadi S, Laurent S, Forrest ML, Stroeve P, Mahmoudi M.

Daru. 2014 Aug 15;22:59. doi: 10.1186/s40199-014-0059-4.

Toxicity of nanomaterials; an undermined issue.

Mogharabi M, Abdollahi M, Faramarzi MA.

Rahi A, Sattarahmady N and Heli H. Toxicity of Nanomaterials-Physicochemical Effects.

Austin J Nanomed Nanotechnol. 2014;2(6): 1034

Biotechnol Adv. 2014 Jul-Aug;32(4):727-43. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.12.009. Epub 2014 Jan 2.

Toxicity of inorganic nanomaterials in biomedical imaging.

Li J¹, Chang X¹, Chen X², Gu Z¹, Zhao F³, Chai Z⁴, Zhao Y¹.

E' noto infatti che le dimensioni e l'area della superficie delle nanoparticelle (NP) sono caratteristiche cruciali dal punto di vista tossicologico, in quanto le interazioni tra nanomateriali e organismi biologici in genere hanno luogo sulla superficie della NP. Come le dimensioni delle particelle diminuiscono, la superficie aumenta esponenzialmente, una maggiore proporzione degli atomi o molecole che compongono le NP viene esposta sulla superficie rispetto all'interno della massa del materiale e la potenziale superficie con attività catalitica per le reazioni chimiche aumenta. Inoltre è anche noto che la natura dell'interfaccia tra nanomateriali e sistemi biologici influenza la biocompatibilità in vivo e la tossicità delle NP.

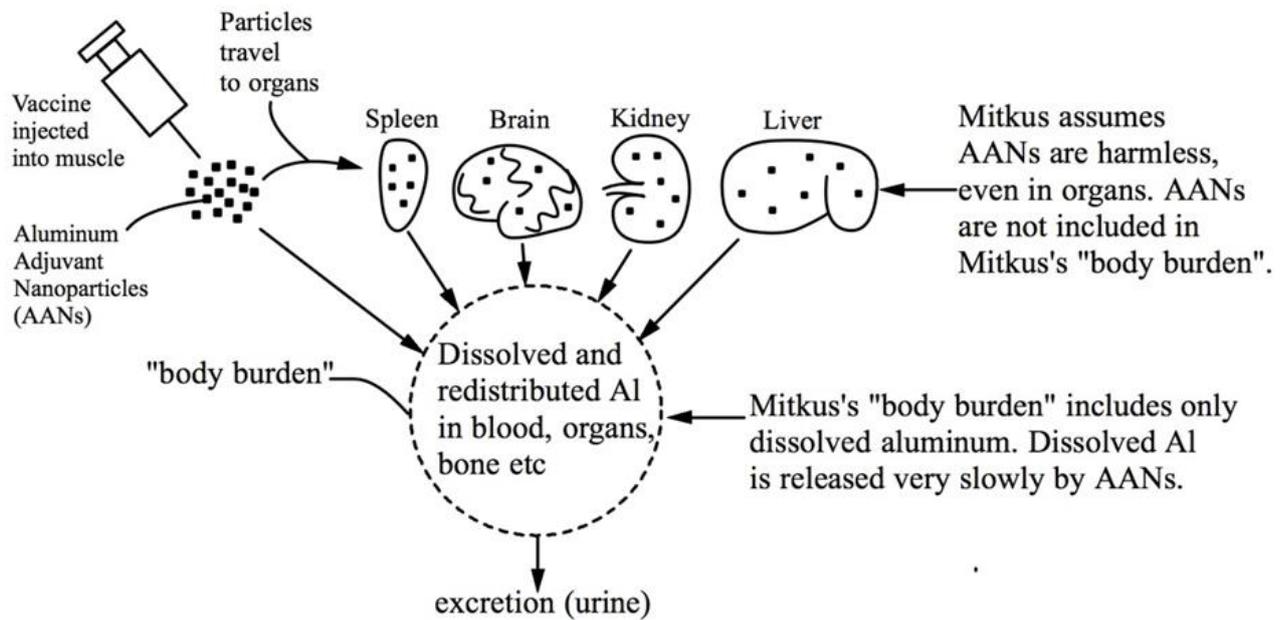
Quindi, la superficie delle nanoparticelle è chimicamente reattiva e catalitica, e può produrre meccanismi di tossicità non correlati alla tossicità degli ioni disciolti:

Table 1: Possible nanomaterials effects as the basis for pathophysiology and toxicity.

Experimental nanomaterials effects	Possible pathophysiological outcomes
ROS generation	Protein, DNA and membrane injury, oxidative stress
DNA damage	Mutagenesis, metaplasia, carcinogenesis
Oxidative stress	Phase II enzyme induction, inflammation, mitochondrial perturbation
Mitochondrial perturbation	Inner membrane damage, permeability transition (PT), pore opening, energy failure, apoptosis, apo-necrosis, cytotoxicity
Inflammation	Tissue infiltration with inflammatory cells, fibrosis, granulomas, atherogenesis, acute phase protein expression (e.g., C-reactive protein)
Uptake by reticuloendothelial system	Asymptomatic sequestration and storage in liver, spleen, lymph nodes, possible organ enlargement and dysfunction
Protein denaturation, degradation	Loss of enzyme activity, auto-antigenicity
Nuclear uptake	DNA damage, nucleoprotein clumping, autoantigens
Perturbation of phagocytic function "particle overload," mediator release	Chronic inflammation, fibrosis, granulomas, interference in clearance of infectious agent
Endothelial dysfunction, effects on blood Clotting	Atherogenesis, thrombosis, stroke, myocardial infarction
Altered cell cycle regulation	Proliferation, cell cycle arrest, senescence

Ne segue che non è corretto considerare solo gli ioni disciolti, come ha fatto Mitkus, ignorando completamente la tossicità delle NA, come riassunto nella seguente figura:

presupposto errato di Mitkus



Le nanoparticelle di Al adiuvante iniettato (AANS) viaggiano in organi distanti e si dissolvono lentamente (nel corso di mesi e anni). Mitkus assume che le AANS hanno tossicità a zero, anche se presenti in organi sensibili come il cervello. Mitkus presuppone che l'alluminio diventi tossico solo dopo che le AANS vanno in soluzione, ma questa ipotesi è contestata da esperimenti su animali che dimostrano in maniera evidente il contrario.

Come ulteriore approfondimento sulla tossicità delle dosi di alluminio somministrate si riportano alcune tabelle tratte dai seguenti articoli:

-Curr Med Chem. 2011;18(17):2630-7. Aluminum vaccine adjuvants: are they safe? Tomljenovic L¹, Shaw CA⁶⁸

-Immunol Res. 2013 Jul;56(2-3):304-16. Aluminum in the central nervous system (CNS): toxicity in humans and animals, vaccine adjuvants, and autoimmunity. Shaw CA¹, Tomljenovic L⁶⁹

perché permettono di chiarire l'aspetto della tossicità dell'alluminio come adiuvante:

⁶⁸ Curr Med Chem. 2011;18(17):2630-7.
Aluminum vaccine adjuvants: are they safe?
Tomljenovic L¹, Shaw CA

⁶⁹ Immunol Res. 2013 Jul;56(2-3):304-16.
Aluminum in the central nervous system (CNS): toxicity in humans and animals, vaccine adjuvants, and autoimmunity.
Shaw CA¹, Tomljenovic L.

Table 1. Neurodevelopmental Toxicity of Aluminum Compounds in Various Species

Aluminum source/compound	Dose & duration	Route	Species	Neurodevelopmental adverse effects
Standard infant feeding solution	~20 µg/kg/day, >10 days	Intravenous (parenteral)	Human, premature infants	Reduced developmental attainment at the corrected post-term age of 18 months, as evidenced by significantly lower Bayley Mental Development Index (BMDI) scores (mean loss of one point on the BMDI/day of full intravenous feeding, after adjustment for potentially confounding factors) compared to infants fed with Al-depleted solutions [32]
Al-containing antacids	Chronic	Oral	Human infants	Craniosynostosis (premature ossification of the skull and obliteration of the sutures) [33]
Al-containing dialysis fluid (derived from Al-sulphate treated tap water)	1 ppm, chronic (2-5 years)	Intravenous	Human, kidney failure patients (15-61 years old at the start of the dialysis treatment)	Speech impairments (stuttering, dysarthria, dyspraxia, motor aphasia), movement disorders (twitches, tremors, myoclonic jerks, seizures, motor apraxia), cognitive impairments and behavioural changes (progressive dementia, paranoia, confusion, psychosis), death [21]
Al-sulphate (present as flocculant in potable water supplies, accidentally released in high amounts)	500-3000 x the acceptable limit under European Union legislation (0.200 mg/L), chronic (15 years)	Oral	Human adult (female, 44 years old)	Sporadic early-onset β amyloid angiopathy (Alzheimer's-related disease), difficulty in finding words, progressive dementia, visual hallucinations headache, anxiety, cerebral ischaemia, death [34]
Various dietary	Chronic	Oral	Elderly human subjects	Impaired visuo-motor coordination, poor long-term memory, and increased sensitivity to flicker (correlated with high Al-serum levels [35])
Al-oxide fumes, occupational exposure	0.13-1.95 mg/m ³ , chronic	Inhalation	Human, adults (mean age 39 years)	Headache, emotional irritability, concentration difficulty, insomnia, mood lability [36]
Various: Al-chloride, Al-phosphate, Al-powder slurry	Single sub-lethal dose	Intracerebral injection	Cats, rabbits	Decline in memory, impaired learning responses, deterioration in psychomotor control, epileptic seizures and death, neurofibrillary degeneration (resembling Alzheimer's disease neurofibrillary tangles [37-42])
Al-hydroxide	2 injections, 2 weeks apart	Subcutaneous injection (behind the neck)	Mice, 3-month old	Motor neuron degeneration and apoptosis, motor function deficits, decrease in strength, cognitive deficits and decreased performance in learning tasks, decrements in spatial memory, activation of microglia [43, 44]
Al-containing food pellets	0.5-1.7 mg/kg/day (typical human), chronic (22-32 months)	Oral	Rats, 6-month old at the start of treatment	Cognitive deterioration and impaired performance in learning tasks, impaired concentration, behavioural changes including confusion and repetitive behaviour [45]
Al-lactate	500-1000 ppm, chronic (during gestation and lactation)	Oral	Mice dams	Hind limb paralysis, seizures and death (dams), lower neurobehavioral development and altered performance on a neurobehavioural test battery in pups (foot splay, forelimb and hind limb grip strengths [46])

Da questa tabella si evidenzia che lattanti alimentati con soluzioni parenterali contenenti circa 20 mcg/Kg/die per più di 10 giorni, presentavano a 18 mesi un ritardo nello sviluppo neurologico (ref. 32 della tabella: Bishop, N.J.; Morley, R.; Day, J.P.; Lucas, A. Aluminum neurotoxicity in preterm infants receiving intravenous-feeding solutions. *N Engl J Med.* 1997, 336(22), 1557-1561).

Un altro importante dato proviene dall'analisi della seguente tabella:

Table 3. Comparison of aluminum body burden from vaccines in children and adults. Note that the closest an adult can get to the aluminum body burden from vaccines that compares to that of a child is in special circumstances, such as Gulf War deployed military personnel. Each anthrax vaccine administered to Gulf War veterans contained 1200 µg Al/mL (600 µg Al/dose) [59]. Currently licensed hepatitis B vaccines Engerix-B and Recombivax contain 250 (pediatric) and 500 µg Al/dose (adult) [3]. Age-specific weights were sourced from Haddad and Krishnan [60]

	An infant receiving 1 HepB injection (250 µg/dose) at birth	A 2-month old receiving the full U.S. scheduled set of injections	An adult receiving 6 anthrax injections over 18 months	An adult receiving 73.5 µg/kg bw/visit from HepB at 500 µg/dose	An adult receiving 245 µg/kg bw/visit from HepB at 500 µg/dose
Total Al (µg)	250	1225	3600	5145	17,150
Bw (kg)	3.4	5	70	70	70
Total Al µg/kg bw/day	73.5	245	51.4	73.5	245
# of Al-adjuvanted HepB at 500 µg/dose	NA	NA	NA	10	34

In questa tabella si confrontano le concentrazioni di Al nei neonati che ricevono il vaccino contro l'epatite B e i vaccini secondo il calendario negli USA a 2 mesi, e quelle di adulti che ricevono 6 dosi di vaccino contro l'antrax o l'epatite B in due dosaggi diversi per adulti.

Come si può vedere un neonato riceve 73.5 µg Al/kg di peso corporeo (bw)/die (day) con una dose singola di vaccino equivalente a 10 dosi standard del vaccino per adulti (4^a colonna e ultima riga) in singola somministrazione.

Sebbene non siano ancora stati fatti studi specifici sulla tossicità dell'alluminio negli adulti, sono documentati effetti negativi associati alle vaccinazioni multiple somministrate entro un breve periodo di tempo, in militari che hanno sviluppato la Sindrome del Golfo dopo sei inoculi di vaccino contro l'antrax (che come si può vedere ha una concentrazione di 51,4 µg Al/kg bw/day, inferiore a quella raggiunta nei lattanti!!); tali dati suggeriscono che adulti con predisposizioni sfavorevoli sono vulnerabili agli effetti dell'alluminio contenuto nei vaccini sul sistema nervoso centrale. E' importante notare che le vaccinazioni contro l'antrax sono state somministrate entro un periodo di tempo di 18 mesi, mentre la stessa concentrazione di alluminio viene raggiunta con un solo inoculo nei lattanti!

Come già visto, l'uso degli adiuvanti è proprio quello di favorire una risposta immunitaria efficace; senza gli adiuvanti gli antigeni verrebbero totalmente degradati nel sito d'iniezione dagli enzimi DNAsi ; il legame tra adiuvante e antigene modifica la conformazione dell'antigene rendendolo sì resistente agli enzimi di degradazione, **ma anche causando la formazione di anticorpi diversi da quelli che si producono in risposta all'agente infettivo selvaggio**; le conseguenze sono l'accesso dei virus vaccinici veicolati con l'adiuvante in ogni distretto dell'organismo e lo sviluppo di uno stato di infezione latente e subclinica, che attiva il sistema immunitario in maniera cronica senza però eliminare il virus. ⁷⁰

I virus/batteri vaccinici vengono manipolati in modo da non essere in grado di sviluppare la malattia, e quindi anche la stimolazione del sistema immunitario da parte degli antigeni presenti nei vaccini è diversa da quella naturale, la risposta del sistema immunitario è più debole e limitata nel tempo perché la risposta

⁷⁰ Nat Rev Rheumatol. 2009 Nov;5(11):648-52.

Vaccines and autoimmunity

Nancy Agmon-Levin, Ziv Paz, Eitan Israeli & Yehuda Shoenfeld

innata è inferiore, motivo per cui sono necessari più richiami di vaccino, e ciò predispone allo sviluppo di autoanticorpi sia a causa della somiglianza tra parti dell'antigene modificato ed elementi dell'organismo (mimetismo molecolare), che al rilascio di antigeni del self in seguito all'infiammazione indotta dai vari componenti tossici presenti nel vaccino.⁷¹

A titolo di esempio si riporta la tabella estratta dalla ref. 72 sugli effetti dannosi dell'alluminio sul sistema immunitario:

Table 1 Shared aspects between autoimmune/inflammatory conditions and immunostimulatory properties of AI vaccine adjuvants

Disease	Condition		AI adjuvant	
	Th shift	Inflammatory profile	Inflammatory profile	General immunostimulatory effects
Arthritis*†	Excessive Th1 ²⁰	Increased IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α , IFN- γ , MIP-1 α and oxidative stress ^{20,55,63}	Increases cytokines (IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-18, TNF- α), chemokines (IL-8, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β), ROS, and nitric oxide (NO) ^{8,27,28,41,42,55}	Stimulates recruitment of monocytes, macrophages and granulocytes to the injection site
Autoimmune thyroid disease	Excessive Th1 ²⁰			
Inflammatory bowel disease (IBD)/ Crohn's disease (CD)	Excessive Th1 ⁵⁵	Increased NLRP3 inflammasome complex signalling and NLRP3-dependent overproduction of IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF- α and reactive oxygen species (ROS) in MS, EAE, Type 1 diabetes mellitus ⁶⁴⁻⁶⁶ and animal models of IBD ⁶⁷	Increases cytokines (IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-18, TNF- α), chemokines (IL-8, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β), ROS, and nitric oxide (NO) ^{8,27,28,41,42,55}	Induces differentiation of monocytes to antigen presenting cells (APCs)
Type 1 diabetes mellitus*	Excessive Th1 ²⁰		Activates the NLRP3 inflammasome complex and NLRP3-dependent cytokines ^{7,8}	Activates APCs
Multiple sclerosis (MS)*† and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)	Excessive Th1 ²⁰			Promotes antigen uptake and processing by APCs and enhances antigen-specific T-cell responses
Systemic lupus erythematosus (SLE)*	Excessive Th2 ^{20,56}	Increased IL-10, IL-18, IL-6, IFN- γ , TNF- α ^{20,56,68}		Increases the expression of MHC class I and II and associated co-stimulatory molecules on peripheral blood monocytes
Macrophagic myofasciitis (MMF) and chronic fatigue syndrome (CFS)*†	Excessive Th2 ⁵⁷⁻⁵⁹	Increased IL-4, IL-6, B-cell hyperlymphocytosis, infiltration of large periodic acid-schiff (PAS)-positive macrophages, and CD8 ⁺ T lymphocytes in the absence of conspicuous muscle fibre damage ^{57,59,69}		Activates the complement cascade
Gulf War Syndrome (GWS)*†	Mixed Th1/Th2 ⁶⁰	Increased IFN- γ , IL-5, IL-6 ⁶⁰		Generally stimulates Th2 responses but can also induce a Th1 shift and activate cytotoxic T lymphocytes (CTLs) in the presence of other Th1 stimulators (i.e., lipopolysaccharide (LPS), CpG, recombinant influenza protein antigen) ^{27,73-75}
Autism spectrum disorders (ASD)*	Both Th1 and Th2 shifts have been reported ^{61,62}	Increased IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, TNF- α , IL-8, MCP-1, MIP-1 β , MHC class II ^{61,70,71}		Activates astrocytes and microglia ⁷⁶

*linked to AI-adjuvanted vaccines.^{6,35,38,77-79}

†specifically recognized as 'Autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants' ('ASIA').⁶

⁷¹ Autoimmune Diseases, 18 pages 2014

A Potential Link between Environmental Triggers and Autoimmunity

Aristo Vojdani,

Chem Res Toxicol. 2010 Mar 15;23(3):455-66.

Toxicology of autoimmune diseases.

Pollard KM¹, Hultman P, Kono DH.

Vaccines and Autoimmunity

Yehuda Shoenfeld, Nancy Agmon-Levin, Lucija Tomljenovic

June 2015, Wiley-Blackwell 384 pages

⁷² Lupus. 2012 Feb;21(2):223-30.

Mechanisms of aluminum adjuvant toxicity and autoimmunity in pediatric populations.

Tomljenovic L¹, Shaw CA.

Come si può vedere l'alluminio agisce, proprio per la sua proprietà di adiuvante, stimolando il sistema immunitario e inducendo un ampio spettro di patologie.

Le contaminazioni

Per quanto riguarda la presenza di contaminanti, Hexavac può contenere vari tipi di contaminazioni quali: tossine non inattivate, sostanze chimiche utilizzate per la produzione dei vari antigeni, contaminazioni da parte di eventuali virus, e altri microorganismi che possono infettare i medium di coltura. [89, 90] Tali contaminazioni possono avvenire perché alcuni virus e batteri sono in grado di evadere il rilevamento da parte dei test, i quali normalmente vengono eseguiti su matrici artificiali in cui viene posto un campione di cellule, oppure eseguono la determinazione di proteine o marcatori genetici specifici dei microorganismi; alcuni microbi però non crescono in maniera appropriata in queste matrici artificiali (comunque molto diverse dalla situazione in vivo in cui si trovano quando vengono inoculati) e quindi non vengono rilevati dal test, oppure possono sviluppare delle mutazioni o varianti che li rendono non riconoscibili dai test.

Ne segue che **il rischio di contaminazioni da parte di microorganismi può essere ridotto considerevolmente ma non eliminato del tutto** (alcuni esempi da segnalare sono la contaminazione da SV40 nel vaccino antipolio ⁷³, del Bacillo cereus nel vaccino Haemophilus influenzae type B e suoi vaccini associati ⁷⁴, di prioni nei vaccini che utilizzano tessuti di origine animale⁷⁵, di porcine circovirus type 1 (PCV1) DNA nel vaccino Rotarix ⁷⁶, di virus influenzale nel vaccino antinfluenzale Fluvirin).⁷⁷)

⁷³ Cancer Research 2005 Nov 15;65(22):10273-9.

Some oral poliovirus vaccines were contaminated with infectious SV40 after 1961.
Cutrone R¹, Lednicky J, Dunn G, Rizzo P, Bocchetta M, Chumakov K, Minor P, Carbone M.

⁷⁴ Pharmacoepidemiol Drug Saf. 2010 Mar;19(3):306-10.

Safety assessment of recalled Haemophilus influenzae type b (Hib) conjugate vaccines--United States, 2007-2008.

Huang WT¹, Chang S, Miller ER, Woo EJ, Hoffmaster AR, Gee JE, Clark TA, Iskander JK, Ball R, Broder KR.

⁷⁵ Bovine Derived Materials Used in Vaccine Manufacturing Questions and Answers

<http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/QuestionsaboutVaccines/ucm143521.htm>

⁷⁶ Hum Vaccin Immunother. 2013 Aug 28;9(11).

Investigation of a regulatory agency enquiry into potential porcine circovirus type 1 contamination of the human rotavirus vaccine, Rotarix™: Approach and outcome.

Dubin G¹, Toussaint JF, Cassart JP, Howe B, Boyce D, Friedland L, Abu-Elyazeed R, Poncelet S, Han HH, Debrus S.

⁷⁷ Recall of FLUVIRIN (Influenza Virus Vaccine) 2010-2011 Formula Multidose Vial

<http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/SafetyAvailability/Recalls/ucm238117.htm>

A questi si aggiunga la contaminazione da endotossina nel vaccino Hib ⁷⁸, la reversione del tossoide di *C. difficile* ⁷⁹ e la presenza di attività enzimatica residua nel tossoide del tetano ⁸⁰, la contaminazione di DNA polimerasi nelle preparazioni del vaccino dell'Epatite B, quale possibile causa della reazione autoimmune indotta dall'antigene vaccinico contro la mielina ⁸¹, e la contaminazione con alti livelli di DNA fetale proveniente dalle linee cellulari umane fetali utilizzate per la coltura dei virus del vaccino MPR, quale causa plausibile dell'alta instabilità genetica evidenziata soprattutto nei bambini con disturbi cognitivi e ritardo nello sviluppo psicomotorio ⁸².

Anche la linea cellulare Vero, impiegata per ottenere il vaccino della polio utilizzato nella produzione dell'Hexavac, può presentare contaminazioni virali e microbiche ⁸³.

Ad oggi non risultano pubblicati studi approfonditi da parte del Ministero o della Sanofi sulle contaminazioni dell'Hexavac (ad esempio il sequenziamento e la tipizzazione di tutto il materiale genetico presente proveniente da virus e batteri che contaminano normalmente i mezzi di coltura).

⁷⁸ Jpn J Infect Dis. 2004 Apr;57(2):58-9.

Endotoxin content in Haemophilus influenzae type b vaccine.

Ochiai M¹, Kataoka M, Toyozumi H, Yamamoto A, Kamachi K, Arakawa Y, Kurata T, Horiuchi Y.

⁷⁹ Vaccine. 2015 Jan 1;33(1):252-9.

Detecting and preventing reversion to toxicity for a formaldehyde-treated *C. difficile* toxin B mutant.

Wang B¹, Wang S¹, Rustandi RR¹, Wang F¹, Mensch CD¹, Hong L¹, Kristopeit A¹, Secore S¹, Dornadula G¹, Kanavage A¹, Heinrichs JH¹, Mach H¹, Blue JT¹, Thiriout DS².

⁸⁰ Vaccine. 2008 Jul 23;26(31):3835-41.

Residual enzymatic activity of the tetanus toxin light chain present in tetanus toxoid batches used for vaccine production.

Behrendorf-Nicol HA¹, Kegel B, Bonifas U, Silberbach K, Klimek J, Weiber K, Krämer B

⁸¹ Med Hypotheses. 2005;65(3):509-20.

Multiple sclerosis and hepatitis B vaccination: could minute contamination of the vaccine by partial hepatitis B virus polymerase play a role through molecular mimicry?

Faure E¹.

⁸² Issues Law Med. 2015 Spring;30(1):47-70.

Epidemiologic and Molecular Relationship Between Vaccine Manufacture and Autism Spectrum Disorder Prevalence.

Deisher TA, Doan NV, Koyama K, Bwabye S.

J Immunotoxicol. 2011 Jan-Mar;8(1):68-79.

Theoretical aspects of autism: causes--a review.

Ratajczak HV¹

⁸³ Expert Rev Vaccines. 2009 May;8(5):607-18.

Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines.

Barrett PN¹, Mundt W, Kistner O, Howard MK.

Come è riportato nelle linee guida internazionali per la produzione dei vaccini le contaminazioni provenienti dal processo di produzione o dalle materie prime impiegate vengono testate in campioni prelevati dai vari lotti, secondo metodiche certificate per contaminanti specifici noti, che devono normalmente risultare come residui sotto i limiti imposti per legge; ne segue che **le linee guida stesse ammettono e permettono la presenza di contaminazioni, per le quali in realtà non sono disponibili dati sulla loro tossicità in seguito a somministrazione per via intramuscolare nei neonati.**

Per quanto riguarda invece i test di sicurezza fatti sugli animali ci sono molte variabili che rendono i risultati ottenuti non sempre estrapolabili per l'uomo. ⁸⁴ Un esempio emblematico della differenza tra i risultati sull'animale e sull'uomo è lo studio di Pekarek e R. ⁸⁵, con il quale si dimostrò che la somministrazione del vaccino DTP ai ratti causava lo sviluppo di scorbuto acuto in grado di guarire spontaneamente entro 24 ore. I neonati invece non hanno il vantaggio dei ratti di produrre la vitamina C nel loro corpo e dipendono dagli alimenti per avere l'adeguato apporto di questa vitamina essenziale. Quando ai neonati viene somministrato lo stesso vaccino sviluppano uno scorbuto acuto che non guarisce da solo a meno che non venga dato immediatamente un supplemento di vitamina C ad alte dosi; questo ovviamente non succede mai perché quando i neonati con reazioni avverse ai vaccini vengono ricevuti al pronto soccorso spesso si somministrano antibiotici che aggravano ulteriormente la deficienza di vitamina C.

Lo scorbuto ha un effetto dannoso su tutti i tessuti dell'organismo e se non riconosciuto può portare ad un'erronea diagnosi di Shaken Baby Syndrome ⁸⁶

⁸⁴ EVM reflection paper on the Safety Assessment of Residuals and Contaminants in Vaccines
<http://www.vaccineseuropa.eu/wp-content/uploads/2012/12/EVM-Safety-Assessment-of-Residuals-and-Contaminants-in-Vaccines>

Minimum requirements for biological products
http://www.nih.go.jp/niid/images/qa/seibutuki/MRBP_english/mrbp_2006.pdf

Guidance for Industry – Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Materials Used in the production of Viral Vaccines for Infectious Disease – Indications
<http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Vaccines/UCM202439.pdf>

Guidelines on the nonclinical evaluation of vaccine adjuvants and adjuvanted vaccines
http://www.who.int/biologicals/areas/vaccines/ADJUVANTS_Post_ECBS_edited_clean_Guidelines_NCE_Adjuvant_Final_17122013_WEB.pdf

⁸⁵ J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol 3:79-84 (1959).
An endocrinological test for innocuity of the pertussis vaccine.
Pekarek J and Rezabek K

⁸⁶ Clinical Medicine Research. Vol. 2, No. 6, 2013, pp. 154-157
Autoimmune Tissue Scurvy Misdiagnosed as Child Abuse
Michael D Innis

Le reazioni avverse di HEXAVAC

Nell' RCP dell'Hexavac sono elencate varie patologie quali reazioni avverse:

Dati di farmacovigilanza derivanti dagli studi clinici pre-registrazione:

Nel corso degli studi clinici, più di 3.900 lattanti e 4.400 bambini (di età compresa tra 12 e 20 mesi) hanno ricevuto HEXAVAC.

Le reazioni più comunemente riportate, includono eritema e/o indurimento/gonfiore/dolore nel punto d'iniezione, febbre uguale o superiore a 38 °C, irritabilità, sonnolenza, perdita di appetito, insonnia, diarrea e vomito. Meno comunemente sono stati riportati febbre uguale o superiore a 40 °C, sensibilità nel punto di iniezione, pianto prolungato ed inconsolabile ed eritema e/o indurimento > 7 cm nel sito di inoculo o gonfiore nell'intero arto. Raramente sono stati osservati convulsioni febbrili e pianto acuto. E' stato riportato un solo caso di reazione edematosa bilaterale agli arti inferiori, ed un solo, episodio di ipotonia-iporesponsività.

Questi segni e sintomi normalmente si sono manifestati nelle 48 ore successive alla vaccinazione. Nella maggior parte dei casi si trattava di episodi di lieve entità la cui durata è stata generalmente sino a 72 ore dalla vaccinazione e che si sono poi risolti spontaneamente.

Non è stato notato nessun aumento nel numero degli effetti indesiderati tra la prima, seconda e terza dose della vaccinazione primaria, eccetto che per un lieve aumento dei casi di febbre con temperatura uguale o superiore a 38 °C dopo la seconda dose della serie primaria.

La frequenza di febbre con temperatura uguale o superiore a 40 °C aumentava dopo la dose di richiamo ma rimaneva < 1 %. I casi di eritema e/o indurimento > 7 cm nel sito di inoculo aumentavano dopo la dose di richiamo, ma rimanevano < 1 %. In rare circostanze, i suddetti casi erano associati ad edema dell'intero arto.

Dati di farmacovigilanza post-registrazione

Dopo un ampio utilizzo di HEXAVAC sono stati riportati i seguenti ulteriori effetti indesiderati:

Comuni (>1/100 e <1/10)

Reazioni locali (al sito di iniezione): Edema, Prurito, Orticaria

Medical Sentinel;2001:6(3),83-89

Shaken Baby Syndrome or Vaccine Induced Encephalitis

Buttram H E.

J. Aust. Coll. Nutr. & Env. Med. Vol. 23 No. 3 (December 2004) pages 1-5

Dynamics of critical days as part of the dynamics of non-specific stress syndrome discovered during monitoring with Cotwatch breathing monitor.

Dr Viera Scheibner

Rari (>1/10,000 e <1/1,000)

Organismo nel suo insieme - Disturbi generali: Pianto prolungato o anomalo.

Molto rari (<1/10,000)

Organismo nel suo insieme - Disturbi generali: reazioni allergiche, brividi, affaticamento, episodi di ipotonia-iporesponsività, malessere, edema, pallore, gonfiore o edema a livello degli arti, ingrossamento transitorio dei linfonodi locali.

Disturbi a carico del sistema nervoso centrale e periferico: convulsioni (febrili e non febrili), encefaliti, encefalopatia con edema acuto a livello dell'encefalo, revulsione dei bulbi oculari, sindrome di Guillain Barrè, ipotonia, neuriti.

Disturbi all'apparato gastro-intestinale: dolore addominale, meteorismo, nausea.

Disturbi a carico delle piastrine, disturbi di natura emorragica e della coagulazione: petecchie, porpora, porpora trombocitopenica, trombocitopenia.

Disturbi psichiatrici: agitazione, disturbi del sonno.

Disturbi a carico del sistema respiratorio: dispnea, stridore inspiratorio.

Disturbi a carico di cute ed annessi cutanei: angioedema, eritema, prurito, rash, orticaria.

Disturbi a carico del sistema vascolare (extracardiaco): flushing

Potenziali effetti indesiderati

Inoltre, sono stati riportati altri effetti indesiderati riferibili all'impiego di vaccini in commercio strettamente correlati ad HEXAVAC.

Gli effetti indesiderati riportati nel corso delle sperimentazioni cliniche e quelli riferibili all'impiego sul mercato del vaccino adsorbito antidifterico, antitetanico, antipertussico acellulare, anti-Haemophilus influenzae di tipo b ed antipolio inattivato Aventis Pasteur MSD, sono inclusi nell'elenco degli effetti indesiderati di HEXAVAC.

Reazioni molto rare conseguenti alla somministrazione del vaccino Aventis Pasteur MSD anti-epatite B (ricombinante) includono alopecia, ipotensione, neurite ottica, paralisi facciale, eritema multiforme ed anafilassi. Come per altri vaccini anti-epatite B, in molti casi, la relazione causa/effetto non è stata stabilita.

Da quanto discusso finora sui componenti del vaccino Hexavac è quindi dimostrabile la sua neurotossicità, documentata anche nell'RCP del vaccino stesso come appena riportato.

VALUTAZIONE DEL RISCHIO ASSOCIATO ALLA SOMMINISTRAZIONE DELL'HEXAVAC

Nella Guida alle Controindicazioni alle Vaccinazioni dell'ISS del 2013

(http://www.iss.it/binary/publ/cont/09_13_web.pdf) è riportato che:

“La dimensione del rischio può essere direttamente valutata ricorrendo all'individuazione degli eventi avversi e della loro frequenza e gravità”

Le controindicazioni vere e false sono state quindi formulate sulla base dei risultati ottenuti dall'analisi dei dati di farmacovigilanza post-marketing sulle reazioni avverse ai vaccini e sugli studi clinici di sicurezza di fase III. Si tenga presente che la rete di farmacovigilanza a sua volta si basa su dati di segnalazione passiva delle reazioni avverse.

E' importante far notare che uno studio svolto nel 1993 ⁸⁷ aveva stimato che solo il 10% delle reazioni avverse gravi viene riconosciuto e segnalato! Nonostante lo studio sia di ben più di 20 anni fa il problema della sottostima rimane tuttora un limite reale. L'FDA infatti continua a sottolineare le difficoltà nell'ottenere un dato reale dell'incidenza delle reazioni avverse: <http://www.vaccinesafety.edu/VAERS.htm>

“Underreporting. Underreporting is an inherent problem of passive surveillance systems, including VAERS. This variability in underreporting can make it hazardous to assume that the relative frequencies of adverse events in VAERS reflects their relative rates of occurrence.

Sottostima. *La sottostima è un problema intrinseco dei sistemi di sorveglianza passivi, compreso il VAERS. Questa variabilità nella sottostima può rendere azzardato affermare che le frequenze relative di eventi avversi nei VAERS riflettano la loro incidenza relativa.*

Ne segue che la valutazione corretta del rischio di reazione avversa andrebbe svolta con una farmacovigilanza attiva, in cui i vaccinati vengono monitorati nel tempo, effettuando analisi specifiche qualora si manifestino delle patologie, per stabilire il nesso causale con la vaccinazione.

Quanto detto sta a significare che di fatto i dati riportati dalla farmacovigilanza (soprattutto quella passiva) non sono sufficienti per stabilire l'entità del rischio, e che sono necessarie informazioni più mirate alla definizione del rischio nel caso singolo.

A ciò si aggiunga che negli studi clinici di fase III per l'autorizzazione all'immissione in commercio, la farmacovigilanza attiva è ristretta normalmente al periodo immediatamente successivo alla vaccinazione (per la maggior parte dei vaccini pediatrici attualmente in uso è di circa una settimana) e si affida alla segnalazione spontanea da parte dei genitori di reazioni avverse gravi che possono avvenire successivamente durante lo studio (normalmente 6 mesi).

⁸⁷ JAMA, June 2, 1993-Vol 269, No. 21 2765-2768

Introducing MEDWatch

A New Approach to Reporting Medication and Device Adverse Effects and Product Problems

David A. Kessler, MD, for the Working Group

Per quanto riguarda l'HEXAVAC gli studi clinici di sicurezza per l'autorizzazione all'immissione in commercio prevedevano la registrazione delle reazioni avverse a partire dai 15 minuti dopo la vaccinazione (primaria e/o di richiamo) fino a trenta giorni. E' evidente che le segnalazioni di reazioni avverse nel periodo successivo di controllo sono sicuramente sottostimate per le reazioni autoimmuni e tumorali, per le quali il tempo di latenza è lungo; è importante anche tenere presente che i disturbi dello sviluppo vengono accertati solo all'atto del raggiungimento dell'età delle tappe evolutive e quindi con notevole ritardo rispetto alla somministrazione della vaccinazione.

Inoltre in questi studi la comparazione viene svolta tra popolazioni vaccinate e non vaccinate; il gruppo definito non vaccinato è comunque stato vaccinato secondo il calendario vaccinale previsto e viene poi vaccinato con un vaccino diverso o con un placebo costituito dal vaccino privato dell'antigene ma contenente gli adiuvanti, tutt'altro che privi di tossicità e dotati anche di attività antigenica; nel caso di vaccini combinati si confrontano i risultati con i dati storici relativi ai vaccini precedenti.

Quindi manca sempre il gruppo di controllo negativo dei MAI vaccinati.

(vedi linea guida sulla valutazione clinica dei vaccini:

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003875.pdf)

Come esempio dei problemi metodologici di cui soffrono gli studi clinici sui vaccini si riporta la tabella 3 dell'articolo Lupus (2012) 21, 223–230 *Mechanisms of aluminum adjuvant toxicity and autoimmunity in pediatric populations* L Tomljenovic and CA Shaw⁸⁸

Mechanisms of aluminum adjuvant toxicity and autoimmunity in pediatric populations
L Tomljenovic and CA Shaw

228

Table 3 Sample of vaccine safety study designs

Study	Methods	Comments
Miller et al. ⁸¹	For safety assessment, children were observed for 7 days post- vaccination for local reactions such as erythema, swelling, or tenderness at site of injection, or fever	The follow-up of study participants was too short and hence detected only the most immediate minor adverse reactions
GlaxoSmithKline ⁸²	Study subjects were monitored for only 4 days post-hepatitis B vaccination	As above. Given that hepatitis B is the only vaccine mandated to newborn babies and to prevent a disease to which an infant is extremely unlikely to be exposed (i.e., hepatitis virus is transmissible through sexual contact or injection with contaminated material), ⁸³ a more rigorous safety assessment would appear to have been warranted
Verstraeten et al. ⁸⁴	Authors state that the safety study on new ASO-4 adjuvanted vaccines (including the human papilloma virus [HPV] vaccine) was not set up primarily to study autoimmune disorders	If the purpose of the study was to assess ADRs of autoimmune etiology, as the title itself clearly states, ⁸⁴ then the study should have been designed to detect these. An increasing number of reports of previously unrecognized severe autoimmune conditions in HPV vaccine recipients have emerged in recent years ^{78,79,85,86}
Phillips et al. ⁸⁷	In exploring the potential association between Gulf War syndrome and anthrax vaccination, potential subjects were excluded if they reported bad reactions to immunizations or injections	It should be obvious that subjects who reported adverse reactions to immunizations should have been included in the study

Traduzione:

-Studio: Miller

⁸⁸ Lupus. 2012 Feb;21(2):223-30.

Mechanisms of aluminum adjuvant toxicity and autoimmunity in pediatric populations. Tomljenovic L¹, Shaw CA.

Metodi: Per la valutazione della sicurezza, i bambini sono stati osservati per 7 giorni dopo la vaccinazione per reazioni locali come eritema, gonfiore o sensibilità nel sito di iniezione, o febbre

Commento: Il follow-up dei partecipanti allo studio era troppo breve e, quindi ha rilevato solo le reazioni avverse minori più immediate

-Studio GlaxoSmithKline:

Metodo: i soggetti dello studio sono stati monitorati per solo 4 giorni dopo la vaccinazione epatite B

Commento: Come sopra. Dato che l'epatite B è l'unico vaccino obbligatorio per i neonati e per prevenire una malattia alla quale un lattante è estremamente improbabile possa essere esposto (cioè il virus dell'epatite, trasmissibile attraverso il contatto sessuale o l'iniezione con materiale contaminato), dovrebbe essere stato garantita una più rigorosa valutazione della sicurezza.

-Studio Verstraeten:

Metodo: Gli autori affermano che lo studio di sicurezza sui nuovi vaccini adiuvati ASO-4 (compreso il vaccino contro il virus del papilloma umano [HPV]), non è stato progettato per studiare principalmente malattie autoimmuni

Commento: Se lo scopo dello studio era di valutare ADR (reazioni avverse) di eziologia autoimmune, come il titolo stesso dice chiaramente, lo studio doveva essere progettato per rilevarli. Un numero crescente di segnalazioni di gravi patologie autoimmuni precedentemente non riconosciute in soggetti vaccinati contro l'HPV sono emerse negli ultimi anni.

-Studio: Philips et al

Metodo: nell'esplorare l'associazione potenziale tra la sindrome della Guerra del Golfo e la vaccinazione contro l'antrace, potenziali soggetti sono stati esclusi se avevano segnalato reazioni avverse a vaccinazioni o iniezioni.

Commento: dovrebbe essere ovvio che i soggetti che hanno riportato reazioni avverse a vaccinazioni avrebbero dovuto essere inclusi nello studio.

Questi sono solo alcuni esempi di studi sulle vaccinazioni con irregolarità metodologiche.

Per poter identificare con maggiore accuratezza l'incidenza delle reazioni avverse e stabilire le controindicazioni reali alle vaccinazioni sarebbe necessario attuare una **farmacovigilanza post-marketing attiva e studi clinici a lungo termine con popolazioni di controllo di bambini MAI vaccinati** (in cui l'incidenza delle patologie è dovuta solo a fattori ambientali e genetici), da confrontare con le popolazioni vaccinate e non vaccinate.

Ne segue che le linee guida soffrono di questa importante limitazione, cioè la sottostima dell'incidenza delle reazioni avverse a lungo termine, che non permette di definire il reale rischio nel caso singolo.

L'altra limitazione è la definizione di stato di salute: questo viene accertato all'atto della visita prevaccinale mediante la compilazione della scheda anamnestica come riportato nella Guida alle controindicazioni alle vaccinazioni:

“Tutto il personale sanitario che esegue una vaccinazione deve verificare la presenza di controindicazioni e/o di precauzioni in ogni persona prima di somministrare il vaccino. La raccolta di queste informazioni può essere effettuata dal personale sanitario con poche e precise domande, utilizzando una scheda anamnestica standardizzata.”

“Non è necessario misurare la febbre o eseguire una visita medica prima della vaccinazione a meno che la persona non appaia ammalata o riferisca una malattia in corso e sia, quindi, opportuno valutare se eseguire comunque la vaccinazione (2-8, 12). Allo stesso modo non vi sono esami di laboratorio o altri accertamenti diagnostici da eseguire di routine prima della vaccinazione a tutti coloro che appaiono in buona salute.”

Per la compilazione della scheda anamnestica è necessario stabilire lo stato di malattia (o di salute) che nel caso dei neonati e dei bambini viene dedotto dai genitori sulla base del comportamento e dei sintomi del bambino, e riferito ai medici pediatri o vaccinatori. La scheda anamnestica quindi ha un valore molto relativo per stabilire se il bambino sta bene o meno proprio perché non si basa su dati oggettivi, cioè risultati di analisi specifiche, ma sulla percezione dello stato di salute (...*“Non è necessario misurare la febbre o eseguire una visita medica prima della vaccinazione a meno che la persona non appaia ammalata” non vi sono esami di laboratorio o altri accertamenti diagnostici da eseguire di routine prima della vaccinazione a tutti coloro che appaiono in buona salute*).

A causa di queste affermazioni possono verificarsi delle situazioni contraddittorie, perché ciò che appare in buona salute per il genitore non necessariamente lo è anche per il medico e viceversa.

Molto spesso il medico non è in grado di riconoscere un danno da vaccino, e tende a posticipare accertamenti indispensabili per accertarlo.

Si riporta di seguito la scheda anamnestica:

SCHEDA ANAMNESTICA		
DATA/...../.....		
1) Sta bene oggi?	<input type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> sì
2) Ha o ha avuto malattie importanti?	<input type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> sì
Se sì, specificare se:	malattia neurologica	<input type="checkbox"/> sì
	malattia con immunodeficienza	<input type="checkbox"/> sì
3) Ha mai avuto convulsioni?	<input type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> sì
Se sì, specificare se:	con febbre	<input type="checkbox"/> sì
	senza febbre	<input type="checkbox"/> sì
4) Negli ultimi tre mesi ha assunto farmaci in continuità?	<input type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> sì
Se sì, specificare se:	cortisonici ad alte dosi	<input type="checkbox"/> sì
	antineoplastici	<input type="checkbox"/> sì
5) Negli ultimi tre mesi è stato sottoposto a terapia radiante?	<input type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> sì
6) Nell'ultimo anno ha ricevuto derivati del sangue come una trasfusione o immunoglobuline?	<input type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> sì
7) È allergico a qualche alimento, farmaco o vaccino?	<input type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> sì
Se sì, si tratta di un vaccino o di un suo componente?		<input type="checkbox"/> sì
8) È in gravidanza?	<input type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> sì
9) Ha avuto reazioni dopo le precedenti vaccinazioni?	<input type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> sì
Se sì, si è trattato di reazioni importanti?		<input type="checkbox"/> sì
Se sì, specificare		
(e compilare la scheda di segnalazione, di reazione avversa a vaccino se non ancora fatto)		
Vaccinazioni proposte		
.....		
Firma dell'operatore sanitario		
.....		

Alcuni dei punti seguenti all'1 sono poco pertinenti per un neonato alla prima vaccinazione:

2) *ha o ha avuto malattie importanti? Neurologiche, con immunodeficienza:* non sempre a tre mesi è possibile diagnosticare con certezza malattie di questo tipo, a meno che non si eseguano esami specifici, le malattie neurologiche per es. per poter essere diagnosticate normalmente richiedono che il bambino raggiunga l'età delle tappe evolutive.

3) *ha mai avuto convulsioni:* questa potrebbe essere una possibile precauzione, ma raramente porta alla posticipazione o sospensione dei vaccini e l'epilessia è una precauzione solo in caso di reazione avversa dopo la prima vaccinazione.

7) *è allergico a qualche alimento, farmaco o vaccino?* Per un neonato alimentato con latte materno e alla prima vaccinazione non è possibile stabilire questo dato molto importante, senza aver eseguito delle prove allergiche.

9) *ha avuto reazioni importanti dopo le precedenti vaccinazioni?* Qui si suggerisce la compilazione della scheda di segnalazione di reazione avversa, ma è da stabilire cosa s'intende per reazioni importanti, perché sono da ritenersi importanti non solo le reazioni acute e comuni ma anche le reazioni a lungo termine, con carattere progressivo. Inoltre come si fa a stabilire una predisposizione a reazioni avverse nel caso di una prima vaccinazione?

Per definire lo stato di salute di un neonato non è quindi sufficiente una deduzione da parte dei genitori e neppure una semplice visita medica generale prima della vaccinazione (peraltro neppure necessaria se i

genitori stabiliscono che il bambino appare in buono stato di salute) ma sono indispensabili della analisi prevaccinali che permettano di evidenziare:

-la funzionalità del sistema immunitario: i vaccini agiscono stimolando la risposta immunitaria; una sua alterazione può predisporre a reazioni avverse a carico del sistema immunitario, come reazioni autoimmuni, allergiche e infiammatorie

-lo stato ossido riduttivo dell'organismo: la funzionalità del sistema immunitario dipende direttamente dall'equilibrio tra sostanze ossidanti e antiossidanti e i vaccini sono costituiti da antigeni e adiuvanti con proprietà fortemente ossidanti; l'incapacità dell'organismo a compensare lo stress ossidativo che si genera in seguito alla vaccinazione può essere responsabile dell'insorgenza di reazioni avverse (come visto in caso di mutazioni genetiche ed epigenetiche)

-predisposizioni genetiche per malattie ereditarie che rientrano tra le reazioni avverse ai vaccini

-alterazioni genetiche ed epigenetiche a carico di geni importanti per la funzionalità del sistema immunitario, ossido riduttivo, mitocondriale (HLA, polimorfismi e alterazioni genetiche).

Poiché si tratta di analisi particolarmente costose è evidente che va fatta un'accurata anamnesi familiare e del caso prima di poterle prescrivere; tuttavia si fa presente che il Decreto Appropriatezza (DECRETO 9 dicembre 2015 . Condizioni di erogabilità e indicazioni di appropriatezza prescrittiva delle prestazioni di assistenza ambulatoriale erogabili nell'ambito del Servizio sanitario nazionale.) ormai in vigore dal 20 Gennaio 2016, **impedisce ai medici di base e ai medici specialisti di branca di prescrivere accertamenti indispensabili per l'accertamento del danno da vaccino e di eventuali predisposizioni** (es. titoli anticorpali vaccinali e tipizzazione HLA completa; una considerazione sui titoli anticorpali vaccinali: la maggior parte dei laboratori è in grado di effettuare solo una parte degli anticorpi e spesso non eseguono neppure la titolazione serologica indispensabile per valutare lo stato di iperimmunizzazione! Questo fatto è gravissimo e lede la salute del paziente perché **non poter diagnosticare un danno da vaccino o la possibile predisposizione significa esporlo ad un rischio maggiore ed evitabile di danni gravemente invalidanti**).

A ciò si aggiunga la carezza di studi da parte degli enti regolatori e del Ministero della salute per comprendere il meccanismo d'induzione del danno da vaccino, comprensione che permetterebbe di riconoscerlo dal punto di vista diagnostico e di trattarlo opportunamente in maniera tempestiva.

Nella Guida alle controindicazioni alle vaccinazioni si ritiene purtroppo superflua l'esecuzione di test predittivi per le reazioni avverse e che valutino in maniera obiettiva lo stato di salute del bambino, perchè si ritiene che il beneficio che ne può trarre il bambino sia sempre nettamente superiore al rischio di reazione avversa.

Questo assunto è in contrasto con le ricerche farmaceutiche nel campo della farmacogenomica dei vaccini (vaccinomiche e aversomiche), in cui si stanno selezionando nuovi marcatori predisponenti per reazioni

avverse ai vaccini e per valutare la risposta immunitaria alle vaccinazioni.⁸⁹, presupposto indispensabile per una personalizzazione delle vaccinazioni che tenga conto della predisposizione e vulnerabilità individuale. Ciò è di fondamentale importanza perché negli studi clinici effettuati dalla ditta produttrice per ottenere l'autorizzazione all'immissione in commercio (AIC) si selezionano gruppi di persone sane e prive di anamnesi per patologie a carico del sistema immunitario o gravemente invalidanti; mentre nella commercializzazione su tutta la popolazione non si valuta in maniera appropriata la vulnerabilità e predisposizione del bambino.

Tale discussione si applica in termini generali a tutte le vaccinazioni, ma in particolare il caso dell'Hexavac pone fortemente in dubbio la validità della Guida alle Controindicazioni alle Vaccinazioni e le modalità con cui vengono valutati l'efficacia e la sicurezza di un vaccino dalle autorità regolatorie.

Nota sulla nuova linea guida AEFI:

Il WHO ha sviluppato a partire dal 2004 il sistema per la valutazione della causalità degli eventi avversi alla vaccinazione "Adverse Events Following Immunization (AEFI)" noto come Brighton Classification, in cui vengono definite le seguenti classi di reazioni avverse: molto probabili/certe; probabili; possibili; improbabili; non correlate; non classificate:⁹⁰

⁸⁹ Curr Genomics. 2015 Feb;16(1):47-59.

Genetics and vaccines in the era of personalized medicine.
Castiblanco J¹, Anaya JM².

Semin Immunol. 2013 Apr;25(2):89-103.

Vaccinomics, adversomics, and the immune response network theory: individualized vaccinology in the 21st century.

Poland GA¹, Kennedy RB, McKinney BA, Ovsyannikova IG, Lambert ND, Jacobson RM, Oberg AL.

Expert Opin Biol Ther. 2008 Nov;8(11):1659-67.

Personalized vaccines: the emerging field of vaccinomics.

Poland GA¹, Ovsyannikova IG, Jacobson RM.

Pharmacogenomics J. 2015 Jun;15(3):284-7.

The first steps towards the era of personalised vaccinology: predicting adverse reactions.

Pellegrino P¹, Falvella FS¹, Perrone V¹, Carnovale C¹, Brusadelli T¹, Pozzi M², Antoniazzi S³, Cheli S¹, Perrotta C¹, Clementi E⁴, Radice S¹.

PLoS Pathog. 2011 Dec;7(12):e1002344.

Vaccinomics and personalized vaccinology: is science leading us toward a new path of directed vaccine development and discovery?

Poland GA¹, Kennedy RB, Ovsyannikova IG.

⁹⁰ The Brighton Collaboration: Creating a Global Standard for Case Definitions (and Guidelines) for Adverse Events Following Immunization.

Causality Term	Assessment Criteria
Very likely/Certain	A clinical event with a plausible time relationship to vaccine administration and which cannot be explained by concurrent disease or other drugs or chemicals
Probable	A clinical event with a reasonable time relationship to vaccine administration; is unlikely to be attributed to concurrent disease or other drugs or chemicals.
Possible	A clinical event with a reasonable time relationship to vaccine administration, but which could also be explained by concurrent disease or other drugs or chemicals.
Unlikely	A clinical event whose time relationship to vaccine administration makes a causal connection improbable, but which could be plausibly explained by underlying disease or other drugs or chemicals
Unrelated	A clinical event with an incompatible time relationship and which could be explained by underlying disease or other drugs or chemicals
Unclassifiable	A clinical event with insufficient information to permit assessment and identification of the cause

[Reference] http://www.rho.org/files/rb3/AEFI_Causality_Assessment_WHO_2005.pdf

Nell'ottobre 2010 la classificazione AEFI è stata rivista dal CIOMS (Council for international Organizations of Medical Science)/WHO ed è stato pubblicato il WHO report on Vaccine Pharmacovigilance " Definitions and Application of terms for Vaccine Pharmacovigilance"

Nelle note per le linee Guida si riporta che "Se c'è una adeguata evidenza che un evento non possa essere definito come caso, tale evento può respinto e può essere riportato come 'Non un caso di AEFI' ". In questo modo si nega a priori l'associazione causale tra vaccinazione ed evento avverso, facendo apparire che l'evento avverso non è mai accaduto!

A marzo del 2013 è stato pubblicato lo "User Manual for AEFI" da parte del WHO con un nuovo algoritmo con **Nuove categorie di causalità:**

-Consistente associazione causale con la vaccinazione

Solo se c'è l'evidenza con studi sulla popolazione che il vaccino può aver causato l'evento avverso la reazione viene classificata come consistente; ciò ha due conseguenze:

-viene negato il riconoscimento di nuove associazioni che possono emergere negli studi di post-marketing di fase 4

-se l'evento è una reazione avversa nota l'associazione causale viene riconosciuta a priori

Kohl KS, Bonhoeffer J, Braun MM, Chen RT, Duclos P, Heijbel H, Heininger U, Loupi E, Marcy SM; The Brighton Collaboration.

In: Henriksen K, Battles JB, Marks ES, Lewin DI, editors. Advances in Patient Safety: From Research to Implementation (Volume 2: Concepts and Methodology). Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2005 Feb. Advances in Patient Safety.

-Indeterminata:

reazioni che potrebbero essere causate dalla vaccinazione ma per le quali l'associazione causale non è stata documentata precedentemente.

-Inconsistente

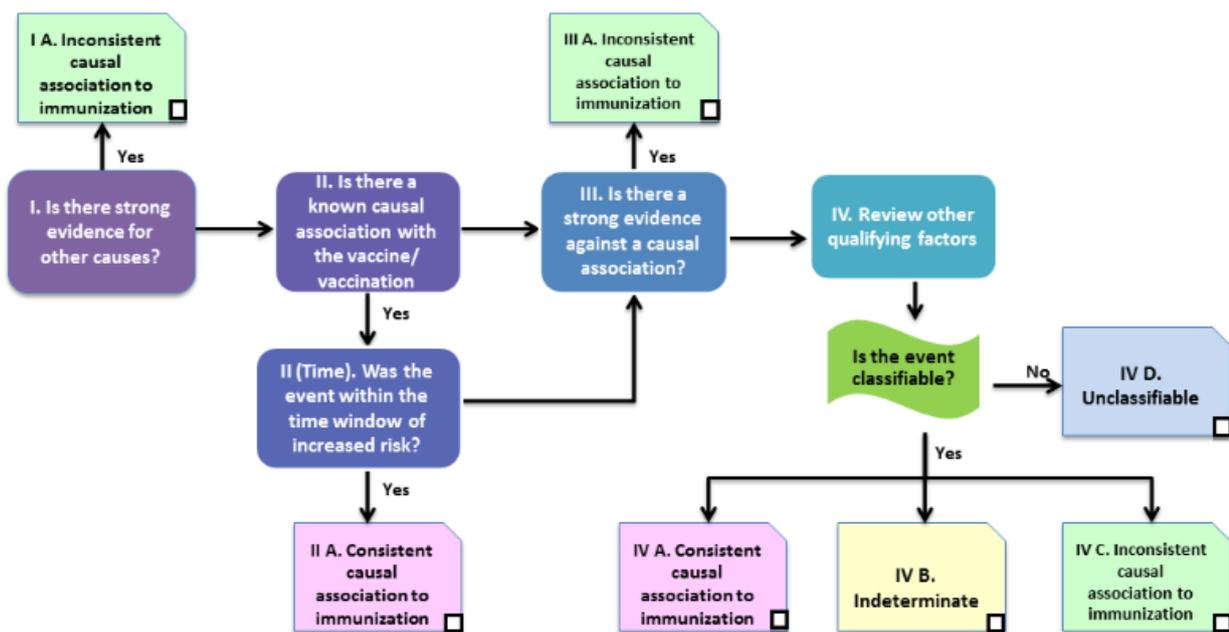
questo gruppo include reazioni per le quali non c'è una spiegazione alternativa e che sarebbero state classificate secondo la classificazione di Brighton come *Probabili*; ricadono in questo gruppo semplicemente perché l'associazione causale non è stata documentata in precedenti studi epidemiologici.

Sono incluse in questo gruppo anche le reazioni avverse *Improbabili* e *Non correlate*.

In questo modo, indipendentemente dalla frequenza con cui avviene tale tipo di reazione avversa, non verrà mai valutata come nuova associazione causale

-Non classificabile

sono eventi clinici con informazioni insufficienti per permettere la valutazione e l'identificazione della causa



Limiti del nuovo algoritmo

Quesito I:

- si nega la multifattorialità delle patologie
- Secondo la classificazione di Brighton qualora fossero disponibili spiegazioni alternative, l'AEFI era considerata *possibile*, in quanto se due possibili cause esistono contemporaneamente, entrambe possono essere il fattore causale.
- Due o più possibili cause possono infatti agire in sinergia

Es. suscettibilità genetica ed individuale che rende il soggetto più a rischio di sviluppare un'AEFI

Quesito II:

- Il periodo d'insorgenza è diverso per ciascun evento avverso.
- Per patologie con un tempo di latenza lungo (es. miofasciite macrofagica, dovuta ad una reazione avversa all'alluminio nel sito d'iniezione) non è possibile dimostrare l'aumento del rischio.
- Nei PSUR (rapporti periodici di farmacovigilanza) i tempi per la farmacovigilanza attiva sono limitati al periodo immediatamente successivo alla vaccinazione e quindi non riportano eventi avversi a lungo termine

Quesito III:

- Questo è il caso dell'associazione MPR-autismo, per la quale si è dimostrato dal punto di vista epidemiologico che non esiste un'associazione causale.

In questo modo si escludono a priori le eccezioni che sono invece possibili per qualsiasi evento, dimostrabili non dal punto di vista epidemiologico ma per la plausibilità biologica nel caso specifico.

Quesito IV:

- I fattori qualificanti (come condizioni di salute, esposizione a fattori di rischio o tossine, malattie acute, altre medicine) vengono nuovamente richiesti in questa fase, mentre dovrebbero essere valutati già nella fase I.
- Su questa base è stata negata l'associazione SIDS-Pentavac, in quanto le morti che sarebbero state classificate come possibili/probabili (perché non altrimenti spiegabili) sono ricadute nella classificazione inconsistente e quindi "non un caso di AEFI"⁹¹

Il termine associazione causale con la nuova classificazione significa: una relazione di causa-effetto tra un fattore causale e una patologia senza altri fattori che intervengano nel processo.

Questa definizione di causa-effetto è potenzialmente pericolosa per i soggetti con patologie preesistenti che possono aggravarsi (fino ad essere fatali) dopo la vaccinazione, e rimuove quindi il principio di precauzione.

In questo modo la responsabilità riguardo le reazioni avverse ai vaccini viene notevolmente ridotta e così pure la possibilità di risarcimento per il danno subito.

⁹¹ AEFI and the pentavalent vaccine: looking for a composite picture - JACOB PULIYEL
Indian Journal of Medical Ethics Vol X No 3 July-September 2013
<http://www.indiaenvironmentportal.org.in/files/file/pentavalent%20vaccines.pdf>

I BIAS DI SELEZIONE NEGLI STUDI SULLA SICUREZZA DEI VACCINI.

Gli studi sulla sicurezza dei vaccini sono in genere pianificati e svolti confrontando lo stato di salute di coloro ai quali viene somministrato il vaccino con quelli che non lo fanno. Può sembrare che il confronto tra lo stato di salute dei vaccinati con quello dei non vaccinati sia un metodo piuttosto semplice per determinare se un vaccino è sicuro, ma in realtà questo metodo richiede che i due i gruppi siano omogenei in modo che solo il vaccino sia responsabile per le differenze nello stato di salute.

Tuttavia vaccinati e non vaccinati non sono simili. Le persone sane sono più propense a scegliere di vaccinarsi, mentre le persone con malattie croniche non accettano il rischio della vaccinazione.

Di conseguenza, le persone con questi problemi di salute si concentrano nel gruppo di controllo dei non vaccinati, che presentano così un aumentato rischio di malattia, anche se non ricevono il vaccino.

Questo effetto si chiama " *bias di selezione del controllo sano*" o "*healthy user effect*" (il bias è un errore che si presenta in misura diversa nei diversi gruppi considerati; l'*healthy user effect* è l'errore sistematico del gruppo di controllo sano; vedi *Epidemiology, Biostatistics and Preventative Medicine*, Jekel et al, 3rd ed., 2007, pag 70)

La presenza del bias di selezione del controllo sano è stata dimostrata chiaramente negli studi con il vaccino contro l'influenza,. ⁹²

Nel 1992, i ricercatori del CDC Dr. Paul Fine e il Dr. Robert Chen hanno pubblicato un importante lavoro che descriveva l'evidenza del bias di selezione del controllo sano negli studi del vaccino DPT e sindrome della morte improvvisa del lattante (SIDS). Hanno derivato un modello matematico per calcolare la potenza del bias di selezione del controllo sano e conclusero affermando che se non si controlla in modo molto rigoroso questo tipo di bias, il danno da vaccino viene notevolmente sottostimato e gli studi sono del tutto inutili ai fini dello studio della sicurezza ⁹³

⁹² BMJ. 2013 May 16;346:f3037.

Influenza: marketing vaccine by marketing disease.
Doshi P¹.

Am J Respir Crit Care Med. 2008 Sep 1;178(5):527-33.

Mortality reduction with influenza

vaccine in patients with pneumonia outside "flu" season: pleiotropic benefits or residual confounding?

Eurich DT¹, Marrie TJ, Johnstone J, Majumdar SR.

⁹³ Am J Epidemiol. 1992 Jul 15;136(2):121-35.

Confounding in studies of adverse reactions to vaccines.

Fine PE¹, Chen RT.

Correzione: <http://aje.oxfordjournals.org/content/136/8/1039>

In Vaccines, 5th ed, 2008, Elsevier pag 1631 si riporta quanto segue:

“Il fattore di confondimento da controindicazione ⁹⁴ è particolarmente problematico per gli studi non sperimentali. In particolare, le persone che non ricevono il vaccino (per esempio, a causa di una controindicazione medica cronica o transitoria, o per un basso livello socio-economico) possono avere un rischio diverso per un evento avverso che gli individui vaccinati (per esempio, l’incidenza di fondo di convulsioni o sindrome della morte improvvisa del lattante possono essere superiore nei non vaccinati). Pertanto, il confronto diretto tra bambini vaccinati e non vaccinati è spesso intrinsecamente confuso, e aggirare questo problema richiede la comprensione delle complesse interazioni di fattori molteplici e mal quantificati”.

La frase "studio non sperimentale" si riferisce a studi in cui il ricercatore non può controllare la variabile in fase di sperimentazione ⁹⁵ (cioè l'esposizione del vaccino). Gli studi che utilizzano banche dati di informazioni sul paziente (ad esempio raccolte attraverso le compagnie di assicurazione o HMO: health maintenance organization), sono sempre non sperimentali.

I calcoli seguenti basati sullo studio svolto dal Dr. Paul Fine e il Dr. Robert Chen, sono utili per comprendere come ciò avviene, però prima è necessario introdurre alcuni concetti necessari per tale discussione:

il *Rischio Relativo* (o rapporto d’incidenza o Risk ratio) è il rapporto tra l'incidenza negli esposti e l'incidenza nei non esposti (dove «incidenza» significa proporzione di nuovi casi) ⁹⁶

	malati	sani
Vaccinati	A	B

Rischio vaccinati = $\frac{A}{A+B}$

⁹⁴ Il confondimento si riferisce al caso in cui la misura di associazione tra un’esposizione e l’esito è “confusa” dall’effetto di un altro fattore. Si dice pertanto che la stima di effetto è affetta da distorsione (o *bias*).

Per definizione, un confondente (C) è un fattore di rischio associato sia all’esito (Y) sia all’esposizione (E), ovvero è distribuito in modo eterogeneo tra i diversi livelli dell’esposizione, ma non deve essere un fattore intermedio nella catena di causalità tra esposizione ed esito.

⁹⁵ http://www.sunhope.it/studi_osservazionali_e_sperimentali.pdf

⁹⁶ http://www.quadernodiepidemiologia.it/epi/cause/ris_rel.htm

Controlli	C	D
-----------	---	---

Rischio controllo = $\frac{C}{C+D}$

$$\text{Rischio Relativo} = \frac{\frac{A}{A+B}}{\frac{C}{C+D}}$$

Esempio: se il rischio di malattia nei vaccinati è dell'1%, e il rischio nel controllo è di 0.5%, il rischio relativo è 1/0.5=2

Qui di seguito si riporta l'esempio di una tabella di calcolo con i risultati di un ipotetico studio non sperimentale sulla sicurezza dei vaccini, effettuato su 9.900 soggetti vaccinati e 1.100 controlli; per questo studio teorico si utilizzano dati già raccolti per altri scopi, e quindi non sono note le ragioni per cui alcune persone non sono state vaccinate.

Studio su 11.000 soggetti di cui 9.900 vaccinati e 1.100 controlli

Risultato:

hanno reazioni avverse 81 vaccinati e 13 controlli.

	malati	sani	
Vaccinati (9,900)	81	9819	Rischio di malattia vaccinati = 0.0082
Controlli (1,100)	13	1087	Rischio di malattia controlli = 0.012

Risk Ratio = $\frac{0.0082}{0.012} = 0.68$

Conclusioni: Nessuna evidenza che il vaccino causi un aumento di patologie. Il vaccino è in realtà associato con una diminuzione delle patologie associate alla vaccinazione, suggerendo che il vaccino le prevenga.

Poiché l'RR è sotto l'1 non c'è evidenza che il vaccino causi un aumento delle reazioni avverse e addirittura è associato ad una diminuzione delle patologie suggerendo che il vaccino le prevenga, il che non è possibile.

Ora analizziamo il bias di questo studio:

Il bias di selezione del controllo sano si verifica quando vi è un sottogruppo "ad alto rischio" con due caratteristiche:

- 1) tasso di vaccinazione inferiore,
- 2) più alto rischio di esito negativo, rispetto agli altri soggetti inclusi nello studio.

In altre parole, il bias di selezione del controllo sano si verifica quando:

- 1) si presentano precarie condizioni di salute
- 2) i vaccini sono evitati nei soggetti con cattive condizioni di salute.

Con un tale sottogruppo, l'RR osservato sarà inferiore al suo valore reale anche di un fattore 4 o 5, o più in casi eccezionali. Di conseguenza, un RR vero di 2-4 può essere falsamente osservato essere 1 o minore di 1.

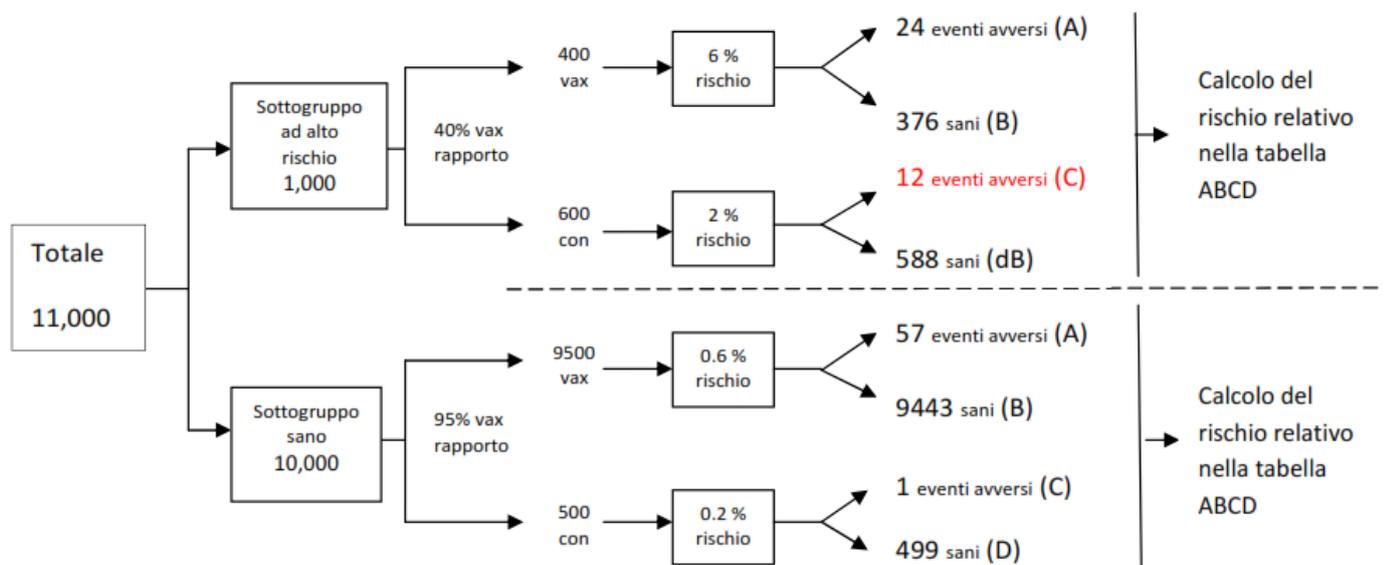
Le due caratteristiche vanno spesso insieme, perché genitori e medici tendono ad evitare la vaccinazione nei bambini che mostrano sintomi di malattia (ad esempio disturbi neurologici o del sistema immunitario). Questi bambini hanno sia un alto rischio di malattia che un tasso di vaccinazione basso. Da notare che l'esito negativo (malattia) nel nostro ipotetico studio può essere uno qualsiasi degli effetti avversi del vaccino ipotizzati in fase di studio, che si sovrappongono con le condizioni che renderanno genitori e medici riluttanti a vaccinare.

Di seguito si riporta un diagramma che illustra come il calcolo dell'RR è influenzato dal sottogruppo ad alto rischio.

Questo calcolo si basa sui seguenti presupposti:

- 1) Dimensione del sottogruppo ad alto rischio: si assume essere di 1.000 su 11.000, circa il 9,1%. Il sottogruppo ad alto rischio contiene sia i soggetti vaccinati che di controllo.
- 2) Tasso di vaccinazione del sottogruppo ad alto rischio: si assume essere del 40%. Ciò significa che i medici e i genitori possono identificare i bambini ad alto rischio circa il 60% delle volte. Questo è paragonabile al tasso di vaccinazione dei bambini autistici nello studio di Jain.
- 3) tasso di vaccinazione del sottogruppo sano: si assume del 95%, che è tipico per molti vaccini.
- 4) Il rischio di esiti avversi nel sottogruppo ad alto rischio: si assume sia rispettivamente del 6% e 2%, nei vaccinati e non, con un rapporto di rischio di 3 volte.
- 5) Il rischio di esiti avversi nel sottogruppo sano: si assume sia 0,6% nei vaccinati e 0,2% nei non vaccinati, con un rapporto di rischio di 3 volte.

Tutti questi dati sono entro gli intervalli considerati nello studio dei ricercatori della CDC Fine e Chen:



Nota:

Vaccinati (Vax) = 4% alto rischio.

Controllo (Con) = 54.5% alto rischio.

Il gruppo di controllo ha una percentuale maggiore di soggetti ad alto rischio. I 12 eventi avversi (in rosso) nel sottogruppo ad alto rischio nascondono il danno causato dal vaccino.

Per trovare l'RR vero del vaccino, dobbiamo calcolare l'RR di ciascun sottogruppo separatamente. La tabella seguente è calcolata per ogni sottogruppo, e sono mostrati i rapporti di rischio.

Entrambi i sottogruppi hanno un rischio relativo uguale a 3

Sottogruppo ad alto rischio:

	Eventi avversi	sani
Vaccinati (400)	24	376
Controllo (600)	12	588

Rischio Vaccinati = 6%
Rischio Controllo = 2%

$$\text{Rischio relativo} = \frac{0.06}{0.02} = 3$$

Sottogruppo sano:

	Eventi avversi	sani
Vaccinati (9500)	57	9443
Controllo (500)	1	499

Rischio Vaccinati = 0.6%
Rischio Controllo = 0.2%

$$\text{Rischio relativo} = \frac{0.006}{0.002} = 3$$

Il danno da vaccino non è osservato nel calcolo aggregato a causa dei 600 soggetti di controllo ad alto rischio che non sono vaccinati. Essi costituiscono il 54,5% del gruppo non vaccinato, anche se sono solo il

9,1% del totale di studio. I soggetti ad alto rischio sono concentrati nel gruppo non vaccinato, di conseguenza il numero di esiti avversi nel gruppo non vaccinato è artificialmente aumentato, nascondendo in tal modo il danno causato dal vaccino.

In altre parole, il risultato fuorviante di $RR = 0.68$ viene creato dai 12 eventi avversi nel gruppo non vaccinato ad alto rischio, mostrati in rosso. Sono queste 12 reazioni avverse che determinano il bias.

Questo esempio specifico utilizza ipotesi utilizzate nel lavoro dei ricercatori CDC Fine e Chen. L'RR è ridotto di un fattore $3 / 0,68 = 4,4$. Il bias è grande abbastanza da rendere completamente sicuro o anche estremamente utile un vaccino in reltà potenzialmente pericoloso.

Riassumendo, i fattori che aumentano il bias di selezione del controllo sano sono:

1) un tasso di vaccinazione più basso nel gruppo ad alto rischio. In questo esempio è stato del 40%. L'effetto sarà più forte per tassi del 30% o 20%. L'effetto scompare se il gruppo ad alto rischio ha lo stesso tasso di vaccinazione (95%) come il sottogruppo sano. Quando i medici sono bravi ad identificare i bambini ad alto rischio, e non li vaccinano, il bias di selezione del controllo sano aumenta.

2) più alto rischio di esito sfavorevole nel gruppo non vaccinato ad alto rischio.

3) maggiori dimensioni del sottogruppo ad alto rischio.

Il bias di selezione del controllo sano è molto difficile da identificare o misurare negli studi sui vaccini.

Calcolare la forza del bias richiede la conoscenza di sei fattori:

1) il rischio nei soggetti sani non vaccinati.

2) il vero RR del vaccino (non il RR osservato del vaccino).

3) l'RR associato con la caratteristica ad alto rischio.

4) la dimensione del sottogruppo ad alto rischio.

5) il tasso di vaccinazione del sottogruppo sano.

6) il tasso di vaccinazione del sottogruppo ad alto rischio.

Il bias di selezione del controllo sano non può essere eliminato a meno che tutti i 6 fattori siano noti. Ma una stima accurata di tutti i 6 fattori è sostanzialmente impossibile.

L'unico modo per eliminare il bias di selezione del controllo è usare la randomizzazione per assicurare che i gruppi siano simili.⁹⁷ Tuttavia, la randomizzazione richiede un controllo sperimentale su chi viene vaccinato e chi no. Questo non è generalmente consentito negli studi sui vaccini perché si ritiene che i vaccini siano

⁹⁷ Tipi di studi

https://homes.stat.unipd.it/alessandrarosalbabrazzale/sites/homes.stat.unipd.it.alessandrarosalbabrazzale/files/PdA_Mod7_x2.pdf

utili, e quindi non sarebbe etico non vaccinare nel gruppo di controllo; si potrebbe però affermare che è ugualmente non etico non studiare la sicurezza di un vaccino mediante appropriati studi randomizzati.

Un metodo di ricerca alternativo, che evita gran parte del bias di selezione del controllo sano, sono gli studi self-controlled (o autoreferenti).⁹⁸

Gli studi self-controlled sono non-sperimentali, utilizzano gli stessi soggetti sia per il controllo che per i gruppi sperimentali. I soggetti sono confrontati a se stessi in diversi punti nel tempo. I risultati sullo stato di salute in un "periodo di rischio" (ad esempio, 4-12 giorni dopo la vaccinazione) sono confrontati con un "periodo di controllo" significativo successivo (ad esempio 20-28 giorni dopo la vaccinazione). Poiché i gruppi confrontati sono esattamente gli stessi, il bias di selezione del controllo sano non è il problema principale.

Una limitazione del metodo self-controlled è che può essere utilizzato solo per studiare reazioni avverse al vaccino acute e a breve termine. Non può essere usato per studiare malattie croniche come l'autismo, o gli effetti negativi che richiedono mesi per manifestarsi. Un'altra limitazione è che esso presuppone che i vaccini non causino reazioni ad insorgenza ritardata durante il periodo di controllo. È però noto che i vaccini possono causare reazioni avverse ritardate, e questo produce un bias che riduce l'effetto osservato. In altre parole, gli eventi avversi che si verificano nel periodo di controllo mascherano l'osservazione di eventi avversi durante il periodo di rischio. Questo effetto è analogo al bias di selezione del controllo sano.

Un importante studio self-controlled è stato pubblicato nel 2011,⁹⁹ ed ha trovato un aumento del rischio di eventi avversi dopo la vaccinazione MPR somministrata a 12 mesi e 18 mesi, rispetto ad un periodo di controllo successivo. Lo studio afferma che:

"C'è stato un aumento nella manifestazione di molteplici condizioni durante il periodo di rischio rispetto al periodo di controllo. Il più grande rischio relativo è stato associato alle convulsioni febbrili (incidenza relativa = 2.34), febbre (RI = 2.31) ed esantema virale (RI = 2.23). Abbiamo calcolato che ci sono stati circa 20 ulteriori convulsioni febbrili durante l'intervallo di rischio per ogni 100.000 bambini vaccinati. "

"Nel complesso l'aumento del tasso di eventi avversi in seguito alla somministrazione dei vaccini a 12 mesi ha determinato per circa 598 bambini in più, una o più visite al pronto soccorso, durante l'intervallo di rischio, ogni 100.000 vaccinazioni."

⁹⁸ Metodi per il controllo del confondimento non misurato e dell'errore di misura
https://boa.unimib.it/retrieve/handle/10281/76804/113743/phd_unimib_072464.pdf

⁹⁹ PLoS One. 2011;6(12):e27897.

Adverse events following 12 and 18 month vaccinations: a population-based, self-controlled case series analysis.

Wilson K¹, Hawken S, Kwong JC, Deeks S, Crowcroft NS, Van Walraven C, Potter BK, Chakraborty P, Keelan J, Pluscauskas M, Manuel D.

Nota:

periodo di rischio = giorni 4-12 post-vaccino

periodo di controllo = giorni 20-28 post-vaccino

Questo studio ha trovato un aumento del rischio di convulsioni febbrili (20 per 100.000) e visite al pronto soccorso (598 per 100.000) associato con il vaccino somministrato a 12 mesi. Lo studio ha rilevato un aumento del rischio inferiore alla data di 18 mesi. Ciò è coerente con il fatto che i vaccini siano più pericolosi per i bambini più piccoli. Quindi il rischio alla nascita e 2, 4, e 6 mesi potrebbe essere superiore a quello che è stato osservato alla data di 12 mesi.

Una stima ragionevole teorica è che il rischio dalle vaccinazioni alla nascita, 2, 4, e 6 mesi sia uguale al rischio dei 12 mesi (20 e 598 per 100.000). Questo implica che il rischio complessivo sarebbe di circa 100 per 100.000 per le convulsioni febbrili, e 2.990 per 100.000 per le visite al PS. Questi numeri sono in contraddizione con la falsa dichiarazione che il rischio di una reazione avversa grave è "uno su un milione" o meno.

L'aumento delle convulsioni febbrili è importante, perché è dimostrato che le convulsioni febbrili producono un aumento di espressione di IL-6, la citochina che è in grado d'indurre l'autismo e danni cerebrali.¹⁰⁰

Inoltre, è importante notare che questo studio si basa sul presupposto errato che gli eventi avversi del vaccino si verificano sempre prima di circa 20 giorni dopo la vaccinazione. Gli eventi avversi che si verificano durante il periodo di controllo (20-28 giorni) causeranno un bias dei risultati, proprio come il bias di selezione, e quindi ridurranno il RR. Di conseguenza, i risultati potrebbero sottostimare il vero rischio.

A conferma di quanto discusso finora si riporta un articolo pubblicato molto recentemente che dimostra come l'eliminazione del bias di selezione del controllo negativo effettivamente porti ad un risultato che conferma l'associazione tra la somministrazione dei vaccini (in questo caso il DTP) e l'aumento della mortalità infantile nella comunità africana di Guinea Bisseau ¹⁰¹, contrariamente a quanto pubblicato in precedenza.

Si ricorda che per decenni ci sono state controversie e preoccupazioni legate alla possibilità che il vaccino DTP potesse causare la morte, ad esempio per la sindrome di morte improvvisa del lattante (SIDS).

¹⁰⁰ J Neuroinflammation. 2011 May 19;8:52.

IL-6 is increased in the cerebellum of autistic brain and alters neural cell adhesion, migration and synaptic formation. Wei H¹, Zou H, Sheikh AM, Malik M, Dobkin C, Brown WT, Li X.

¹⁰¹ EBioMedicine. 2017 Feb 1.

The Introduction of Diphtheria-Tetanus-Pertussis and Oral Polio Vaccine Among Young Infants in an Urban African Community: A Natural Experiment. Mogensen SW¹, Andersen A², Rodrigues A¹, Benn CS³, Aaby P⁴.

Nonostante siano state riportate segnalazioni di bambini deceduti poco dopo il vaccino DTP, gli studi che utilizzano dati amministrativi costantemente trovano che il vaccino DTP è inversamente associato con la SIDS. Cioè, i bambini che ricevevano un vaccino DTP avevano meno probabilità di morire (in un breve periodo dopo la vaccinazione) rispetto ai controlli non vaccinati.

Nell'articolo già discusso sopra del dr. Fine e Chen ¹⁰² è riportata la seguente tabella:

Author	Investigation method	Results		
		OR*,†	95% confidence interval	Study interval‡
Studies of SIDS Taylor and Emery (26)§	Simple case-control study comparing 26 cases with 52 age- and area-matched controls	0.41 0.69 0.6 0.16		Ever <3 days 3–28 days >28 days
Baraff et al. (27)	Case series of interval since last vaccination among 27 cases	[5.4] (29)	2.3–13	3 days
Hoffman et al. (14)	Multicenter case-control study comparing 757 cases with equal numbers of age- and sex- and of age-, sex-, and area-matched controls	0.54, 0.58 0.19, 0.46		Ever 1 day
Walker et al. (29)	Case-control using linked data base, comparing 29 cases with 262 controls. Excluded children with low birth weight, "predisposing medical conditions"	0.15 3.5	0.05–0.45 1.2–9.9	Ever 3 days
Griffin et al. (30)	Cohort analysis of 129,834 vaccinated children in Tennessee. Relative risk calculated with reference period >30 days post vaccination	[0.18] [0.17] [0.75] [1.0]	0.04–0.8 0.04–0.7 0.4–1.5 0.6–1.6	0–3 days 4–7 days 8–14 days 15–30 days

Elenco di studi sul vaccino DTP e morti da SIDS da Fine et al, 1992. Si noti che la maggior parte degli odds ratio (OR) sono inferiori a 1. Un OR inferiore a 1,0 indica che i controlli non vaccinati hanno un rischio di morte maggiore rispetto ai soggetti vaccinati.

Questo risultato può essere spiegato con la presenza di un forte bias di selezione del controllo sano.

Lo studio di Mogensen invece è riuscito ad evitare il bias di selezione nel modo seguente: lo studio utilizza i dati raccolti durante il "Progetto Salute Bandim" (1980-1983) durante il quale la comunità di Bandim è stata seguita per diversi anni. I nuovi nati venivano identificati e monitorati per lo stato di salute e ogni 3 mesi i bambini ricevevano il vaccino DTP.

Normalmente, nei paesi sviluppati, i bambini sono vaccinati secondo un calendario che si basa sull'età del bambino. Il vaccino DTP è dato all'età di 2, 4, e 6 mesi in base alla pianificazione della CDC degli Stati Uniti, per esempio. Ma questo non era possibile nel progetto Bandim perché la vaccinazione poteva essere fatta solo ogni trimestre. Tutti i bambini (della fascia di età compresa tra i 3-6 mesi) di un determinato villaggio ricevevano il vaccino lo stesso giorno, ma non alla stessa età. Così lo studio Mogensen è stato in grado di evitare il bias di selezione del gruppo di controllo sano, anche se non è randomizzato.

Mogensen confrontò lo stato di salute dei

¹⁰² Am J Epidemiol. 1992 Jul 15;136(2):121-35.

Confounding in studies of adverse reactions to vaccines.

Fine PE¹, Chen RT.

Correzione: <http://aje.oxfordjournals.org/content/136/8/1039>

- 1) soggetti che avevano ricevuto il vaccino in precedenza,
- 2) soggetti non ancora vaccinati che hanno ricevuto il vaccino successivamente.

Il risultato principale è stato che il vaccino DTP era associato ad un tasso di mortalità 5 volte superiore, come riportato nella seguente tabella:

Table 3

Mortality rate and hazard rate (HR) for children from 3 months of age until first examination without vaccination or 6 months of age. Natural experiment.

Age group	Mortality rate (deaths/person-years)			HR (95% CI) for DTP vs unvaccinated
3-5 months				
All				
Unvaccinated (N = 651)	4.5 (5/111.4)	DTP (± OPV) (N = 462)	17.4 (11/63.1)	5.00 (1.53-16.3)
		DTP only (N = 101)	35.2 (5/14.2)	10.0 (2.61-38.6)
		DTP + OPV (N = 361)	12.3 (6/48.9)	3.52 (0.96-12.9)
Girls				
Unvaccinated (N = 313)	1.9 (1/51.9)	DTP (± OPV) (N = 222)	13.3 (4/30.1)	9.98 (0.81-123.0)
		DTP only (N = 44)	16.2 (1/6.2)	12.0 (0.56-257.2)
		DTP + OPV (N = 178)	12.5 (3/23.9)	9.50 (0.73-124.0)
Boys				
Unvaccinated (N = 338)	6.7 (4/59.5)	DTP (± OPV) (N = 240)	21.2 (7/33.0)	3.93 (1.01-15.3)
		DTP only (N = 57)	49.8 (4/8.0)	8.93 (2.01-39.7)
		DTP + OPV (N = 183)	12.0 (3/24.9)	2.21 (0.44-11.0)

5-fold higher mortality with DTP vaccine

Notes: There were no deaths due accidents in this age group. BCG is disregarded in the analysis. Hence, the unvaccinated children have not received DTP, OPV or MV but may have received BCG. Of the 651 unvaccinated children, 219 received DTP and/or OPV before their first weighing examination. These children counted as 'unvaccinated' until their first weighing examination. Of the 462 children who received DTP (± OPV), 177 received an additional DTP or OPV before 6 months of age. The OPV-only is not presented in the table because there were no deaths and very little follow-up time in this age group.

CONCLUSIONI

Hexavac è un farmaco attualmente non più disponibile sul mercato che ha presentato un profilo di efficacia dubbio e una documentata neurotossicità supportata da numerosi studi scientifici.

E' importante sottolineare che:

- non sono disponibili ad oggi studi di tossicità effettuati nei neonati con i componenti presenti nel vaccino Hexavac; la ditta produttrice Sanofi e il Ministero della Salute non hanno mai avviato ricerche mirate a definire la tossicità degli adiuvanti in questo caso specifico l'alluminio, in modo da poter ricavare le dosi massime tollerate mediante iniezione intramuscolare, la tossicità delle contaminazioni inevitabilmente presenti e la tossicità delle vaccinazioni multiple e ripetute (come è stato studiato per i vaccini militari)

- gli studi di efficacia sono tuttora dubbi, come pure il grave sospettato aumento del rischio di SIDS in seguito alla vaccinazione; il Ministero non ha ancora fornito risposte in merito ai quesiti posti dall'Interrogazione Parlamentare sull'Hexavac nel 2014

- la scheda anamnestica non è uno strumento in grado di fornire dei dati efficaci per prevenire il danno da vaccino

- l'attuale sistema italiano di *farmacovigilanza* si basa sulla Rete Nazionale di *Farmacovigilanza* (RNF) attiva dal novembre 2001, e l'AIFA ha iniziato il 29 luglio 2004 la sua attività di organismo garante del diritto alla salute di tutti i cittadini; ne segue che la valutazione del rischio della vaccinazione con Hexavac, basata sui dati raccolti tramite le segnalazioni passive, non è tuttora adeguata ad accertare la reale incidenza delle reazioni avverse.

- Il Ministero ha dato informazioni generiche e fuorvianti riguardo la tossicità dell'Hexavac, definendolo un farmaco sicuro e ritenendo solo una mera precauzione il ritiro dal commercio, quando invece è stato dimostrato che i dati su efficacia e sicurezza sono tuttora non conclusivi, a favore però di una maggiore probabilità dell'associazione causale tra SIDS e vaccinazione e di una dubbia efficacia a lungo termine anche in presenza di un titolo anticorpale protettivo.

- non sono disponibili studi comparativi tra gruppi vaccinati con Hexavac e gruppi di controllo mai vaccinati, necessari per valutare la reale incidenza delle reazioni avverse al vaccino.

- Il Ministero della salute non ha mai avviato un programma di prevenzione del danno da vaccino, con formazione del personale sanitario e incentivando la ricerca e la diagnosi prevaccinale.

- Il Ministero non ha mai avviato una procedura per il riconoscimento diagnostico e clinico del danno da vaccino e la sua terapia

- non sono stati analizzati con la dovuta attenzione da parte del Ministero i risultati del Progetto Signum sulle vaccinazioni multiple e gli effetti sul personale militare per adeguare il programma vaccinale pediatrico al fatto che in soggetti vulnerabili più di 5 vaccini aumentano il rischio di reazione avversa

Per tali motivi il vaccino Hexavac può essere considerato un farmaco sperimentale, privo di dati incontestabili sulla sua innocuità ed efficacia, e di questo il Ministero era ed è tuttora a conoscenza, ma non ha provveduto ad informare adeguatamente il personale sanitario e di conseguenza i genitori dei bambini che dovevano essere sottoposti alla vaccinazione.