

# NOTE SULLA TOSSICITA' DI HEXAVAC

## SOMMARIO

INTRODUZIONE .....	2
STUDI SULL'EFFICACIA di HEXAVAC .....	2
STUDI SULLA SICUREZZA DI HEXAVAC.....	4
ANALISI DELLA TOSSICITA' DEL VACCINO HEXAVAC.....	13
<b>ALLUMINIO ADIUVANTE .....</b>	<b>15</b>
Cinetica dell'alluminio ingerito .....	15
Cinetica dell'alluminio somministrato per via intramuscolare .....	15
Le evidenze scientifiche a supporto del meccanismo di traslocazione e tossicità dell'alluminio .....	16
Studio di Flarend et al .....	16
Studio di Movsas et al .....	17
Studi di Mold ed Exley.....	17
Studi di Gherardi et al .....	19
<i>L'infiammazione causata dal movimento dei macrofagi.....</i>	<i>20</i>
<i>Le nanoparticelle di alluminio adiuvante fotografate nel tessuto cerebrale di topo .....</i>	<i>20</i>
Studi di Keith e Mitkus .....	22
Studi di Tomljenovic e Shaw .....	28
<b>LE CONTAMINAZIONI .....</b>	<b>30</b>
LE REAZIONI AVVERSE DI HEXAVAC .....	31
<b>DATI DI FARMACOVIGILANZA .....</b>	<b>31</b>
VALUTAZIONE DEL RISCHIO ASSOCIATO ALLA SOMMINISTRAZIONE DELL'HEXAVAC .....	33
<b>ERRORI METODOLOGICI NELLA VALUTAZIONE DELLE CONTROINDICAZIONI.....</b>	<b>33</b>
Sottostima .....	33
la scheda anamnestica.....	37
La linea guida AEFI.....	40
Limiti dell'algoritmo OMS .....	43
I BIAS DI SELEZIONE NEGLI STUDI SULLA SICUREZZA DEI VACCINI .....	44
il bias di selezione del controllo sano .....	46
CONCLUSIONI .....	52
BIBLIOGRAFIA .....	54
<b>BIBLIOGRAFIA RILEVANTE SULL'ALLUMINIO ADIUVANTE .....</b>	<b>54</b>

## INTRODUZIONE

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. <sup>1</sup>

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”.* <sup>2</sup>

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

Il ritiro dal mercato in realtà avviene in seguito alla pubblicazione di uno studio epidemiologico retrospettivo che segnalava 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 nesso causale e di un rischio per la salute <sup>4</sup>.

Tale parere però è stato fortemente contestato come si vedrà successivamente.

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 <sup>5</sup>; in particolare uno studio del 2010 <sup>6</sup> 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 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 <sup>7</sup>.

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 <sup>8</sup>. È anche stato dimostrato che nei bambini vaccinati sani la risposta immunologica per HBsAg può persistere a prescindere dalla presenza di anticorpi protettivi, fornendo un'efficace protezione [*in termini di produzione di anticorpi vaccinali \**] anche in quelli con un declino o una concentrazione non rilevabile di anti-HBs dopo la prima somministrazione di vaccino <sup>9</sup>.

\* come verrà approfondito in seguito, la produzione di anticorpi vaccinali non è sinonimo di protezione dall'infezione, dallo sviluppo della patologia, né dell'interruzione del contagio. Negli studi qui riportati, quando si parla di titoli anticorpali protettivi, s'intende titoli anticorpali vaccinali (non necessariamente protettivi)

Lo studio effettuato da Zanetti et al, <sup>10</sup> 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 presentasse un titolo anti-HB protettivo al momento della somministrazione della dose di richiamo, veniva comunque evocata una risposta anticorpale vaccinale protettiva ( $\geq 10$  IU / L) nel 92,1% dei partecipanti allo studio.

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

Lo studio concluse che, poiché l'epatite B ha un lungo periodo di incubazione, la risposta immunitaria che si sviluppa nei bambini vaccinati è sufficientemente efficace da assicurare un'adeguata protezione contro la malattia acuta e lo sviluppo di uno 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 <sup>10</sup>.

Altri studi hanno invece dimostrato che la risposta 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 <sup>10</sup>. In particolare, una ricerca di Wu et al <sup>11</sup> ha dimostrato che il 15% degli adolescenti nati da madri HBsAg/HBeAg-positivi che avevano ricevuto la vaccinazione in età pediatrica sviluppò l'infezione cronica da HBV. (Questi dati sono stati confermati anche successivamente: vedi [aggiornamento](#) della letteratura)

Uno studio comparativo tra Hexavac ed Infanrix Hexa <sup>12</sup> conferma quanto sopra esposto, cioè che dopo la vaccinazione antiepatite B, le cellule B in grado di rispondere all'antigene vaccinale persistono anche quando gli anticorpi nel siero diminuiscono. In questo studio è stata confrontata la frequenza di cellule B specifiche contro l'antigene vaccinale 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 specifiche e degli anticorpi serici. Ciò che si è visto è che le cellule B specifiche avevano un titolo simile in tutti i bambini, indipendentemente dal vaccino primario somministrato.

I richiami hanno comportato l'aumento della frequenza delle cellule B specifiche per l'antigene (da 11,3 a 28,2 in  $10^6$  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 specifiche circolanti rispondono efficacemente alla presenza dell'antigene, anche quando gli anticorpi specifici cadono sotto la soglia di protezione.

**Sulla base degli studi citati sopra, 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 perché 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.<sup>13</sup>

I batteri e i virus vaccinici invece vengono introdotti per iniezione intramuscolare, senza passare per il primo contatto con le mucose e vengono manipolati in modo da non essere in grado di sviluppare la malattia.

Le conseguenze, in caso d'infezione con il batterio o virus selvatico, sono l'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 arrivare all'eliminazione del virus/batterio infettivo.

La risposta del sistema immunitario in seguito alla vaccinazione è quindi più debole e limitata nel tempo perché la risposta innata è inferiore, (motivo per cui sono necessari più richiami di vaccino) e predispone allo sviluppo di autoanticorpi a causa della somiglianza tra parti dell'antigene modificato ed elementi dell'organismo (mimetismo molecolare) e all'insorgenza di patologie autoimmuni come si vedrà più in dettaglio in seguito.

## AGGIORNAMENTO

Shimakawa Y, Veillon P, Birguel J, Pivert A, Sauvage V, Guillou-Guillemette HL, Roger S, Njouom R, Ducancelle A, Amta P, Hureau JM, Adoukara JP, Lunel-Fabiani F. **Residual risk of mother-to-child transmission of hepatitis B virus infection**

**despite timely birth-dose vaccination in Cameroon (ANRS 12303): a single-centre, longitudinal observational study.** Lancet Glob Health. 2022 Apr;10(4):e521-e529. doi: 10.1016/S2214-109X(22)00026-2. [https://www.thelancet.com/journals/langlo/article/PIIS2214-109X\(22\)00026-2/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/langlo/article/PIIS2214-109X(22)00026-2/fulltext)

E B, Ko K, Kim R, Nagashima S, Ouoba S, Hussain MRA, Sato T, Chuon C, Abe K, Sugiyama A, Takahashi K, Akita T, Tung R, Ork V, Hossain MS, Saphonn V, Tanaka J. **Residual risk of mother-to-child transmission of HBV despite timely Hepatitis B vaccination: a major challenge to eliminate hepatitis B infection in Cambodia.** BMC Infect Dis. 2023 Apr 26;23(1):261. doi: 10.1186/s12879-023-08249-1. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10131410/>

Zhou S, Li T, Allain JP, Zhou B, Zhang Y, Zhong M, Fu Y, Li C. **Low occurrence of HBsAg but high frequency of transient occult HBV infection in vaccinated and HBIG-administered infants born to HBsAg positive mothers.** J Med Virol. 2017 Dec;89(12):2130-2137. doi: 10.1002/jmv.24861. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmv.24861>

di Filippo Villa D, Navas MC. **Vertical Transmission of Hepatitis B Virus-An Update.** Microorganisms. 2023 Apr 27;11(5):1140. doi: 10.3390/microorganisms11051140. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10221798/>

## STUDI SULLA SICUREZZA DI HEXAVAC



L'Hexavac, oltre al problema dell'efficacia a lungo termine suggerito quale giustificazione del ritiro, ha in realtà 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 Unexected Death).<sup>14</sup> 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.<sup>15</sup>

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.<sup>16</sup> riportarono sei casi di morte improvvisa del lattante, che si sono verificati entro 48 ore dopo la vaccinazione con vaccini esavalenti ; 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. <sup>17</sup>

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" <sup>18</sup>, 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  $\beta$ -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 respiro <sup>19</sup> (Cotwatch breathing monitoring), che permetteva di rilevare e registrare le apnee (pause nel respiro) e ipopnee (ridotto volume di respiro).

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 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 è di 41 morti reali, riportate dopo DPT e OPV; si può vedere come 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 anche il numero dei 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, quindi 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. 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, e così pure 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 i giorni critici.

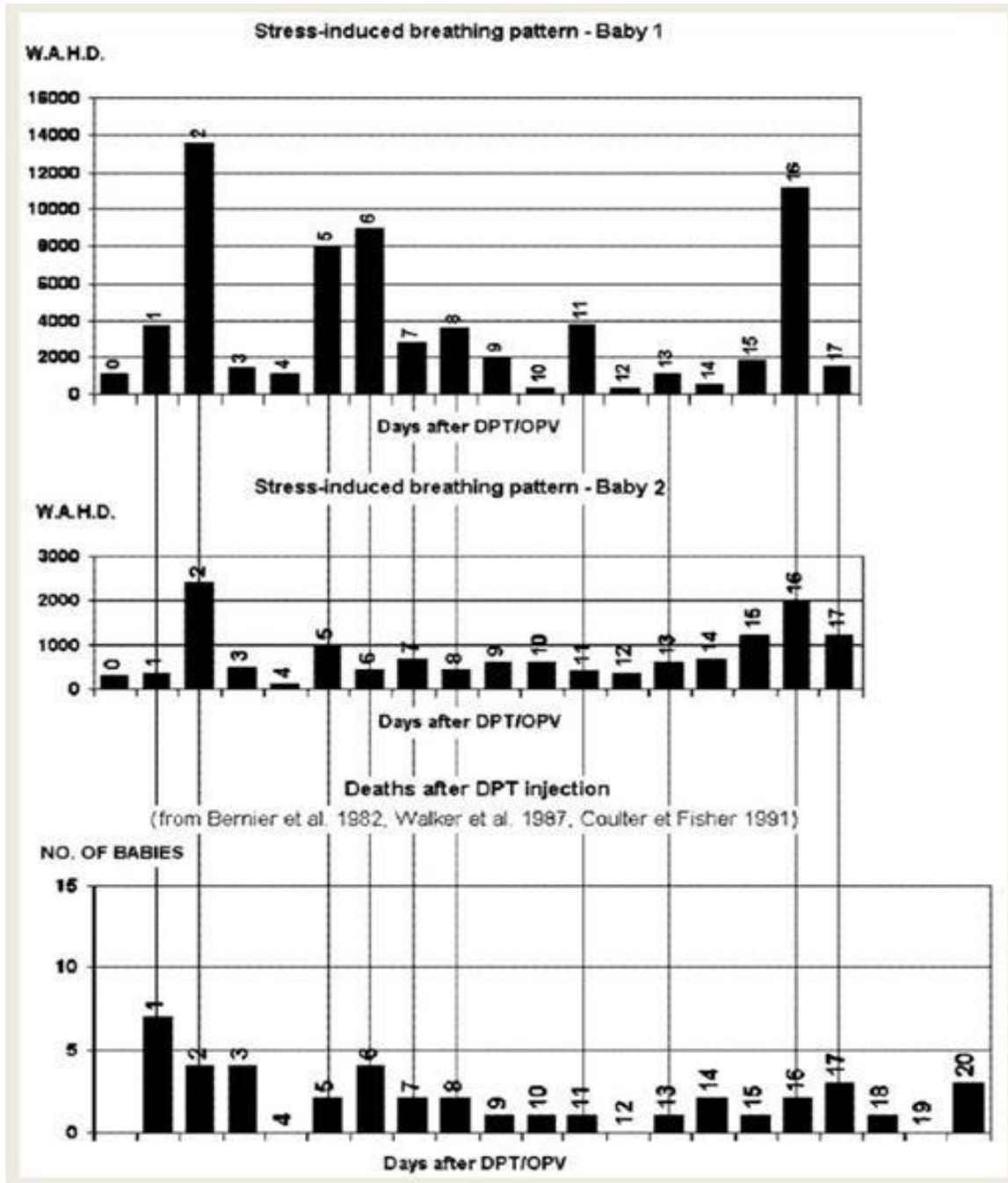


Figura 3

Questi dati confermano le ricerche di Takacs et al,<sup>20</sup> 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 <sup>21</sup>, 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 <sup>22</sup>.

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 predefinito 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)

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 osservazione, la quale individua il rischio (cioè la probabilità) che il soggetto ha di contrarre la malattia in quel periodo di tempo. <sup>23</sup>

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, con 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 i 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 vaccinata, 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 2011<sup>24</sup> su 535 casi di morti inaspettate improvvise inspiegabili (uSUD) estratti dal data base dello studio tedesco TOKEN ([www.tokenstudie.de](http://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<sup>a</sup> 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<sup>24</sup>

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 2001<sup>25</sup>. 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) ciò venne interpretato come la riduzione della metà del rischio di SIDS con la vaccinazione.

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.<sup>24</sup>

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 sopraccitato<sup>26</sup> e anche in questo caso venne rilevato un aumento del rischio per ciascuna dose di vaccino e per tutte le vaccinazioni.

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"**<sup>27</sup>, 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 a settembre 2013.<sup>28</sup>

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 <sup>st</sup> dose	2 <sup>nd</sup> dose	3 <sup>rd</sup> 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

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.<sup>29</sup>

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?"<sup>30</sup> 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 **avvalle 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.**<sup>31</sup>

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<sup>1</sup>.

Che il Ministero della Salute abbia omesso 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:

*"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 <sup>†</sup> di antigene D <sup>^</sup>
- Poliovirus inattivato di tipo 2 (MEF 1) 8 unità <sup>†</sup> di antigene D <sup>^</sup>
- Poliovirus inattivato di tipo 3 (Saukett) 32 unità <sup>†</sup> di antigene D <sup>^</sup>
- 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*.

<sup>^</sup> Quantità di antigene nel bulk finale del prodotto, in accordo con l'O.M.S. (TRS 673, 1992)

<sup>†</sup> 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 indicata nel report dell'EMA per l'autorizzazione all'immissione in commercio di Hexavac <sup>1</sup>; 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 contaminanti, 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 tosoide tetanico; dopo il processo di coniugazione il prodotto ottenuto viene ulteriormente purificato. La coniugazione con il tosoide 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

## ALLUMINIO ADIUVANTE

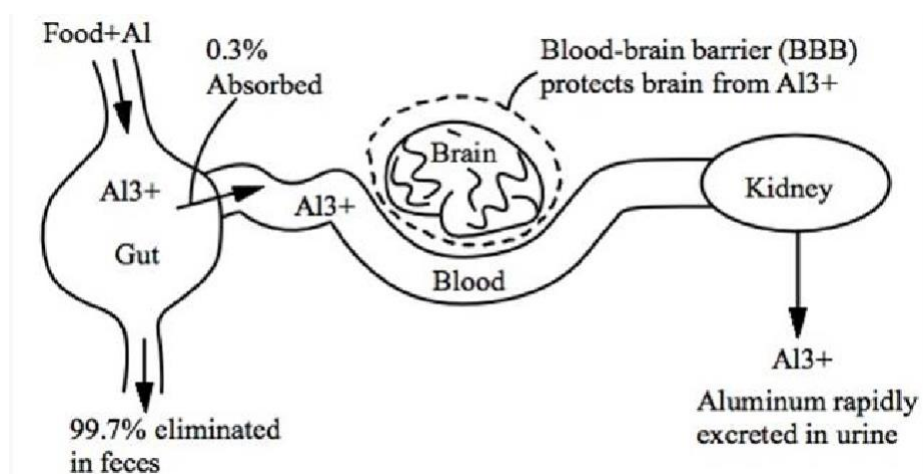


Tra i componenti presenti in Hexavac, gli adiuvanti hanno una documentata neurotossicità, in particolare in questo caso l'alluminio<sup>32</sup>, presente in quantità pari a 0.306 mg.

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%)<sup>33</sup>, rispetto alla somministrazione intramuscolare che raggiunge un assorbimento di circa il 100%.<sup>34</sup>

### 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.*

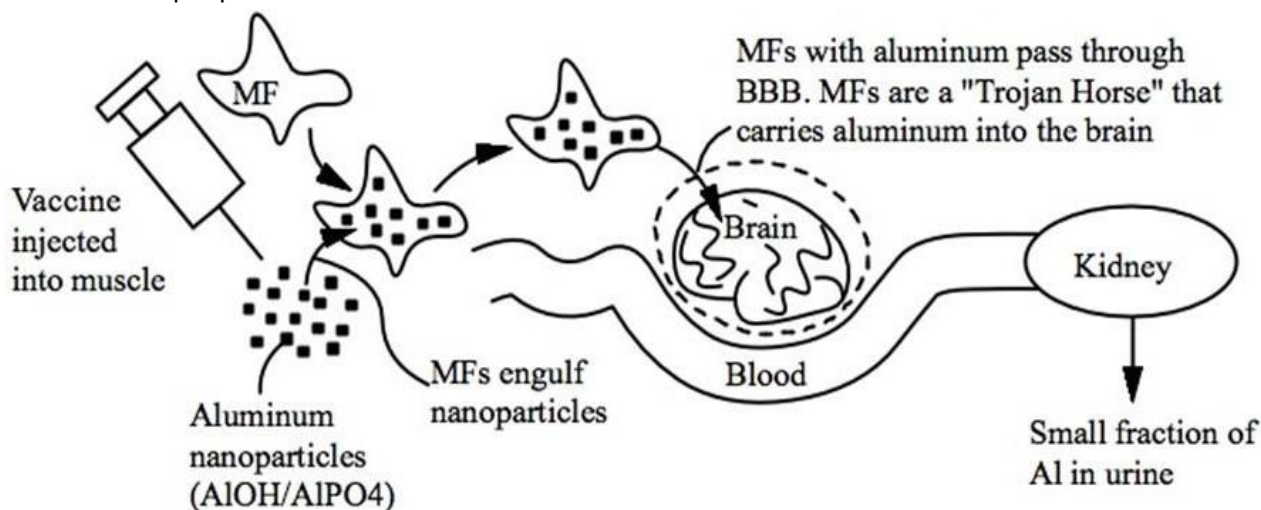
Sulla base della cinetica dell'alluminio ingerito è stato per lungo tempo assunto che le NA seguissero una via simile di eliminazione, invece le NA non possono essere filtrate dai reni (sono troppo grandi) e non si dissolvono rapidamente nei liquidi corporei per formare  $Al^{3+}$ . Ne segue che questo 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 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 perché 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 si 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 del meccanismo di 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 infiammazione rispettivamente delle cellule dei vasi sanguigni<sup>35</sup> e dei neuroni umani.<sup>36</sup>

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

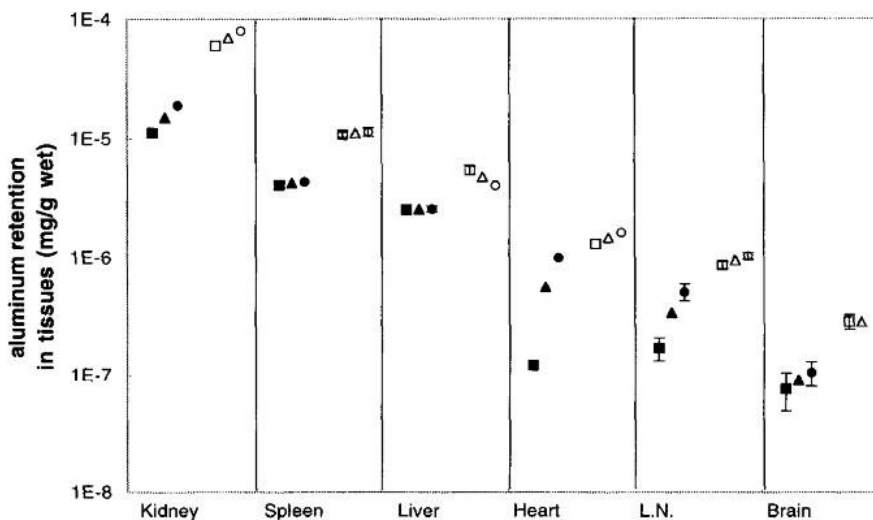
Si riportano di seguito i risultati di alcuni dei numerosi studi:

#### Studio di Flarend et al<sup>37</sup>



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 Al<sup>26</sup> (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 sono tre volte inferiori 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 <sup>26</sup>Al-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

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 <sup>38</sup>, 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) <sup>39</sup>

Sono stati misurati i livelli di alluminio nelle urine e nel sangue prima e dopo le vaccinazioni di routine con 120 µg 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:

#### Studi di Mold ed Exley (2014 <sup>40</sup> e 2016 <sup>41</sup>)

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

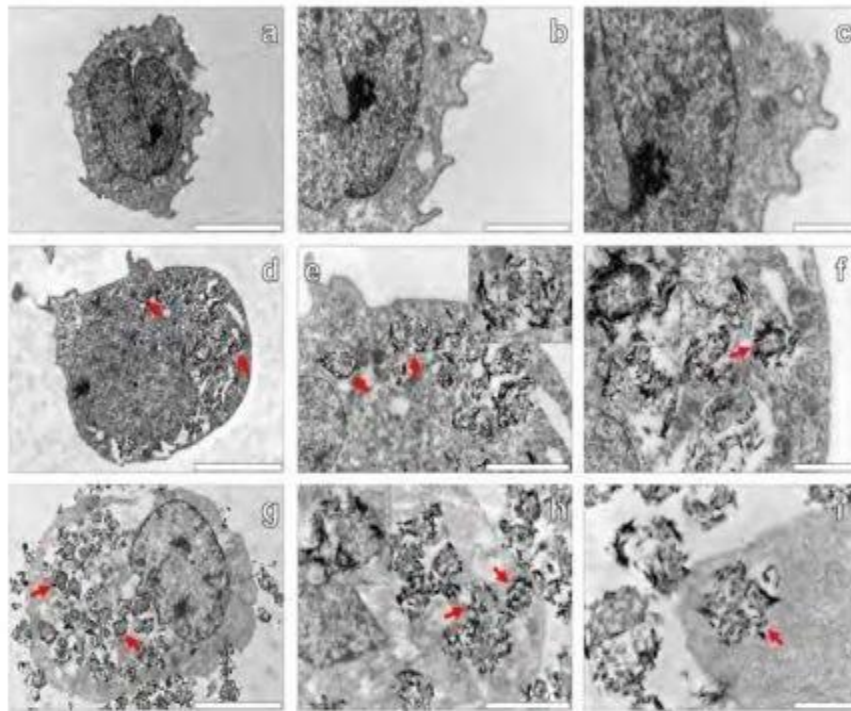
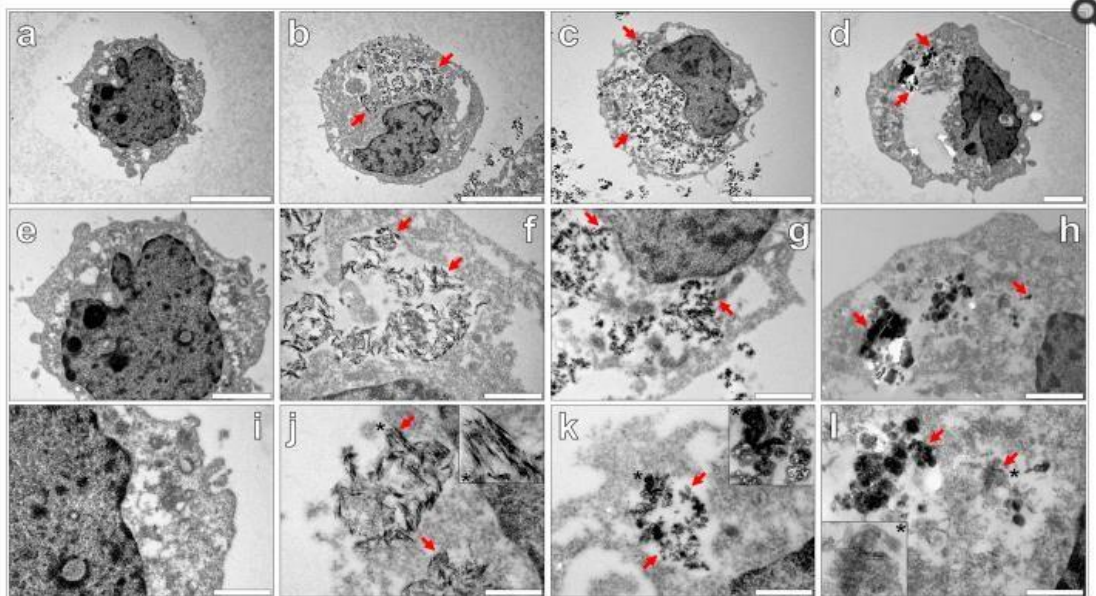


Figure 5 | Representative electron micrographs from TEM of Spurr resin-sectioned (100 nm sections) native THP-1 cells (a-c), THP-1 cells co-cultured with 50 µg/mL  $\text{AlO(OH)}^{\text{SiPM}}$  adjuvant (24 h) (d-f) & THP-1 cells co-cultured with 200 µg/mL  $\text{AlO(OH)}^{\text{SiPM}}$  adjuvant (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).  $\times 8$  K, 5 µm, (b), (e) & (h).  $\times 20$  K, 2 µm, (c), (f) & (i).  $\times 30$  K, 1 µm, respectively.

## 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<sup>®</sup> (24 h) (b,f,j) and 50 µg/mL Adju-Phos<sup>®</sup> (Brenntag Biosector, Denmark) adjuvant (24 h) (c,g,k) and 50 µg/mL Inject<sup>™</sup> 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)  $\times 8$  K, 5 µm, (d)  $\times 10$  K, 2 µm, (e)  $\times 15$  K, 2 µm, (f-h)  $\times 30$  K, 1 µm, (i)  $\times 30$  K, 1 µm and (j-l)  $\times 60$  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

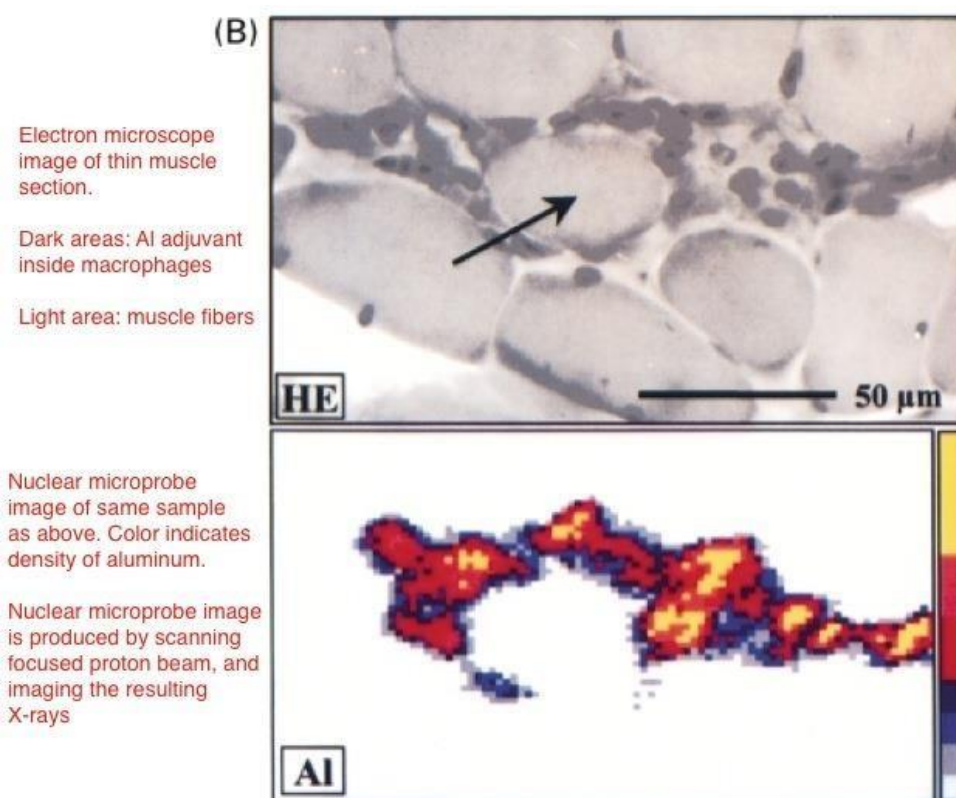
Questi studi del gruppo di Mold – Exley e di altri,<sup>42</sup> hanno permesso di dimostrare che la fagocitosi è uno dei meccanismi più riconosciuti che governa l'internalizzazione cellulare e la successiva degradazione di microparticelle di alluminio adiuvante, attraverso il processo molecolare di 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  $Al^{3+}$  (aq) nel citosol cellulare.

Il rilascio dell'enzima 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<sup>43</sup>



Un primo studio<sup>44</sup> 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.



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***

Uno studio del 2009 di D'Mello et al <sup>45</sup> 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 CCL2 <sup>46</sup>) e un aumento del numero di monociti circolanti esprimenti CCR2 (CCR2: recettore per CCL2 <sup>47</sup>; monociti: sono i precursori dei macrofagi <sup>48</sup>).

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. <sup>49</sup>

In questo modello d'infiammazione, la microglia (la componente macrofagica residente nel SNC <sup>50</sup>) 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) <sup>51</sup>.

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.

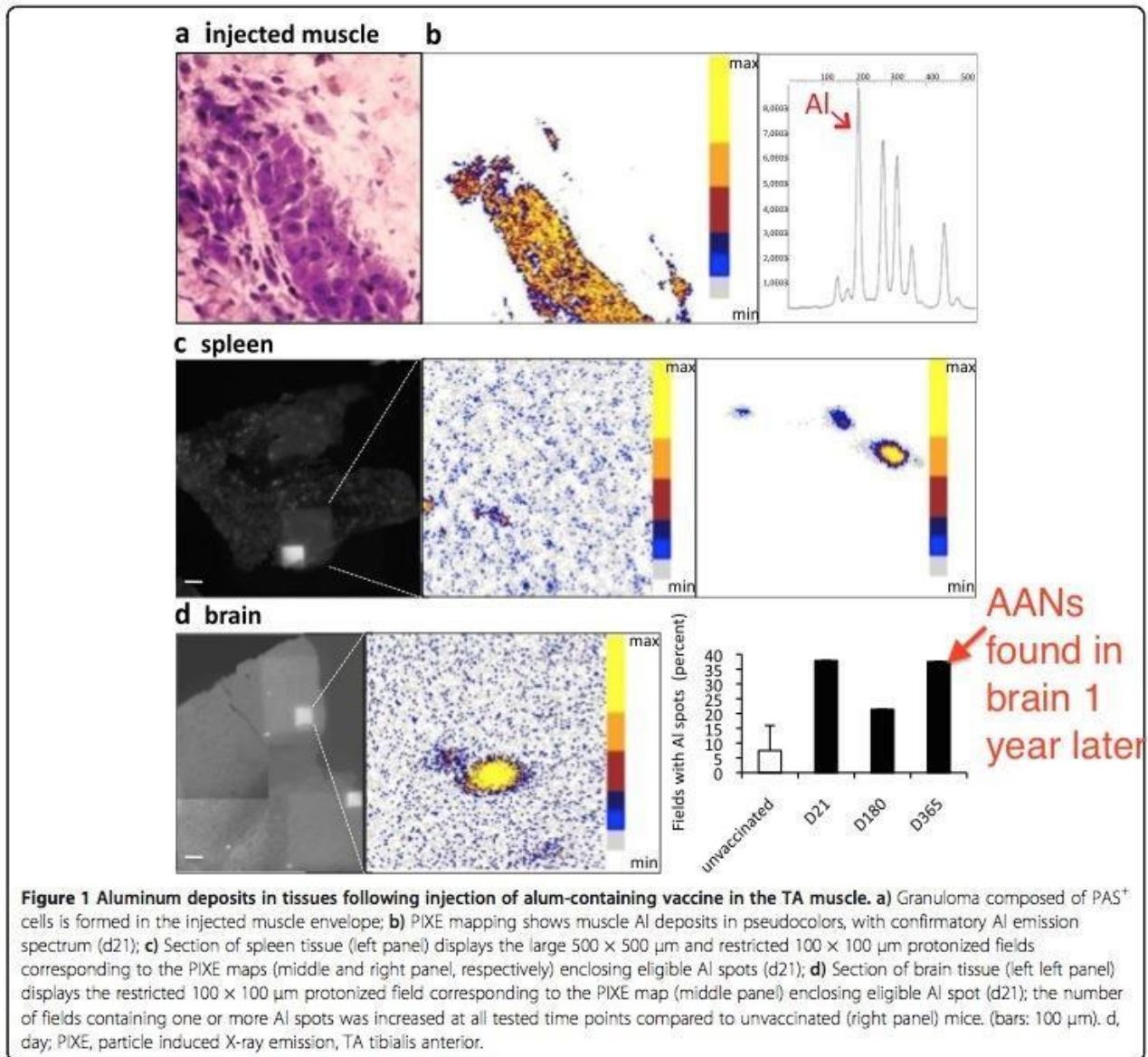
*I risultati di tale studio identificano l'esistenza di una nuova via di comunicazione sistema immunitario- SNC che avviene nel corso di infiammazioni localizzate in organi periferici e può avere specifiche implicazioni nello sviluppo di alterazioni della neurotrasmissione cerebrale che s'incontrano 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.*

### ***Le nanoparticelle di alluminio adiuvante fotografate nel tessuto cerebrale di topo***

Un importante lavoro di Khan et al <sup>52</sup> 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 contraddicono l'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:



Khan ha inoltre osservato che il trasporto delle NA nel SNC e nei tessuti è MPC-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.*

È 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 mobilitino e trasportino le NA al cervello e altri tessuti sensibili.

Questo potrebbe spiegare alcuni dei danni da vaccino MPR.

È noto che il vaccino del morbillo stimola la produzione di MCP-1<sup>53</sup> (altri antigeni vaccinali che stimolano la produzione di MCP-1 sono il meningococco A e il pneumococco 23 valente<sup>54</sup>); **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<sup>55</sup>.

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<sup>56</sup>; un'altra importante applicazione delle nanoparticelle è la diagnostica *in vivo* dell'infiammazione cerebrale.<sup>57</sup>

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,<sup>58</sup> 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.<sup>59</sup>

Tali studi hanno evidenziato che:

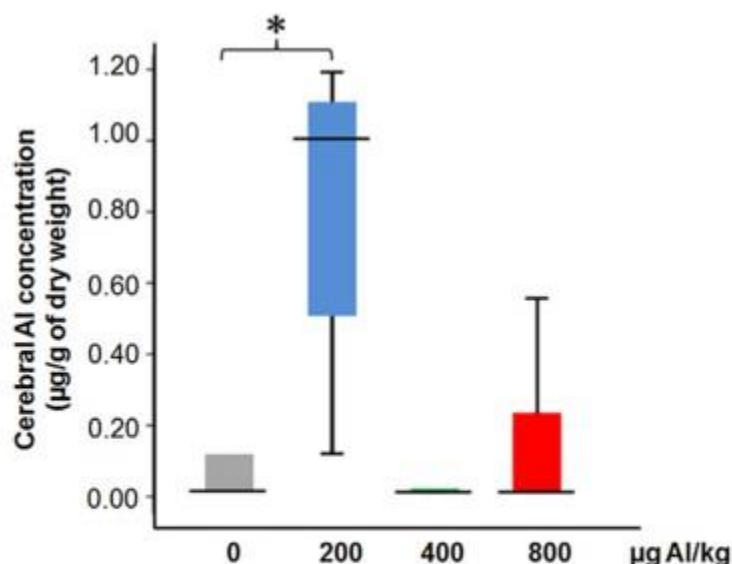
- 1) Il trasporto dipende dal sito d'iniezione (la traslocazione è maggiore in seguito all'iniezione sottocutanea rispetto all'iniezione intramuscolare). Inoltre l'intervallo di dosaggio che provoca il trasporto nel cervello può variare a seconda della sede anatomica dell'iniezione.
- 2) Il trasporto 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.<sup>60</sup>
- 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.<sup>61</sup>

### 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 al<sup>62</sup>, motivo per cui si esaminerà quest'ultimo.<sup>63</sup>



**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<sup>®</sup> dose. 5 mice/group; results expressed as median and range values, with quartiles boxes; non parametric Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney test. \*  $p < 0.05$ .

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

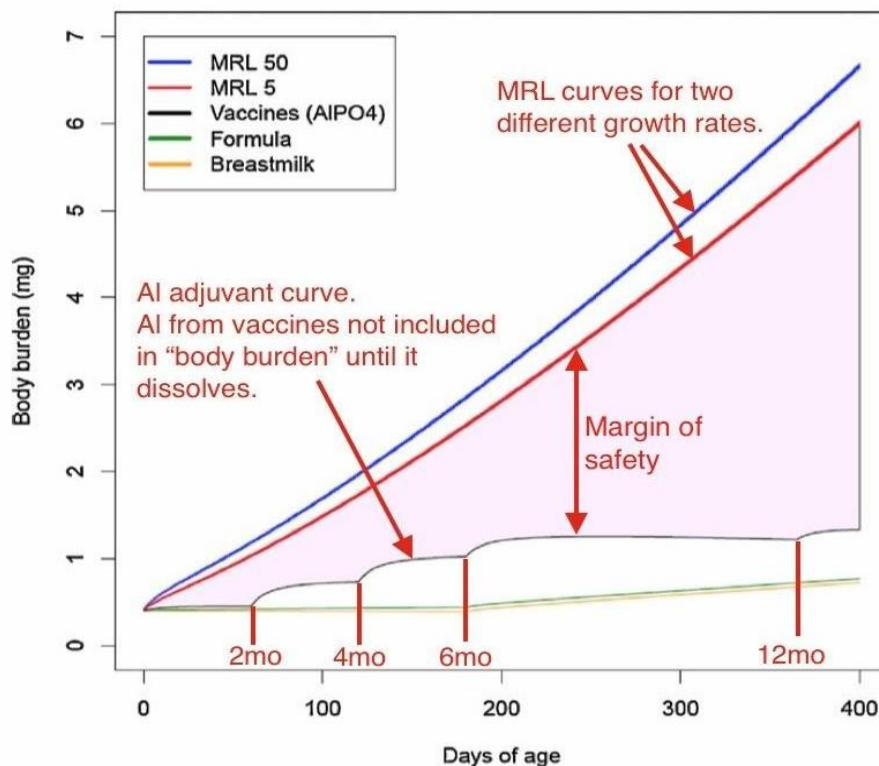
- 1) Trovare il livello più alto al quale "non si osservano effetti avversi" (NOAEL: no-observed adverse effects level) in seguito all'ingestione di Al da studi su animali. Mitkus fa riferimento ad un unico studio (Golub 2001), il quale ha riportato che 26 mg/kg/ die non producono effetti avversi negli 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'ATSDR <sup>64</sup>
- 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. È 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 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.

5)

*L'analisi Mitkus è il modo corretto per stimare la tossicità e la ritenzione di sali di alluminio disciolti (come ioni  $\text{Al}^{3+}$ ), 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 <sup>64</sup>, 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. <sup>65</sup> I dosaggi indicati sono espressi in alluminio elementare: poiché

$AlCl_3=20,2\%$  di alluminio elementare, 100 mg di  $AlCl_3$  contengono 20,2 mg di alluminio.

Si noti che due 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:

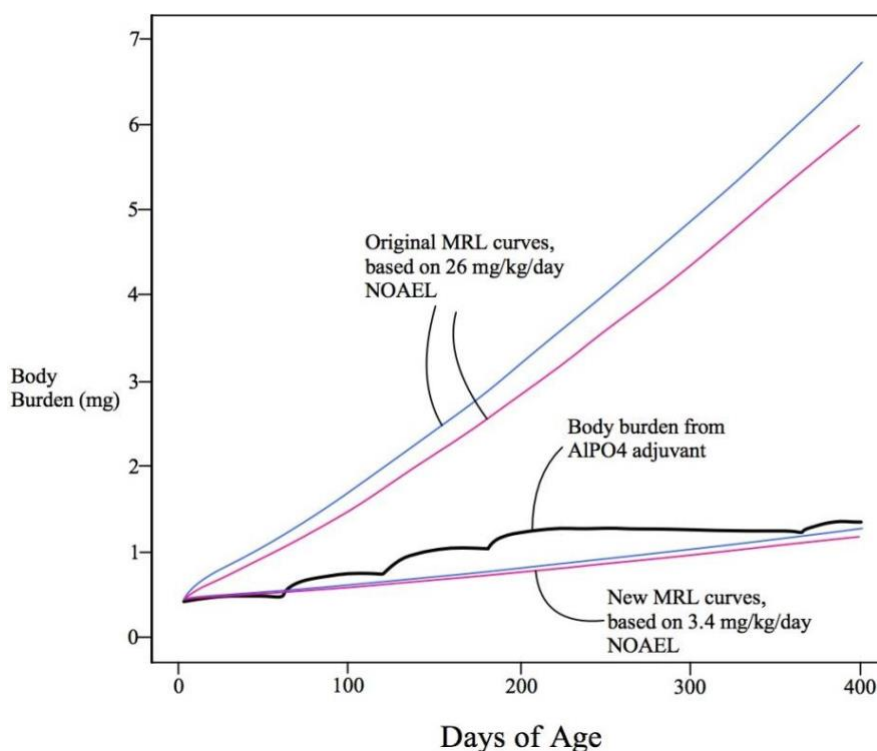
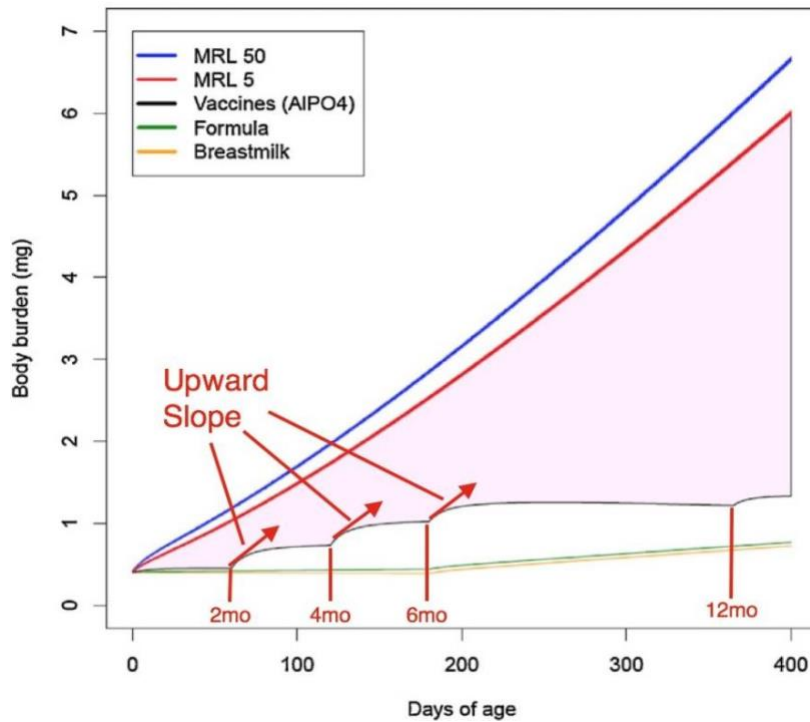


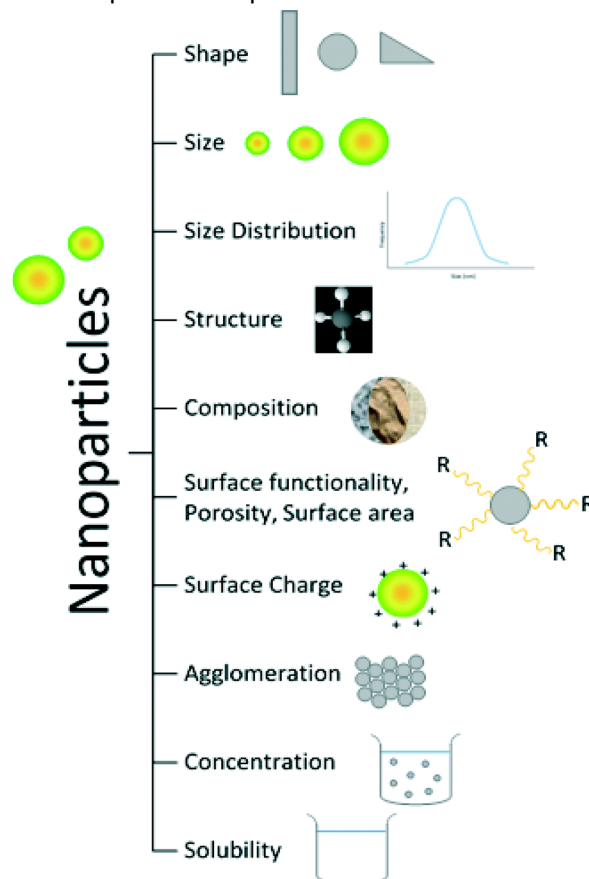
Figura di Mitkus per  $AlPO_4$  corretta in conformità con il dato che l'ingestione di 3,4 mg/kg/die di Al provoca effetti negativi. Ora il carico corporeo supera la curva MRL per quasi tutto il primo anno di vita, indice di tossicità. Il margine di sicurezza per l' $AlPO_4$  è superato.

- 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  $Al^{3+}$ ). E' ben noto che la tossicità delle nanoparticelle dipende dalle dimensioni e altre proprietà quali:



Inoltre, non è soltanto una funzione degli ioni rilasciati <sup>66</sup>. È dimostrato 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.

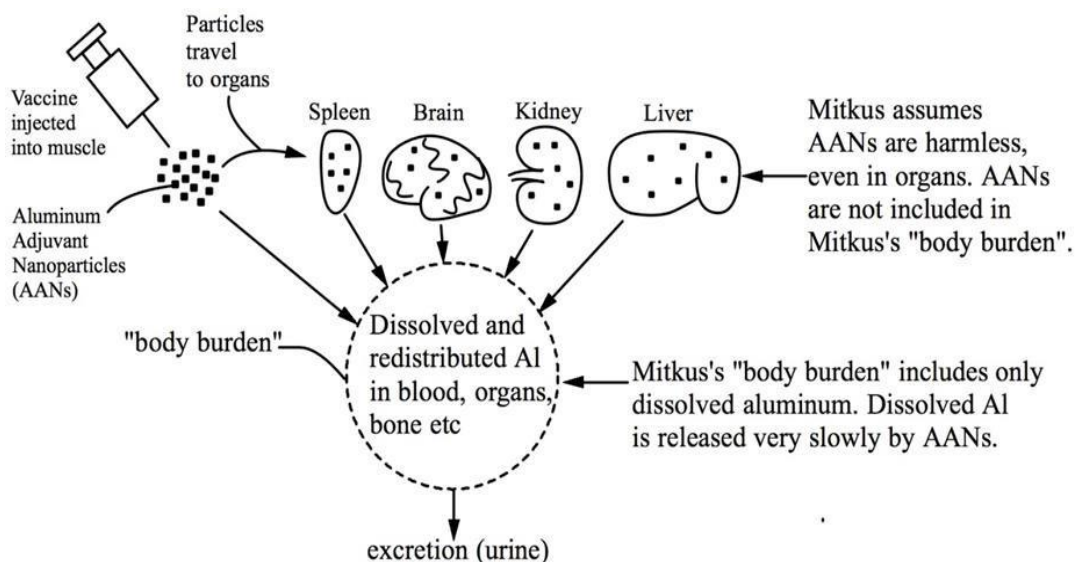
Quindi, la superficie delle nanoparticelle è chimicamente reattiva e catalitica, e può produrre meccanismi di tossicità non correlati alla tossicità degli ioni disciolti:

**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.

### Studi di Tomljenovic e Shaw



Come ulteriore approfondimento sulla tossicità delle dosi di alluminio somministrate si riportano alcune tabelle tratte dai seguenti articoli perché permettono di chiarire l'aspetto della tossicità dell'alluminio come adiuvante:

- Curr Med Chem. 2011;18(17):2630-7. **Aluminum vaccine adjuvants: are they safe?** Tomljenovic L, Shaw CA<sup>67</sup>
- 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 CA<sup>1</sup>, Tomljenovic L<sup>68</sup>

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 <sup>3</sup> , 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])

[https://www.researchgate.net/publication/51123484\\_Aluminum\\_Vaccine\\_Adjuvants\\_Are\\_they\\_Safe](https://www.researchgate.net/publication/51123484_Aluminum_Vaccine_Adjuvants_Are_they_Safe)

Da questa tabella si può osservare 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<sup>a</sup> 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.

*È 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 degli antigeni vaccinali veicolati con l'adiuvante in ogni distretto dell'organismo e, in caso d'infezione, lo sviluppo di uno stato di infezione latente e subclinica, che attiva il sistema immunitario in maniera cronica senza però eliminare l'agente patogeno. <sup>69</sup>

Come accennato inizialmente, ciò predispone allo sviluppo di autoanticorpi per mimetismo molecolare con gli antigeni vaccinali e a causa del rilascio di antigeni del self in seguito all'infiammazione indotta dai vari componenti tossici presenti nel vaccino. <sup>70</sup>

A titolo di esempio si riporta la tabella estratta dalla ref. (71) 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 <sup>20</sup>	Increased IL-1, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MIP-1 $\alpha$ and oxidative stress <sup>20,55,63</sup>	Increases cytokines (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-18, TNF- $\alpha$ ), chemokines (IL-8, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ ), ROS, and nitric oxide (NO) <sup>8,27,28,41,42,55</sup>	Stimulates recruitment of monocytes, macrophages and granulocytes to the injection site
Autoimmune thyroid disease	Excessive Th1 <sup>20</sup>			
Inflammatory bowel disease (IBD)/ Crohn's disease (CD)	Excessive Th1 <sup>55</sup>	Increased NLRP3 inflammasome complex signalling and NLRP3-dependent overproduction of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18, TNF- $\alpha$ and reactive oxygen species (ROS) in MS, EAE, Type 1 diabetes mellitus <sup>64-66</sup> and animal models of IBD <sup>67</sup>	Increases cytokines (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-18, TNF- $\alpha$ ), chemokines (IL-8, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ ), ROS, and nitric oxide (NO) <sup>8,27,28,41,42,55</sup>	Induces differentiation of monocytes to antigen presenting cells (APCs)
Type 1 diabetes mellitus*	Excessive Th1 <sup>20</sup>		Activates the NLRP3 inflammasome complex and NLRP3-dependent cytokines <sup>7,8</sup>	Activates APCs
Multiple sclerosis (MS)*† and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)	Excessive Th1 <sup>20</sup>			Promotes antigen uptake and processing by APCs and enhances antigen-specific T-cell responses
Systemic lupus erythematosus (SLE)*	Excessive Th2 <sup>20,56</sup>	Increased IL-10, IL-18, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ <sup>20,56,68</sup>		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 <sup>57-59</sup>	Increased IL-4, IL-6, B-cell hyperlymphocytosis, infiltration of large periodic acid-schiff (PAS)-positive macrophages, and CD8 <sup>+</sup> T lymphocytes in the absence of conspicuous muscle fibre damage <sup>57,59,69</sup>		Activates the complement cascade
Gulf War Syndrome (GWS)*†	Mixed Th1/Th2 <sup>60</sup>	Increased IFN- $\gamma$ , IL-5, IL-6 <sup>60</sup>		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) <sup>27,73-75</sup>
Autism spectrum disorders (ASD)*	Both Th1 and Th2 shifts have been reported <sup>61,62</sup>	Increased IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8, MCP-1, MIP-1 $\beta$ , MHC class II <sup>61,70,71</sup> Increased astrocyte and microglia reactivity <sup>70,72</sup>		Activates astrocytes and microglia <sup>76</sup>

\*linked to AI-adjuvanted vaccines.<sup>6,35,38,77-79</sup>†specifically recognized as 'Autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants' ('ASIA').<sup>6</sup>

[https://www.researchgate.net/publication/221738389\\_Mechanisms\\_of\\_aluminum\\_adjuvant\\_toxicity\\_and\\_autoimmunity\\_in\\_pediatric\\_populations](https://www.researchgate.net/publication/221738389_Mechanisms_of_aluminum_adjuvant_toxicity_and_autoimmunity_in_pediatric_populations)

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 contenerne vari tipi quali: tossine non inattivate, sostanze chimiche utilizzate per la produzione dei vari antigeni, contaminazioni da parte di eventuali virus avventizi, e altri microorganismi che possono infettare i medium di coltura.

Tali contaminazioni possono avvenire perché alcuni virus e batteri sono in grado di evadere il rilevamento da parte dei test. I test normalmente vengono eseguiti su matrici artificiali in cui viene posto un campione di cellule, ed 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

<sup>72</sup>, del *Bacillo cereus* nel vaccino *Haemophilus influenzae* type B e suoi vaccini associati <sup>73</sup>, di *prioni* nei vaccini che utilizzano tessuti di origine animale <sup>74</sup>, di *porcine circovirus* type 1 (PCV1) DNA nel vaccino Rotarix <sup>75</sup>).

A questi si aggiunga la contaminazione da *endotossina* nel vaccino Hib <sup>76</sup>, la *reversione del tosoide* di *C. difficile* <sup>77</sup> e la *presenza di attività enzimatica residua nel tosoide del tetano* <sup>78</sup>, 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 <sup>79</sup>, 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 <sup>80</sup>.

Anche la *linea cellulare Vero*, impiegata per ottenere il vaccino della polio utilizzato nella produzione dell'Hexavac, può presentare contaminazioni virali e microbiche <sup>81</sup>.

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 proveniente da virus e batteri che contaminano normalmente i mezzi di coltura).

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. <sup>82</sup>

Un esempio emblematico della differenza tra i risultati sull'animale e sull'uomo è lo studio di Pekarek e R. <sup>83</sup>, 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 o paracetamolo 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 <sup>84</sup>*

## LE REAZIONI AVVERSE DI HEXAVAC



### DATI DI FARMACOVIGILANZA

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

#### 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 (febbrili e non febbrili), 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

### Potenziati 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

### ERRORI METODOLOGICI NELLA VALUTAZIONE DELLE CONTROINDICAZIONI



Nella Guida alle Controindicazioni alle Vaccinazioni dell'ISS del 2017 (pag 7) è riportato che:

[https://www.epicentro.iss.it/vaccini/pdf/2017\\_Guida\\_Vaccinazioni\\_5a\\_ed.pdf](https://www.epicentro.iss.it/vaccini/pdf/2017_Guida_Vaccinazioni_5a_ed.pdf)

*“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<sup>85</sup> 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:

**Sottostima:** *La sottostima è una delle maggiori limitazioni dei sistemi di sorveglianza passivi, compreso il VAERS. Il termine “sottostima” si riferisce al fatto che il VAERS riceve segnalazioni solo per una piccola parte degli eventi avversi effettivi. Una segnalazione al VAERS generalmente non prova che il/i vaccino/i identificato/i abbia/abbiano causato l'evento avverso descritto. Conferma solo che l'evento segnalato si è verificato qualche tempo dopo la somministrazione del vaccino. <https://vaers.hhs.gov/data/dataguide.html>*

*Poiché i dati del VAERS non includono un gruppo di confronto non vaccinato, non è possibile calcolare e confrontare i tassi di eventi avversi nei soggetti vaccinati rispetto a quelli non vaccinati e determinare se la vaccinazione è associata ad un aumento del rischio di un evento avverso (Figura seguente). L'efficienza di segnalazione, ovvero la percentuale di eventi avversi effettivamente segnalati al VAERS, è sconosciuta, ma si ritiene che sia più elevata per le condizioni clinicamente gravi.<sup>86</sup>*

		Adverse event	No adverse event
Vaccinated	Vaccinated and had an adverse event, but not reported to VAERS	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;">           Vaccinated and had an adverse event, which was reported to VAERS         </div>	Vaccinated and did not have an adverse event
	$A_1$		$B$
Not vaccinated	Not vaccinated and had an adverse event	$C$	Not vaccinated and did not have an adverse event
			$D$

$A_2$  = VAERS database

$$\text{Incidence of AE in vaccinated individuals} = \frac{A_1 + A_2}{(A_1 + A_2) + B}$$

$$\text{Reporting efficiency to VAERS} = \frac{A_2}{A_1 + A_2}$$

$$\text{Incidence of AE in unvaccinated individuals} = \frac{C}{C + D}$$

Shimabukuro TT, Nguyen M, Martin D, DeStefano F. Safety monitoring in the Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS). *Vaccine*. 2015 Aug 26;33(36):4398-405. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.07.035.

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 passiva non sono sufficienti per stabilire l'entità del rischio, e 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 alla reattogenicità al vaccino, cioè 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).

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. È 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, in cui il gruppo definito "non vaccinato" è comunque stato vaccinato secondo il calendario vaccinale previsto e viene poi vaccinato con un vaccino diverso (controllo attivo) o spesso 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 invece 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.<sup>87</sup>

Come esempio dei problemi metodologici di cui soffrono gli studi clinici sui vaccini si riporta traduzione della tabella 3 dell'articolo *Lupus (2012) 21, 223–230 Mechanisms of aluminum adjuvant toxicity and autoimmunity in pediatric populations L Tomljenovic and CA Shaw* <sup>88</sup>

- **Studio Miller**

Metodo: 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 è emerso 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 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.

## AGGIORNAMENTO

STUDIO COMPARATIVO VACCINATI VERSO MAI VACCINATI

**Mawson A R., Jacob B. Vaccination and Neurodevelopmental disorders: A Study of Nine-Year-Old Children Enrolled in Medicaid. Science, Public Health Policy and the Law. 2025 Jan 23; v6.2019-2025**

Questo studio è la conferma di due precedenti studi preliminari svolti dal gruppo del prof. A. Mawson:

Mawson AR, Ray BD, Bhuiyan AR, Jacob B (2017) Pilot comparative study on the health of vaccinated and unvaccinated 6- to 12-year-old U.S. children. J Transl Sci 3: DOI: 10.15761/JTS.1000186

Mawson AR, Bhuiyan A, Jacob B, Ray BD (2017) Preterm birth, vaccination and neurodevelopmental disorders: a cross-sectional study of 6- to 12-year-old vaccinated and unvaccinated children. J Transl Sci 3: DOI: 10.15761/JTS.1000187

Si tratta del **primo studio su larga scala di confronto tra la popolazione vaccinata e mai vaccinata**, in quanto in tutti gli altri studi pubblicati ad oggi e oggetto delle metanalisi manca il controllo negativo, cioè il gruppo dei bambini mai vaccinati. La popolazione dello studio comprendeva **47.155 bambini** iscritti in modo continuativo al programma Medicaid \* dello Stato della Florida dalla nascita ai 9 anni tra il 1999 e il 2011 (42.032 vaccinati e 5.123 mai vaccinati)

*\* Medicaid fornisce una copertura sanitaria gratuita o a basso costo a persone con basso reddito, famiglie e bambini, donne in gravidanza, anziani e persone con disabilità.*

L'analisi dei dati dimostra che:

1. I bambini vaccinati avevano una **probabilità significativamente maggiore**, rispetto ai bambini non vaccinati, di avere una diagnosi dei seguenti NDD: ASD (disturbo dello spettro autistico), sindrome ipercinetica dell'infanzia, epilessia o crisi epilettiche, encefalopatia, disturbi da tic e disturbi dell'apprendimento
2. tra i bambini nati pretermine e vaccinati, il **39,9% ha avuto una diagnosi di almeno un NDD rispetto al 15,7%** tra quelli nati pretermine e non vaccinati (OR 3,58, 95% CI: 2,80, 4,57);
3. Un ammontare crescente di visite sanitarie che includevano una o più vaccinazioni è stato associato a rischi più elevati di diagnosi di ASD, suggerendo una relazione dose-risposta. In particolare, i bambini con una sola visita per la vaccinazione avevano una probabilità **1,7 volte superiore** di avere una diagnosi di ASD rispetto ai non vaccinati (95% CI: 1,21, 2,35), mentre quelli con 11 o più visite avevano una probabilità di **4,4 volte superiore** di avere una diagnosi di ASD rispetto a quelli con nessuna visita (95% CI: 2,85, 6,84).

STUDIO COMPARATIVO FARMACOVIGILANZA ATTIVA VERSO PASSIVA

La Regione Puglia ha promosso, per il quadriennio 2013/2017, un programma di sorveglianza attiva sul vaccino contro morbillo, parotite, rosolia e varicella (Report 2013/2017 "Sorveglianza degli eventi avversi a vaccino in Puglia").

Per questo studio sono stati reclutati **1.672 bambini** che sono seguiti per un anno. I risultati mostrano che le segnalazioni degli eventi avversi gravi correlati alla vaccinazione hanno avuto un'incidenza del **40,69 su mille** (cioè 4 su cento).

Il dato ottenuto è stato paragonato all'incidenza osservata con farmacovigilanza passiva (stesso vaccino e stesso periodo di tempo) pari allo **0,12 su mille** (un caso ogni 12.000). Ne segue che i casi gravi raccolti con lo studio (farmacovigilanza attiva) superano di 339 volte le segnalazioni ricevute spontaneamente (farmacovigilanza passiva).

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: (pag. 8)

*“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 .....		
<i>(e compilare la scheda di segnalazione, di reazione avversa a vaccino se non ancora fatto)</i>		
<b>Vaccinazioni proposte</b>		
.....		
.....		
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. Ciò significa **non poter diagnosticare un danno da vaccino o la possibile predisposizione e quindi esporre la persona 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 (questa affermazione deriva dalla valutazione delle reazioni avverse registrate attraverso la farmacovigilanza passiva, che come abbiamo visto, è indeterminata riguardo l'incidenza del danno).

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 <sup>89</sup>.

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.

### La 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*, <sup>90</sup> in cui vengono definite le seguenti classi di reazioni avverse: molto probabili/certe; probabili; possibili; improbabili; non correlate; non classificate: <sup>91</sup>

Termine di causalità	Criteri di valutazione
Molto probabile/Certezza	Un evento clinico con un rapporto temporale plausibile con la somministrazione di vaccini e che non può essere spiegato da una malattia concomitante o da altri farmaci o sostanze chimiche.
Probabile	Un evento clinico con un rapporto temporale ragionevole con la somministrazione del vaccino; è improbabile che sia attribuito a una malattia concomitante o ad altri farmaci o sostanze chimiche.
Possibile	Un evento clinico con un rapporto temporale ragionevole con la somministrazione di vaccini, ma che potrebbe anche essere spiegato da una concomitante malattia o da altri farmaci o sostanze chimiche.
Improbabile	Un evento clinico il cui rapporto temporale con la somministrazione del vaccino rende improbabile una connessione causale, ma che potrebbe essere plausibilmente spiegato da una malattia sottostante o da altri farmaci o sostanze chimiche.
Non correlato	Un evento clinico con un rapporto temporale incompatibile e che potrebbe essere spiegato da una malattia sottostante o da altri farmaci o sostanze chimiche
Non classificabile	Un evento clinico con informazioni insufficienti per consentire la valutazione e l'identificazione della causa

<https://www.aggiornamentimedicina.it/revisione-valutazione-causalita-organizzazione-mondiale-sanita-oms-eventi-avversi-seguito-immunizzazione-critica/>

**AGGIORNAMENTO BIBLIOGRAFICO**

<https://www.aggiornamentimedicina.it/revisione-valutazione-causalita-organizzazione-mondiale-sanita-oms-eventi-avversi-seguito-immunizzazione-critica/> (PULIYEL J, NAIK P - 29 MAGGIO 2018)

Puliyel J, Naik P. **Revised World Health Organization (WHO)'s causality assessment of adverse events following immunization-a critique.** *F1000Res.* **2018** Feb 28;7:243. doi: 10.12688/f1000research.13694.2. PMID: 30026925; PMCID: PMC6039921. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6039921/>

Bellavite P. **Causality assessment of adverse events following immunization: the problem of multifactorial pathology.** *F1000Res.* **2020** Mar 9;9:170. doi: 10.12688/f1000research.22600.2. PMID: 32269767; PMCID: PMC7111503. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7111503/>

Bellavite P, Donzelli A, Isidoro C. **The WHO Algorithm for Causality Assessment of Adverse Effects Following Immunization with Genetic-Based Anti-COVID-19 Vaccines: Pitfalls and Suggestions for Improvement.** *J Clin Med.* **2024** Nov 30;13(23):7291. doi: 10.3390/jcm13237291. PMID: 39685749; PMCID: PMC11642405. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11642405/> <https://cmsindipendente.it/algorithmooms>

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, come se l'evento avverso non fosse mai accaduto!*

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

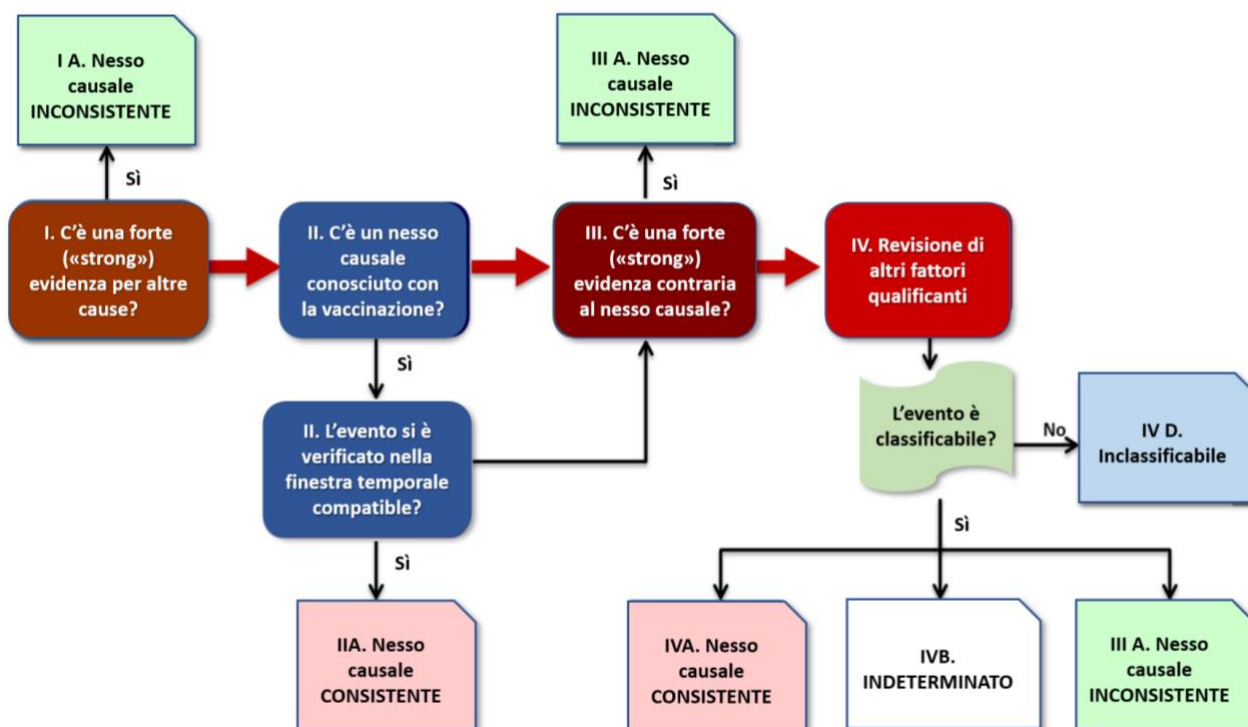
- **Consistente associazione causale con la vaccinazione:** solo se c'è l'evidenza con studi sulla popolazione che il vaccino può aver causato l'evento avverso la reazione viene classificata come consistente; ciò ha due conseguenze:
  - viene negato il riconoscimento di nuove associazioni che possono emergere negli studi di post-marketing di fase 4
  - se l'evento è una reazione avversa nota l'associazione causale viene riconosciuta a priori (e quindi non viene segnalata, in particolare per reazioni acute considerate moderate o lievi)
- **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.*

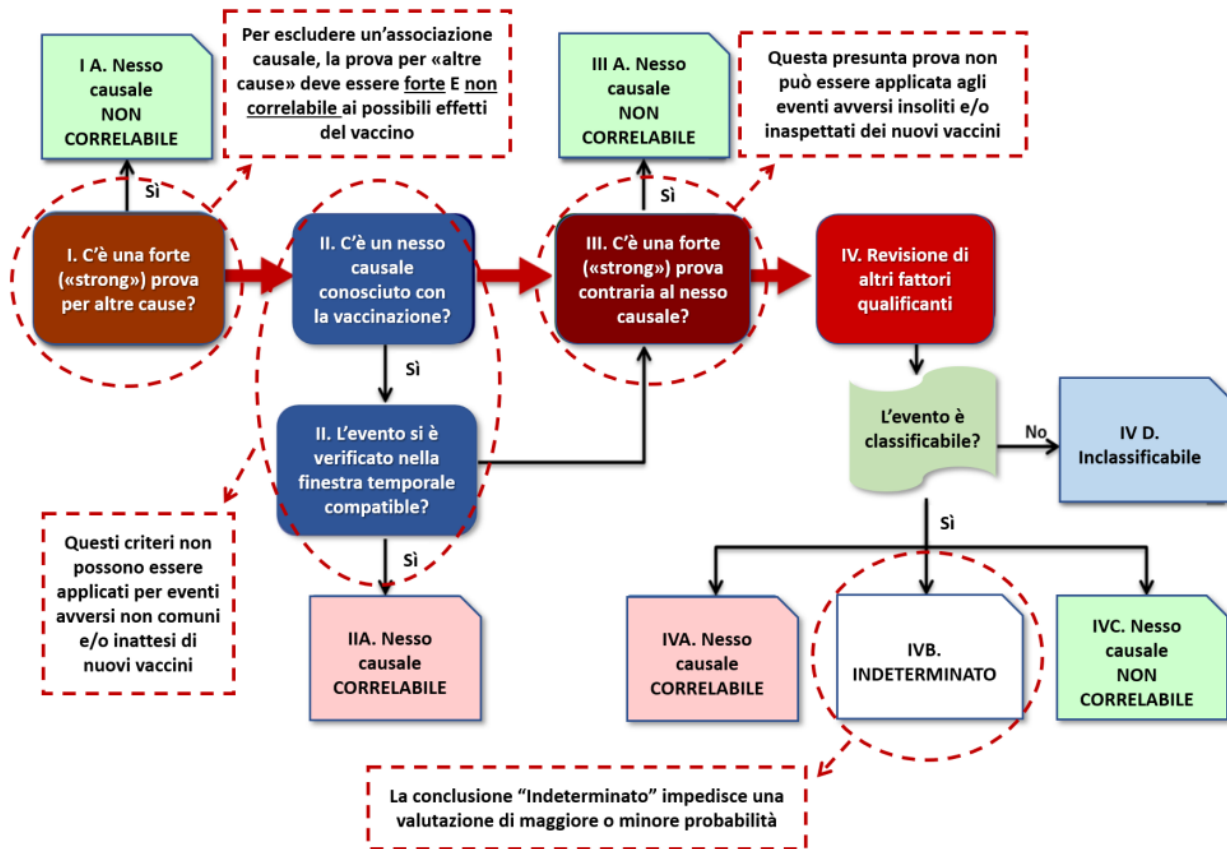
- **Non classificabile:** sono eventi clinici con informazioni insufficienti per permettere la valutazione e l'identificazione della causa.

Termine di causalità	Criteri di valutazione
<b>Alcuni</b>	– Anomalia dell’evento o dell’esame di laboratorio, con una relazione temporale plausibile con l’assunzione di farmaci- Non può essere spiegata da malattia o altri farmaci- Risposta all’astinenza plausibile (farmacologicamente, patologicamente)- Evento definitivo dal punto di vista farmacologico o fenomenologico (cioè un disturbo medico obiettivo e specifico o un fenomeno farmacologico riconosciuto)- Rechallenge soddisfacente, se necessario
<b>Probabile/Piccola</b>	– Anomalia dell’evento o del test di laboratorio, con un rapporto di tempo ragionevole con l’assunzione di farmaci, difficilmente attribuibile a malattie o altri farmaci- Risposta all’astinenza clinicamente ragionevole- Rechallenge non richiesto
<b>Possibile</b>	– Anomalia di un evento o di un test di laboratorio, con una relazione temporale ragionevole con l’assunzione di droga – Potrebbe anche essere spiegata da malattie o da altri farmaci – Le informazioni sull’astinenza da droghe possono essere carenti o non chiare
<b>Improbabile</b>	– L’evento o l’anomalia del test di laboratorio, con un tempo di assunzione del farmaco che rende improbabile (ma notimpossibile) una relazione (ma notimpossibile) – La malattia o altri farmaci forniscono spiegazioni plausibili
<b>Condizionale / Non classificato</b>	– Anomalia di un evento o di un test di laboratorio – Sono necessari ulteriori dati per una corretta valutazione, oppure – Ulteriori dati in esame
<b>Non valutabile/ Non classificabile</b>	– Rapporto che suggerisce una reazione avversa – Non può essere giudicato perché le informazioni sono insufficienti o contraddittorie – I dati non possono essere integrati o verificati

<https://www.aggiornamentimedicina.it/revisione-valutazione-causalita-organizzazione-mondiale-sanita-oms-eventi-avversi-seguito-immunizzazione-critica/>



## Limiti dell'algoritmo OMS



P. Bellavite, A. Donzelli e C. Isidoro, JCM 2024

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

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" <sup>92</sup>

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 riconoscimento e indennizzo per il danno subito.

## 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. <sup>93</sup>

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 <sup>94</sup>

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

*"Il fattore di confondimento \* da controindicazione 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 superiori 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".*

\* 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.

La frase "studio non sperimentale" si riferisce a studi in cui il ricercatore non può controllare la variabile in fase di sperimentazione <sup>95</sup> (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) <sup>96</sup>

Categoria	Malati	Sani	Rischio
Vaccinati	A	B	Rischio vaccinati = $\frac{A}{A + B}$
Controlli	C	D	Rischio controllo = $\frac{C}{C + D}$
			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

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

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

*Risultato:* hanno reazioni avverse 81 vaccinati e 13 controlli.

*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.

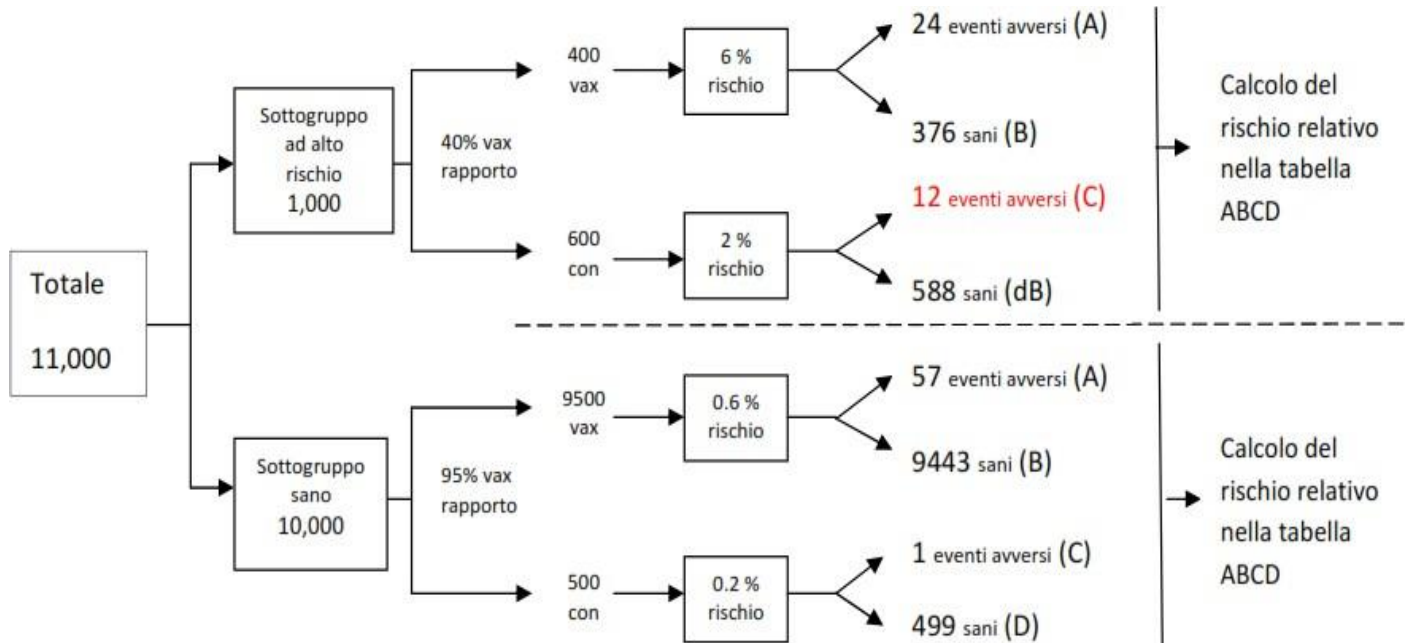
In altre parole, il bias di selezione del controllo sano si verifica quando:

- 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

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	Rischio Vaccinati= 6%
Controllo (600)	12	588	Rischio Controllo= 2%

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

**Sottogruppo sano:**

	Eventi avversi	sani	
Vaccinati (9500)	57	9443	Rischio Vaccinati = 0.6%
Controllo (500)	1	499	Rischio Controllo = 0.2%

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 realtà 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.<sup>97</sup> 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 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).<sup>98</sup>

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 sé 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,<sup>99</sup> 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."*

**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. (<https://www.hhs.gov/immunization/basics/safety/side-effects/index.html>)

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.<sup>100</sup> 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 più di recente 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<sup>101</sup>, 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).

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<sup>94</sup> è riportata la seguente tabella:

NOTE SULLA TOSSICITA' DI HEXAVAC

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 con 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 ed 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

- 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:

NOTE SULLA TOSSICITA' DI HEXAVAC

**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 ( $\pm$ OPV) (N = 462)	17.4 (11/63.1)	<b>5.00 (1.53-16.3)</b>
		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 ( $\pm$ 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 ( $\pm$ 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 ( $\pm$  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.

Questi studi dimostrano che l'analisi dell'incidenza delle reazioni avverse da vaccino è particolarmente difficile a causa dei numerosi bias e manipolazioni dei dati clinici.

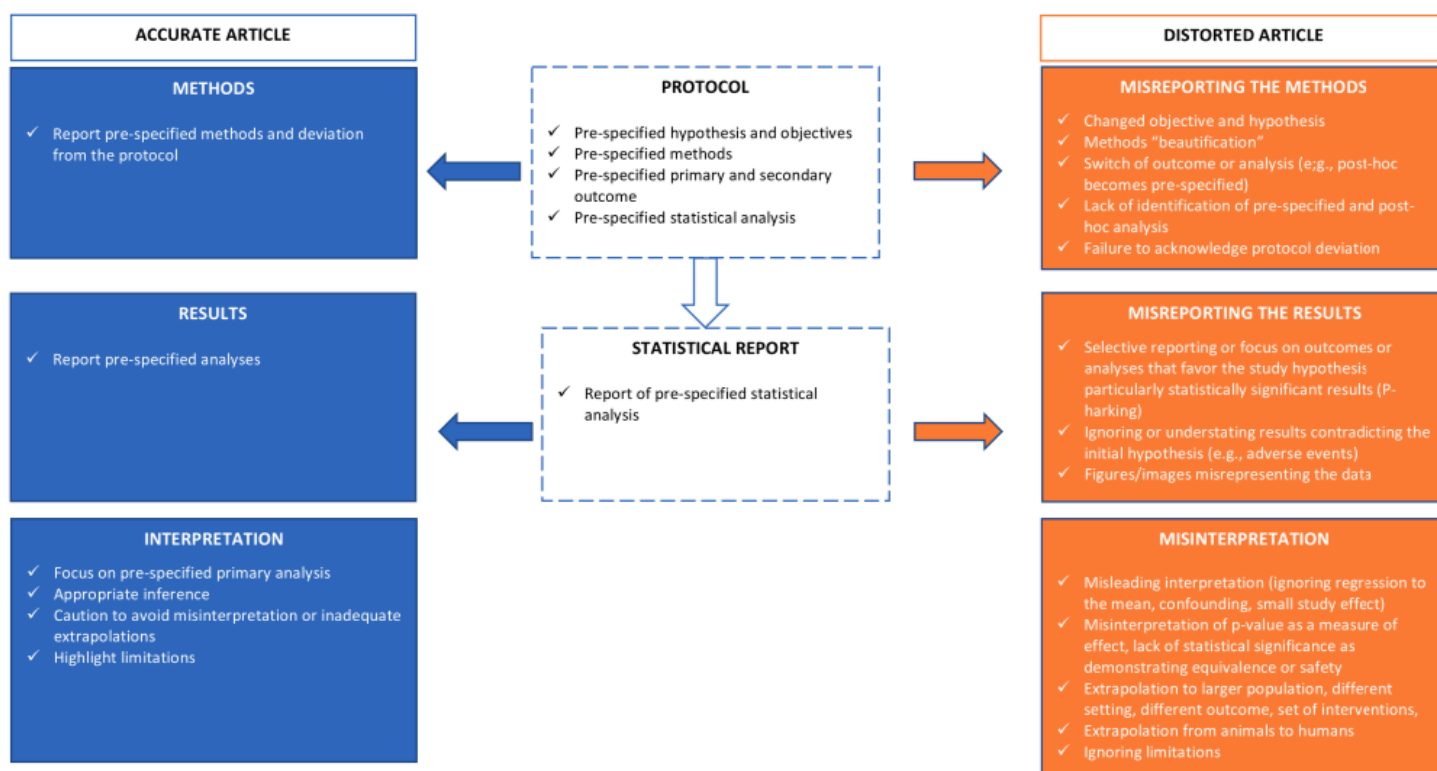
La maggior parte degli studi che negano il nesso causale vaccino/evento avverso riporta un risultato indeterminato (per mancanza del dato) o manipolato, e quindi si può parlare di "propaganda scientifica" (o "*spin*" in inglese, cioè "dare una spinta" nella direzione voluta, e quindi soggettiva, nell'interpretazione dei risultati).

*Lo "spin" può anche essere definito come qualsiasi pratica (di segnalazione), consapevole o inconsapevole, che porta a un'interpretazione errata o eccessiva dei risultati dello studio, solitamente enfatizzando risultati più favorevoli di quanto il disegno dello studio, le analisi e i risultati effettivi giustifichino.*

Mentre la malinterpretazione ("misinterpretation") si riferisce a un'interpretazione incoerente dei risultati dello studio (cioè un'interpretazione errata), l'interpretazione eccessiva si riferisce a quando gli autori assumono una posizione marcata derivante dalla loro opinione piuttosto che dai risultati dello studio. Entrambe le pratiche sono strettamente collegate e contribuiscono alla distorsione (cioè alla presentazione distorta) dei risultati scientifici.

Gli esempi sono l'uso di un linguaggio esagerato, l'evidenziazione (solo) dei risultati basati su sottogruppi selezionati o la scelta di una particolare analisi statistica per modellare l'impressione dei loro risultati sui lettori.<sup>102</sup>

## NOTE SULLA TOSSICITA' DI HEXAVAC



<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5856510/>

Nella ricerca biomedica, il concetto di spin è stato introdotto dal BMJ nel 1995<sup>103</sup>. Da allora, diversi articoli hanno affrontato le implicazioni dello spin in diversi contesti e progetti di studio, dimostrandone l'elevata prevalenza e l'effetto dannoso. Lo spin può avere conseguenze gravi e indesiderabili nella pratica medica (compresi potenziali danni ai pazienti), nello sviluppo di linee guida cliniche, nelle politiche sanitarie, nel finanziamento di ricerche successive e nel coinvolgimento del pubblico in generale.<sup>104</sup>

## 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.

È 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.

- 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 stata adeguata per accertare la reale incidenza delle reazioni avverse.
- 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.

Per tali motivi il vaccino Hexavac può essere considerato un farmaco di fatto sperimentale anche se registrato, privo di dati incontestabili sulla sua innocuità ed efficacia.

## BIBLIOGRAFIA



### BIBLIOGRAFIA RILEVANTE SULL'ALLUMINIO ADIUVANTE <sup>105</sup>

<sup>1</sup> EPAR Hexavac

[https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2005/2005091910091/anx\\_10091\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2005/2005091910091/anx_10091_en.pdf)

<sup>2</sup> European Medicines Agency recommends suspension of Hexavac Press release 20.09.2005

[https://www.ema.europa.eu/en/documents/press-release/european-medicines-agency-recommends-suspension-hexavac\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/press-release/european-medicines-agency-recommends-suspension-hexavac_en.pdf)

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

<https://www.aifa.gov.it/documents/20142/241044/111.48863.11589113885275a98.pdf>

<sup>4</sup> EMEA public statement: EMEA update on hexavalent vaccines: Hexavac and Infanrix Hexa

<https://www.infovac.fr/docman/261-hexavalent-vaccines-emea-1-12-2003/file>

<sup>5</sup> 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 I<sup>1</sup>, Grunert D, Habash S, Preidel H, Schult R, Pfletschinger 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 S<sup>1</sup>, Tagliabue C, Bosis S, Ierardi V, Gambino M, Principi N.

<sup>6</sup> 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, 003-2006. Jorgensen P<sup>1</sup>, Poethko-Müller C, Hellenbrand W, Jilg W, Thierfelder W, Meyer C, an der Heiden M, Schlaud M, Radun D.

<sup>7</sup> Swissmedic. Notification to health experts, 20 September 2005: Swissmedic suspends the license of Hexavac vaccine. Swissmedic J 2005; 9: 678-679.

<sup>8</sup> 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.

- <sup>9</sup> 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.
- <sup>10</sup> 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
- <sup>11</sup> 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.
- <sup>12</sup> Eur J Immunol. 2011 Jun;41(6):1800-8. Switched memory B cells maintain specific memory independently of serum antibodies: the hepatitis B example. Rosado MM<sup>1</sup>, 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.
- <sup>13</sup> <https://www.studiesalute.org/salute-nozioni-base> (Il sistema immunitario)
- Meccanismo della risposta immunitaria  
[http://amsacta.unibo.it/3067/37/12\\_risposta\\_immunitaria\\_l\\_ed\\_ebook.pdf](http://amsacta.unibo.it/3067/37/12_risposta_immunitaria_l_ed_ebook.pdf)
- ILARJ. 2005;46(3):230-40. Basic concepts of immune response and defense development. McCullough KC<sup>1</sup>, Summerfield A.
- <sup>14</sup> 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.
- <sup>15</sup> <https://www.inmp.it/ita/Atlante/SMR-Rapporto-Standardizzato-di-Mortalita>  
[https://biochimicaclinica.it/wp-content/uploads/2023/03/1699-2021.010\\_Zanolla.pdf](https://biochimicaclinica.it/wp-content/uploads/2023/03/1699-2021.010_Zanolla.pdf)  
<https://www.epicentro.iss.it/mortalita/>
- <sup>16</sup> 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.
- <sup>17</sup> 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
- <sup>18</sup> 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 S<sup>1</sup>, Neri M, Riezzo I, Rossi G, Pomara C, Turillazzi E, Fineschi V.
- <sup>19</sup> 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
- <sup>20</sup> 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
- <sup>21</sup> 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
- <sup>22</sup> Biostatistics. 2009 Jan;10(1):3-16. Case series analysis for censored, perturbed, or curtailed post-event exposures. Farrington CP<sup>1</sup>, Whitaker HJ, Hocine MN.

---

<https://www.aifa.gov.it/sites/default/files/bif000133.pdf>

[https://www.bvspiemonte.it/wp-content/uploads/2021/10/Perfetti\\_LA-RICERCA-CLINICA\\_23-sett-21\\_Tipi-di-studi.pdf](https://www.bvspiemonte.it/wp-content/uploads/2021/10/Perfetti_LA-RICERCA-CLINICA_23-sett-21_Tipi-di-studi.pdf)

[http://farmacologia.unipg.it/index\\_htm\\_files/lez.10\\_sperclin.pdf](http://farmacologia.unipg.it/index_htm_files/lez.10_sperclin.pdf)

<sup>24</sup> 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 R<sup>1</sup>, Hecker H, Poethko-Müller C, Schlaud M, Vennemann M, Whitaker HJ, Farrington CP.

<sup>25</sup> Vaccine. 2007 Jan 4;25(2):336-40. Sudden infant death syndrome: no increased risk after immunisation. Vennemann MM<sup>1</sup>, Butterfass-Bahloul T, Jorch G, Brinkmann B, Findeisen M, Sauerland C, Bajanowski T, Mitchell EA; GeSID Group.

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

<sup>27</sup> 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

<sup>28</sup> Curr Med Chem. 2014 Mar;21(7):941-6. Sudden infant death following hexavalent vaccination: a neuropathologic study. Maturri L, Del Corno G, Lavezzi AM

<sup>29</sup> Early Hum Dev. 2011 Mar;87(3):209-15. Unexplained stillbirth versus SIDS: common congenital diseases of the autonomic nervous system pathology and nosology. Maturri L<sup>1</sup>, Lavezzi AM.

<sup>30</sup> Virchows Arch. 2006 Jan;448(1):100-4. Sudden infant death syndrome (SIDS) shortly after hexavalent vaccination: another pathology in suspected SIDS? Ottaviani G<sup>1</sup>, Lavezzi AM, Maturri L.

<sup>31</sup> Pediatrics. 2002 Nov;110(5):e64. The triple risk hypotheses in sudden infant death syndrome. Guntheroth WG<sup>1</sup>, Spiers PS.

<sup>32</sup> Lupus. 2012 Feb;21(2):223-30. Mechanisms of aluminum adjuvant toxicity and autoimmunity in pediatric populations. Tomljenovic L<sup>1</sup>, Shaw CA.

J Inorg Biochem. 2009 Nov;103(11):1555-62. Aluminum hydroxide injections lead to motor deficits and motor neuron degeneration. Shaw CA<sup>1</sup>, Petrik MS.

Front Neurol. 2015 Feb 5;6:4. Biopersistence and brain translocation of aluminum adjuvants of vaccines. Gherardi RK<sup>1</sup>, Eidi H<sup>1</sup>, Crépeaux G<sup>1</sup>, Authier FJ<sup>1</sup>, Cadusseau J<sup>1</sup>.

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 T<sup>1</sup>, 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 CA<sup>1</sup>, Tomljenovic L.

---

Pediatr Nephrol. 1992 Jul;6(4):383-93. Aluminum toxicity in childhood. Sedman A<sup>1</sup>.

<sup>33</sup> 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.

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

<sup>35</sup> 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 PN<sup>1</sup>, Kruck TP<sup>2</sup>, Lukiw WJ<sup>3</sup>.

<sup>36</sup> 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 WJ<sup>1</sup>, Percy ME, Kruck TP.

<sup>37</sup> Vaccine. 1997 Aug-Sep;15(12-13):1314-8. In vivo absorption of aluminium-containing vaccine adjuvants using 26Al. Flarend RE<sup>1</sup>, Hem SL, White JL, Elmore D, Suckow MA, Rudy AC, Dandashli EA.

<sup>38</sup> 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 RA<sup>1</sup>, Rhineheimer SS, Sharma P, Elmore D, McNamara PJ.

<sup>39</sup> 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 TZ<sup>1</sup>, Paneth N, Rumbelha W, Zyskowski J, Gewolb IH.

<sup>40</sup> 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 M<sup>1</sup>, Eriksson H<sup>2</sup>, Siesjö P<sup>3</sup>, Darabi A<sup>3</sup>, Shardlow E<sup>1</sup>, Exley C<sup>1</sup>.

<sup>41</sup> Sci Rep. 2016 Aug 12;6:31578. Insight into the cellular fate and toxicity of aluminium adjuvants used in clinically approved human vaccinations. Mold M<sup>1</sup>, Shardlow E<sup>1</sup>, Exley C<sup>1</sup>.

<sup>42</sup> J Trace Elem Med Biol. 2015 Apr;30:90-5. The binding, transport and fate of aluminium in biological cells. Exley C<sup>1</sup>, Mold MJ<sup>2</sup>.

J Inorg Biochem. 2013 Nov;128:229-36. Aluminium based adjuvants and their effects on mitochondria and lysosomes of phagocytosing cells. Ohlsson L<sup>1</sup>, 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 I<sup>1</sup>, Svensson A<sup>2</sup>, Darabi A<sup>3</sup>, Mold M<sup>4</sup>, Siesjö P<sup>3</sup>, Eriksson H<sup>5</sup>

<sup>43</sup> Toxicology. 2017 Jan 15;375:48-57. Non-linear dose-response of aluminium hydroxide adjuvant particles: Selective low dose neurotoxicity. Crépeaux G<sup>1</sup>, Eidi H<sup>2</sup>, David MO<sup>3</sup>, Baba-Amer Y<sup>4</sup>, Tzavara E<sup>5</sup>, Giros B<sup>5</sup>, Authier FJ<sup>4</sup>, Exley C<sup>6</sup>, Shaw CA<sup>7</sup>, Cadusseau J<sup>8</sup>, Gherardi RK<sup>4</sup>.

Morphologie. 2016 Jun;100(329):85-94. Aluminum adjuvants of vaccines injected into the muscle: Normal fate, pathology and associated disease. Gherardi RK<sup>1</sup>, Aouizerate J<sup>1</sup>, Cadusseau J<sup>2</sup>, Yara S<sup>2</sup>, Authier FJ<sup>3</sup>.

Front Neurol. 2015 Feb 5;6:4. Biopersistence and brain translocation of aluminum adjuvants of vaccines. Gherardi RK<sup>1</sup>, Eidi H<sup>1</sup>, Crépeaux G<sup>1</sup>, Authier FJ<sup>1</sup>, Cadusseau J<sup>1</sup>.

BMC Med. 2015 Jun 17;13:144. Fluorescent nanodiamonds as a relevant tag for the assessment of alum adjuvant particle biodisposition. Eidi H<sup>1,2</sup>, David MO<sup>3</sup>, Crépeaux G<sup>4</sup>, Henry L<sup>5</sup>, Joshi V<sup>6</sup>, Berger MH<sup>7</sup>, Sennour M<sup>8</sup>, Cadusseau J<sup>9,10</sup>, Gherardi RK<sup>11</sup>, Curmi PA<sup>12</sup>.

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 Z<sup>1</sup>, Combadière C, Authier FJ, Itier V, Lux F, Exley C, Mahrouf-Yorgov M, Decrouy X, Moretto P, Tillement O, Gherardi RK, Cadusseau J.

<sup>44</sup> Brain. 2001 Sep;124(Pt 9):1821-31. Macrophagic myofasciitis lesions assess long-term persistence of vaccine-derived aluminium hydroxide in muscle. Gherardi RK<sup>1</sup>, Coquet M, Cherin P, Belec L, Moretto P, Dreyfus PA, Pellissier JF, Chariot P, Authier FJ.

<sup>45</sup> 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 C<sup>1</sup>, Le T, Swain MG.

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

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

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

<sup>49</sup> 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 T<sup>1</sup>, Liao X, Feng T, Wu Q, Zhang J, Cao X, Li H.

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

<sup>51</sup> <https://www.studiesalute.org/salute-nozioni-base> (Il sistema immunitario)

<sup>52</sup> BMC Med. 2013 Apr 4;11:99. Slow CCL2-dependent translocation of biopersistent particles from muscle to brain. Khan Z<sup>1</sup>, Combadière C, Authier FJ, Itier V, Lux F, Exley C, Mahrouf-Yorgov M, Decrouy X, Moretto P, Tillement O, Gherardi RK, Cadusseau J.

<sup>53</sup> 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 KJ<sup>1</sup>, Søndergaard M<sup>2</sup>, Andersen A<sup>3</sup>, Sartono E<sup>4</sup>, Martins C<sup>2</sup>, Garly ML<sup>2</sup>, Eugen-Olsen J<sup>5</sup>, Ullum H<sup>6</sup>, Yazdanbakhsh M<sup>4</sup>, Aaby P<sup>7</sup>, Benn CS<sup>8</sup>, Erikstrup C<sup>9</sup>.

<sup>54</sup> 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 S<sup>1</sup>, 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 J<sup>1</sup>, Moine P, Azoulay-Dupuis E, Henin D, Fantin B.

<sup>55</sup> Ann Neurol. 2005 Jan;57(1):67-81. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. Vargas DL<sup>1</sup>, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA.

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

<sup>56</sup> J Neuroimmune Pharmacol. 2017 Mar;12(1):1-5. Nanomedicines for the Treatment of CNS Diseases. Reynolds JL<sup>1</sup>, Mahato RI<sup>2</sup>.

<sup>57</sup> 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<sup>1,2</sup>, Sonner JK<sup>1</sup>, Zeller MW<sup>3,4</sup>, et al

<sup>58</sup> 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 PN<sup>1</sup>, Kruck TP<sup>2</sup>, Lukiw WJ<sup>3</sup>.

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

<sup>59</sup> J Inorg Biochem. 2015 Nov;152:199-205. Highly delayed systemic translocation of aluminum-based adjuvant in CD1 mice following intramuscular injections. Crépeaux G<sup>1</sup>, Eidi H<sup>2</sup>, David MO<sup>3</sup>, Tzavara E<sup>4</sup>, Giros B<sup>4</sup>, Exley C<sup>5</sup>, Curmi PA<sup>3</sup>, Shaw CA<sup>6</sup>, Gherardi RK<sup>7</sup>, Cadusseau J<sup>8</sup>.

BMC Med. 2015 Jun 17;13:144. Fluorescent nanodiamonds as a relevant tag for the assessment of alum adjuvant particle biodisposition. Eidi H<sup>1,2</sup>, David MO<sup>3</sup>, Crépeaux G<sup>4</sup>, Henry L<sup>5</sup>, Joshi V<sup>6</sup>, Berger MH<sup>7</sup>, Sennour M<sup>8</sup>, Cadusseau J<sup>9,10</sup>, Gherardi RK<sup>11</sup>, Curmi PA<sup>12</sup>.

<sup>60</sup> Toxicology. 2017 Jan 15;375:48-57. Non-linear dose-response of aluminium hydroxide adjuvant particles: Selective low dose neurotoxicity. Crépeaux G<sup>1</sup>, Eidi H<sup>2</sup>, David MO<sup>3</sup>, Baba-Amer Y<sup>4</sup>, Tzavara E<sup>5</sup>, Giros B<sup>5</sup>, Authier FJ<sup>4</sup>, Exley C<sup>6</sup>, Shaw CA<sup>7</sup>, Cadusseau J<sup>8</sup>, Gherardi RK<sup>4</sup>.

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

<sup>62</sup> Vaccine. 2002 May 31;20 Suppl 3:S13-7. Aluminum toxicokinetics regarding infant diet and vaccinations. Keith LS<sup>1</sup>, Jones DE, Chou CH.

<sup>63</sup> Vaccine. 2011 Nov 28;29(51):9538-43. Updated aluminum pharmacokinetics following infant exposures through diet and vaccination. Mitkus RJ<sup>1</sup>, King DB, Hess MA, Forshee RA, Walderhaug MO.

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

<sup>65</sup> Mol Neurobiol. 2016 Feb 20 Neuroprotective Effect of Nanodiamond in Alzheimer's Disease Rat Model: a Pivotal Role for Modulating NF-κB and STAT3 Signaling. Alawdi SH<sup>1,2</sup>, El-Denshary ES<sup>3</sup>, Safar MM<sup>4</sup>, Eidi H<sup>5</sup>, David MO<sup>5</sup>, Abdel-Wahhab MA<sup>6</sup>.

Chemosphere. 2016 May;151:289-95. Aluminum chloride induces neuroinflammation, loss of neuronal dendritic spine and cognition impairment in developing rat. Cao Z<sup>1</sup>, Yang X<sup>1</sup>, Zhang H<sup>1</sup>, Wang H<sup>1</sup>, Huang W<sup>1</sup>, Xu F<sup>1</sup>, Zhuang C<sup>1</sup>, Wang X<sup>2</sup>, Li Y<sup>3</sup>.

Neurotoxicology. 2008 Nov;29(6):1069-79. Aluminium-induced electrophysiological, biochemical and cognitive modifications in the hippocampus of aging rats. Sethi P<sup>1</sup>, 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 A<sup>1</sup>, Mohammad B, Moftah M, Kandeel KM, Bassiouny AR.

Food Chem Toxicol. 1993 May;31(5):357-61. Neurotoxic effect of enteral aluminium. Bilkei-Gorzó A<sup>1</sup>.

<sup>66</sup> Chem Soc Rev. 2012 Mar 21;41(6):2323-43. Toxicity of nanomaterials. Sharifi S<sup>1</sup>, 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.

Austin J Nanomed Nanotechnol. 2014;2(6): 1034 Toxicity of Nanomaterials-Physicochemical Effects. Rahi A, Sattarahmady N and Heli H.

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 J<sup>1</sup>, Chang X<sup>1</sup>, Chen X<sup>2</sup>, Gu Z<sup>1</sup>, Zhao F<sup>3</sup>, Chai Z<sup>4</sup>, Zhao Y<sup>1</sup>.

<sup>67</sup> Curr Med Chem. 2011;18(17):2630-7. Aluminum vaccine adjuvants: are they safe? Tomljenovic L<sup>1</sup>, Shaw CA

<sup>68</sup> 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 CA<sup>1</sup>, Tomljenovic L.

<sup>69</sup> Nat Rev Rheumatol. 2009 Nov;5(11):648-52. Vaccines and autoimmunity Nancy Agmon-Levin, Ziv Paz, Eitan Israeli & Yehuda Shoenfeld

<sup>70</sup> Autoimmune Dis. 2014;2014:437231 A Potential Link between Environmental Triggers and Autoimmunity. Vojdani A. doi: 10.1155/2014/437231.

Chem Res Toxicol. 2010 Mar 15;23(3):455-66. Toxicology of autoimmune diseases. Pollard KM<sup>1</sup>, Hultman P, Kono DH.

Vaccines and Autoimmunity Yehuda Shoenfeld, Nancy Agmon-Levin, Lucija Tomljenovic June 2015, Wiley-Blackwell 384 pages

<sup>71</sup> Lupus. 2012 Feb;21(2):223-30. Mechanisms of aluminum adjuvant toxicity and autoimmunity in pediatric populations. Tomljenovic L<sup>1</sup>, Shaw CA.

<sup>72</sup> Cancer Research 2005 Nov 15;65(22):10273-9. Some oral poliovirus vaccines were contaminated with infectious SV40 after 1961. Cutrone R<sup>1</sup>, Lednicky J, Dunn G, Rizzo P, Bocchetta M, Chumakov K, Minor P, Carbone M.

<sup>73</sup> 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 WT<sup>1</sup>, Chang S, Miller ER, Woo EJ, Hoffmaster AR, Gee JE, Clark TA, Iskander JK, Ball R, Broder KR.

<sup>74</sup> Bovine Derived Materials Used in Vaccine Manufacturing Questions and Answers  
<http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/QuestionsaboutVaccines/ucm143521.htm>

<sup>75</sup> 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 G<sup>1</sup>, Toussaint JF, Cassart JP, Howe B, Boyce D, Friedland L, Abu-Elyazeed R, Poncelet S, Han HH, Debrus S.

<sup>76</sup> Jpn J Infect Dis. 2004 Apr;57(2):58-9. Endotoxin content in Haemophilus influenzae type b vaccine. Ochiai M<sup>1</sup>, Kataoka M, Toyozumi H, Yamamoto A, Kamachi K, Arakawa Y, Kurata T, Horiuchi Y.

<sup>77</sup> Vaccine. 2015 Jan 1;33(1):252-9. Detecting and preventing reversion to toxicity for a formaldehyde-treated C. difficile toxin B mutant. Wang B<sup>1</sup>, Wang S<sup>1</sup>, Rustandi RR<sup>1</sup>, Wang F<sup>1</sup>, Mensch CD<sup>1</sup>, Hong L<sup>1</sup>, Kristopeit A<sup>1</sup>, Secore S<sup>1</sup>, Dornadula G<sup>1</sup>, Kanavage A<sup>1</sup>, Heinrichs JH<sup>1</sup>, Mach H<sup>1</sup>, Blue JT<sup>1</sup>, Thirirot DS<sup>2</sup>.

<sup>78</sup> 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 HA<sup>1</sup>, Kegel B, Bonifas U, Silberbach K, Klimek J, Weiber K, Krämer B

<sup>79</sup> 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 E<sup>1</sup>.

<sup>80</sup> 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 HV<sup>1</sup>

<sup>81</sup> Expert Rev Vaccines. 2009 May;8(5):607-18. Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines. Barrett PN<sup>1</sup>, Mundt W, Kistner O, Howard MK.

<sup>82</sup> EVM reflection paper on the Safety Assessment of Residuals and Contaminants in Vaccines  
<https://www.vaccineurope.eu/wp-content/uploads/2012/12/EVM-Safety-Assessment-of-Residuals-and-Contaminants-in-Vaccines-update-Final-Version-FIN.pdf>

Minimum requirements for biological products

<https://ntp.niehs.nih.gov/sites/default/files/iccvam/methods/biologics/vaccine/japan-minreqs.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

<https://www.who.int/publications/m/item/nonclinical-evaluation-of-vaccine-adjuvants-and-adjuvanted-vaccines-annex-2-trs-no-987>

<sup>83</sup> J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol 3:79-84 (1959). An endocrinological test for innocuity of the pertussis vaccine. Pekarek J and Rezabek K

<sup>84</sup> Clinical Medicine Research. Vol. 2, No. 6, 2013, pp. 154-157 Autoimmune Tissue Scurvy Misdiagnosed as Child Abuse Michael D Innis

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

<sup>85</sup> 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

<sup>86</sup> Vaccine. 2015 Aug 26;33(36):4398-405. Safety monitoring in the Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS) Shimabukuro TT, Nguyen M, Martin D, DeStefano F.

<sup>87</sup> [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-clinical-evaluation-vaccines-revision-1\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-clinical-evaluation-vaccines-revision-1_en.pdf)

<sup>88</sup> Lupus. 2012 Feb;21(2):223-30. Mechanisms of aluminum adjuvant toxicity and autoimmunity in pediatric populations. Tomljenovic L<sup>1</sup>, Shaw CA.

<sup>89</sup> Curr Genomics. 2015 Feb;16(1):47-59. Genetics and vaccines in the era of personalized medicine. Castiblanco J<sup>1</sup>, Anaya JM<sup>2</sup>.

Semin Immunol. 2013 Apr;25(2):89-103. Vaccinomics, adversomics, and the immune response network theory: individualized vaccinology in the 21st century. Poland GA<sup>1</sup>, 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 GA<sup>1</sup>, 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 P<sup>1</sup>, Falvella FS<sup>1</sup>, Perrone V<sup>1</sup>, Carnovale C<sup>1</sup>, Brusadelli T<sup>1</sup>, Pozzi M<sup>2</sup>, Antoniazzi S<sup>3</sup>, Cheli S<sup>1</sup>, Perrotta C<sup>1</sup>, Clementi E<sup>4</sup>, Radice S<sup>1</sup>.

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 GA<sup>1</sup>, Kennedy RB, Ovsyannikova IG.

*Aggiornamento:*

Vaccine. 2018 Aug 28;36(36):5350-5357 Personalized vaccinology: A review Poland GA, Ovsyannikova IG, Kennedy RB.

<sup>90</sup> <https://iris.who.int/handle/10665/191391>

<sup>91</sup> The Brighton Collaboration: Creating a Global Standard for Case Definitions (and Guidelines) for Adverse Events Following Immunization. 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*.

<sup>92</sup> Indian Journal of Medical Ethics Vol X No 3 July-September 2013 AEFI and the pentavalent vaccine: looking for a composite picture - Jacob Puliyeel <http://www.indiaenvironmentportal.org.in/files/file/pentavalent%20vaccines.pdf>

<sup>93</sup> BMJ. 2013 May 16;346:f3037. Influenza: marketing vaccine by marketing disease. Doshi P<sup>1</sup>.

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 DT<sup>1</sup>, Marrie TJ, Johnstone J, Majumdar SR.

<sup>94</sup> Am J Epidemiol. 1992 Jul 15;136(2):121-35. Confounding in studies of adverse reactions to vaccines. Fine PE<sup>1</sup>, Chen RT. *Correzione*: <http://aje.oxfordjournals.org/content/136/8/1039>

<sup>95</sup> <https://www.questionpro.com/blog/it/studi-sperimentali-e-studi-osservazionali-differenze-ed-esempi/>

<sup>96</sup> [http://www.quadernodiepidemiologia.it/epi/cause/ris\\_rel.htm](http://www.quadernodiepidemiologia.it/epi/cause/ris_rel.htm)

<sup>97</sup> **Tipi di studi**

<https://topconditioning.com/2018/02/12/capire-gli-studi-scientifici-mini-guida/>

<sup>98</sup> **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](https://boa.unimib.it/retrieve/handle/10281/76804/113743/phd_unimib_072464.pdf)

<sup>99</sup> PLoS One. 2011;6(12):e27897. Adverse events following 12- and 18-month vaccinations: a population-based, self-controlled case series analysis. Wilson K<sup>1</sup>, Hawken S, Kwong JC, et al

<sup>100</sup> 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 H<sup>1</sup>, Zou H, Sheikh AM, Malik M, Dobkin C, Brown WT, Li X.

<sup>101</sup> 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 SW<sup>1</sup>, Andersen A<sup>2</sup>, Rodrigues A<sup>1</sup>, Benn CS<sup>3</sup>, Aaby P<sup>4</sup>.

#### AGGIORNAMENTO: LO SPIN NELLA RICERCA SCIENTIFICA

<sup>102</sup> J Clin Epidemiol. 2024 Jun; 170:111364SPIN-PM: a consensus framework to evaluate the presence of spin in studies on prediction models. doi: 10.1016/j.jclinepi.2024.111364. Andaur Navarro CL, Damen JAA, Ghannad M, Dhiman P, van Smeden M, Reitsma JB, Collins GS, Riley RD, Moons KGM, Hooft L.

<sup>103</sup> BMJ. 1995 Apr 15;310(6985):985-7. The rhetoric of research. doi: 10.1136/bmj.310.6985.985. Horton R.

<sup>104</sup> Proc Natl Acad Sci U S A. 2018 Mar 13;115(11):2613-2619. Misrepresentation and distortion of research in biomedical literature. doi: 10.1073/pnas.1710755115 Boutron I, Ravaud P.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2021 Apr 13;118(15):e1914085117 The narrative truth about scientific misinformation. doi: 10.1073/pnas.1914085117. Dahlstrom MF.

Hawaii J Med Public Health. 2013 Oct;72(10):336-7. The "spin" doctors. Starr RR, St John TL, Meagher MJ. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3796781/>

Nature 2013;503:335–337. Policy: Twenty tips for interpreting scientific claims. doi: 10.1038/503335a. Sutherland WJ, Spiegelhalter D, Burgman MA.

Radiology. 2013;267:581–588 Overinterpretation and misreporting of diagnostic accuracy studies: Evidence of “spin”.. doi: 10.1148/radiol.12120527 Ochodo EA, et al.

J Clin Epidemiol. 2016;75:56–65. A new classification of spin in systematic reviews and meta-analyses was developed and ranked according to the severity doi: 10.1016/j.jclinepi.2016.01.020. Yavchitz A, et al.

BMC Med Res Methodol. 2015;15:85 Classification and prevalence of spin in abstracts of non-randomized studies evaluating an intervention.. doi: 10.1186/s12874-015-0079-x. Lazarus C, Haneef R, Ravaud P, Boutron I.

#### **BIBLIOGRAFIA RILEVANTE SULLA TOSSICOLOGIA ALLUMINIO ADIUVANTE (FINO AL 2019)** <sup>105</sup>



- <https://www.mdpi.com/1660-4601/16/12/2129/htm>  
Int J Environ Res Public Health. 2019 Jun 16;16(12). pii: E2129. **Alluminio nel tessuto cerebrale nell'epilessia: Un caso di Camelford**. Mold M1, Cottle J2, Exley C3.

L'esposizione umana all'alluminio è un problema sempre più diffuso. Nel 1988, la popolazione della città di Camelford, in Cornovaglia, è stata esposta a livelli estremamente elevati di alluminio nell'acqua potabile. In questa sede forniamo le prove che l'alluminio ha avuto un ruolo nella morte di un residente di Camelford in seguito allo sviluppo di un'epilessia ad insorgenza tardiva. (2) Riassunto del caso: abbiamo misurato il contenuto di alluminio nel tessuto cerebrale di questo individuo e abbiamo dimostrato accumuli significativi di alluminio nell'ippocampo (4,35 (2,80) µg/g di peso secco) e nel lobo occipitale (2,22 (2,23) µg/g di peso secco, media, SD, n = 5), quest'ultimo associato a calcificazioni anomale. La microscopia a fluorescenza specifica per l'alluminio ha confermato la presenza di alluminio in entrambi i tessuti e ha permesso di osservare cellule gliali cariche di alluminio in prossimità di detriti cellulari/neuronali ricchi di alluminio. Queste osservazioni supportano una componente infiammatoria in questo caso di epilessia a insorgenza tardiva. Il rosso Congo non è riuscito a identificare alcun deposito di amiloide in nessun tessuto, mentre la tioflavina S ha mostrato estese patologie tau extracellulari e intracellulari. (3) Discussione: Presentiamo i primi dati che mostrano la presenza di alluminio nel tessuto cerebrale nell'epilessia e suggeriamo, alla luce delle prove complementari della letteratura scientifica, la prima evidenza che l'alluminio abbia giocato un ruolo nell'insorgenza di questo caso di epilessia ad insorgenza tardiva dell'adulto.

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6518255/pdf/ijerph-16-01459.pdf> Int J Environ Res Public Health. 2019 Apr 24;16(8). pii: E1459. **Alluminio intracellulare nelle cellule infiammatorie e gliali nell'angiopatia amiloide cerebrale: Un caso clinico.** Mold M1, Cottle J2, King A3, Exley C4.

Nel 2006 abbiamo riferito di livelli molto elevati di alluminio nel tessuto cerebrale in un caso insolito di angiopatia amiloide cerebrale (CAA). L'individuo in questione era stato esposto a livelli estremamente elevati di alluminio nell'acqua potabile a causa di un noto incidente di inquinamento a Camelford, in Cornovaglia, nel Regno Unito. Il recente sviluppo della microscopia a fluorescenza specifica per l'alluminio ha permesso di identificare la posizione dell'alluminio nel cervello. (2) Riassunto del caso: abbiamo utilizzato la microscopia a fluorescenza specifica per l'alluminio in parallelo con la colorazione rosso Congo e la luce polarizzata per identificare la posizione dell'alluminio e dell'amiloide nel tessuto cerebrale di un individuo deceduto per un caso raro e insolito di CAA. L'alluminio era quasi esclusivamente intracellulare e prevalentemente nelle cellule infiammatorie e gliali, tra cui microglia, astrociti, linfociti e cellule che rivestono il plesso corioideo. La colorazione complementare con rosso Congo ha dimostrato che l'alluminio e l'amiloide non erano co-localizzati in questi tessuti. (3) Discussione: L'osservazione di alluminio prevalentemente intracellulare in questi tessuti è una novità e qualcosa di simile è stato osservato in precedenza solo in casi di autismo. I risultati suggeriscono una forte componente infiammatoria in questo caso e supportano un ruolo dell'alluminio in questo raro e insolito caso di CAA.

- [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6223008/pdf/13223\\_2018\\_Article\\_305.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6223008/pdf/13223_2018_Article_305.pdf) Allergy Asthma Clin Immunol. 2018 Nov 7;14:80. **Svelare l'enigma: chiarire la relazione tra le proprietà fisico-chimiche degli adiuvanti a base di alluminio e i loro meccanismi d'azione immunologica.** Shardlow E1, Mold M1, Exley C1.

I sali di alluminio sono di gran lunga gli adiuvanti più comunemente utilizzati nei vaccini. Esistono solo due sali di alluminio utilizzati nei vaccini clinicamente approvati, Alhydrogel® e AdjuPhos®, mentre il nuovo adiuvante di alluminio utilizzato in Gardasil® è una versione solfatata di quest'ultimo. Abbiamo studiato le proprietà fisico-chimiche di questi due coadiuvanti di alluminio, in particolare in ambienti che si avvicinano a entrambi i veicoli vaccinali e alla composizione dei siti di iniezione. Inoltre, abbiamo utilizzato una linea cellulare monocitica per stabilire la relazione tra le loro proprietà fisico-chimiche e la loro internalizzazione e citotossicità. Sottolineiamo che gli adiuvanti di alluminio utilizzati nei vaccini clinicamente approvati sono chimicamente e biologicamente diversi, con ruoli potenzialmente distinti negli eventi avversi correlati ai vaccini.

- VetPathol. 2019 May;56(3):418-428. <https://doi.org/10.1177/0300985818809142> **Granulomi in seguito all'iniezione sottocutanea di prodotti contenenti adiuvanti a base di alluminio negli ovini.** Asín J1, Molín J1, Pérez M2, Pinczowski P1, Gimeno M1, Navascués N3, Muniesa A1, de Blas I1, Lacasta D1, Fernández A1, de Pablo L4, Mold M5, ExleyC5, de Andrés D4, Reina R4, Luján L1.

L'uso di vaccini che includono adiuvanti a base di alluminio (Al) è molto diffuso tra i piccoli ruminanti e altri animali. Sono associati alla comparsa di noduli transitori nel sito di iniezione corrispondenti a granulomi. Questo studio mira a caratterizzare la morfologia di questi granulomi, a comprendere il ruolo dell'adiuvante a base di Al nella loro genesi e a stabilire la presenza del metallo nei linfonodi regionali. Sono stati selezionati 84 agnelli maschi castrati e suddivisi in 3 gruppi di trattamento di 28 animali ciascuno: (1) vaccino (contenente adiuvante a base di Al), (2) solo adiuvante e (3) controllo. Sono state eseguite 19 iniezioni sottocutanee in un arco di tempo di 15 mesi. I granulomi e i linfonodi regionali sono stati valutati con mezzi clinicopatologici.

Tutti gli agnelli vaccinati e il 92,3% degli agnelli con solo adiuvante hanno presentato granulomi nel sito di iniezione; i granulomi erano più numerosi nel gruppo a cui è stato somministrato il vaccino. La coltura batterica nei granulomi è sempre risultata negativa. Istologicamente, i granulomi del gruppo vaccino presentavano un grado di gravità maggiore. L'Al è stato identificato specificamente mediante colorazione lumogallica nei granulomi e nei linfonodi. Il contenuto mediano di Al era significativamente più alto ( $P < .001$ ) nei linfonodi del gruppo vaccino (82,65 µg/g) rispetto ai gruppi di solo adiuvante (2,53 µg/g) e di controllo (0,96 µg/g). La microscopia elettronica a trasmissione a scansione ha dimostrato la presenza di aggregati di Al all'interno dei macrofagi nei gruppi vaccino e solo adiuvante. In questi due gruppi, gli adiuvanti a base di Al inducono granulomi sottocutanei persistenti e sterili con traslocazione di Al nei linfonodi regionali guidata dai macrofagi. La traslocazione locale di Al può indurre un ulteriore accumulo in tessuti distanti ed essere correlata alla comparsa di segni sistemici.

- *PediatrDermatol.* 2019 Jan;36(1):e17-e19. <https://doi.org/10.1111/pde.13732> **Granuloma di alluminio in un bambino secondario alla vaccinazione DTaP-IPV: Un caso clinico.** Haag CK1, Dacey E2, Hamilton N3, White KP1.  
I rapporti sulla formazione acuta di granulomi di alluminio, che possono causare noduli persistenti e intensamente pruritici secondari alla somministrazione di vaccini contenenti alluminio, sono descritti raramente nella letteratura medica. A nostra conoscenza, questo è il primo rapporto che descrive lo sviluppo di un granuloma di alluminio che causa un nodulo persistente e prurito nel sito di iniezione dopo la somministrazione del vaccino DTaP-IPV. Presentiamo il caso di una bambina di 6 anni che ha sviluppato un nodulo sottocutaneo fortemente pruriginoso sulla parte anteriore della coscia destra nel sito di iniezione tre settimane dopo la somministrazione del vaccino DTaP-IPV (Kinrix) contenente alluminio. Il nodulo è stato infine asportato 14 mesi dopo la sua comparsa iniziale, dopodiché i sintomi si sono risolti. L'ispezione istologica ha dimostrato un infiltrato misto dermico e sottocutaneo denso e profondo di linfociti, istiociti ed eosinofili, con formazione di centri germinali. Il citoplasma granulare bluastro e anfililico presente nella maggior parte degli istiociti è una caratteristica dei "granulomi da alluminio". Questa reazione avversa dovrebbe essere presa in considerazione in tutti i pazienti che presentano reperti simili nelle settimane successive a una vaccinazione DTaP-IPV o ad altri vaccini contenenti alluminio. Inoltre, la tendenza autolimitante di questi noduli non dovrebbe precludere ai pazienti colpiti qualsiasi vaccinazione futura, anche se i vaccini senza alluminio dovrebbero essere scelti di preferenza quando possibile.
- *AdvExpMedBiol.* 2018;1091:33-37. DOI: 10.1007/978-981-13-1370-7\_2 **La chimica dell'esposizione umana all'alluminio.** Exley C1.  
Prima di iniziare a comprendere la chimica dell'esposizione umana all'alluminio, è necessario comprendere alcune regole di base. La regola numero uno ci dice che la forma di alluminio legata ai gruppi funzionali delle biomolecole è il suo catione trivalente libero in acqua, Al<sup>3+</sup> (aq). La regola numero due ci dice che il legame di Al<sup>3+</sup> (aq) è determinato da vincoli sia termodinamici che cinetici. La regola numero tre ci dice quanto sia essenziale comprendere l'importanza critica del regime di esposizione. L'applicazione di queste semplici regole della chimica dell'alluminio ci permette di capire perché, ad esempio, non tutti i sali di alluminio sono uguali e non tutte le vie di esposizione all'alluminio sono equivalenti.
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6121957/pdf/ijerph-15-01777.pdf>  
*Int J Environ Res Public Health.* 2018 Aug 18;15(8). **Alluminio nel tessuto cerebrale nella sclerosi multipla.** Mold M1, Chmielecka A2, Rodriguez MRR3, Thom F4, Linhart C5, King A6, Exley C7.  
La sclerosi multipla (SM) è una malattia neurodegenerativa devastante e debilitante di causa sconosciuta. Un consenso suggerisce il coinvolgimento di fattori sia genetici che ambientali, di cui l'ultimo potrebbe riguardare l'esposizione umana all'alluminio. Non esistono dati sul contenuto e sulla distribuzione dell'alluminio nel tessuto cerebrale umano nella SM. Il contenuto di alluminio nel tessuto cerebrale di 14 donatori con diagnosi di SM è stato determinato mediante spettrometria di assorbimento atomico con forno a grafite a riscaldamento trasversale. La localizzazione dell'alluminio nel tessuto cerebrale di due donatori è stata studiata mediante microscopia a fluorescenza specifica per l'alluminio. Il contenuto di alluminio nel tessuto cerebrale nella SM era universalmente elevato, con molti tessuti che presentavano concentrazioni superiori a 10 µg/g di peso secco (10 ppm) e alcuni superiori a 50 ppm. Non sono state riscontrate relazioni statisticamente significative tra i lobi cerebrali, l'età o il sesso del donatore. La fluorescenza specifica dell'alluminio ha identificato con successo l'alluminio nel tessuto cerebrale sia in sede intracellulare che extracellulare. L'associazione dell'alluminio con i corpi amilacei suggerisce un ruolo dell'alluminio nella neurodegenerazione della SM.
- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0946672X17308763?via%3Dihub>  
*J Trace Elem Med Biol.* 2018 Mar;46:76-82. **Alluminio nel tessuto cerebrale nell'autismo.** Mold M1, Umar D2, King A3, Exley C1.  
Il disturbo dello spettro autistico è un disturbo del neurosviluppo di eziologia sconosciuta. Si ipotizza che coinvolga sia la suscettibilità genetica che i fattori ambientali, tra cui, in quest'ultimo caso, le tossine ambientali. L'esposizione umana alla tossina ambientale alluminio è stata collegata, anche se provvisoriamente, al disturbo dello spettro autistico. In questa sede abbiamo utilizzato la spettrometria di assorbimento atomico in forno di grafite a riscaldamento trasversale per misurare, per la prima volta, il contenuto di alluminio nel tessuto cerebrale di donatori con diagnosi di autismo. Abbiamo inoltre utilizzato un fluoro selettivo per l'alluminio per identificare l'alluminio nel tessuto cerebrale utilizzando la microscopia a fluorescenza. Il contenuto di alluminio del tessuto cerebrale nell'autismo era costantemente elevato. Il contenuto medio (deviazione standard) di alluminio in tutti e 5 gli individui

per ciascun lobo era di 3,82(5,42), 2,30(2,00), 2,79(4,05) e 3,82(5,17) µg/g di peso secco per i lobi occipitale, frontale, temporale e lobi parietali rispettivamente. Questi sono alcuni dei valori più alti di alluminio nel tessuto cerebrale umano mai registrati e c'è da chiedersi perché, ad esempio, il contenuto di alluminio nel lobo occipitale di un ragazzo di 15 anni sia di 8,74 (11,59) µg/g di peso secco. La microscopia a fluorescenza selettiva dell'alluminio è stata utilizzata per identificare l'alluminio nel tessuto cerebrale di 10 donatori. Sebbene l'alluminio sia stato rilevato associato ai neuroni, è apparso presente a livello intracellulare nelle cellule simili alla microglia e in altre cellule infiammatorie non neuronali nelle meningi, nei vasi, nella materia grigia e bianca. La preminenza dell'alluminio intracellulare associato alle cellule non neuronali è stata un'osservazione di spicco nel tessuto cerebrale dell'autismo e può offrire indizi sia sull'origine dell'alluminio cerebrale sia su un ruolo putativo nel disturbo dello spettro autistico.

- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0946672X16303777?via%3Dihub>  
J Trace Elem Med Biol. 2017 Mar;40:30-36. **Alluminio nel tessuto cerebrale nella malattia di Alzheimer familiare.** Mirza A1, King A2, Troakes C3, Exley C4.  
Le predisposizioni genetiche che descrivono una diagnosi di malattia di Alzheimer familiare possono essere considerate come pietre miliari dell'ipotesi della cascata amiloide. In sostanza, esse pongono l'espressione e il metabolismo della proteina precursore dell'amiloide come il principale principio dell'eziologia della malattia. Tuttavia, non conosciamo la causa della malattia di Alzheimer e si può ancora dimostrare che i fattori ambientali contribuiscono alla sua insorgenza e progressione. Uno di questi fattori ambientali è l'esposizione umana all'alluminio, che è stato dimostrato essere presente nel tessuto cerebrale della malattia di Alzheimer sporadica. Abbiamo effettuato le prime misurazioni in assoluto dell'alluminio nel tessuto cerebrale di 12 donatori con diagnosi di malattia di Alzheimer familiare. Le concentrazioni di alluminio erano estremamente elevate, ad esempio, in 5 dei 12 individui erano presenti valori superiori a 10µg/g di peso secco del tessuto. Nel complesso, le concentrazioni erano superiori a tutte le precedenti misurazioni dell'alluminio cerebrale, ad eccezione dei casi di encefalopatia indotta dall'alluminio. Abbiamo supportato le nostre analisi quantitative utilizzando un metodo innovativo di microscopia a fluorescenza selettiva dell'alluminio per visualizzare l'alluminio in tutti i lobi di ogni cervello analizzato. I dati quantitativi unici e le immagini sorprendenti dell'alluminio nel tessuto cerebrale della malattia di Alzheimer familiare sollevano lo spettro del ruolo dell'alluminio in questa malattia devastante.
- Adv Exp Med Biol. 2018;1091:53-83. **L'alluminio come tossina del SNC e del sistema immunitario nell'arco della vita.** Shaw CA1.  
Di seguito prenderò in considerazione l'impatto dell'alluminio su due importanti sistemi, il sistema nervoso centrale (SNC) e il sistema immunitario, nell'arco della vita. L'articolo discuterà la presenza dell'alluminio nella biosfera, la sua storia e le fonti dell'elemento. Queste includono alimenti, cosmetici per l'acqua, alcuni vaccini e una serie di altre fonti. Considererò anche la chimica unica dell'alluminio. Infine, negli esseri umani e negli animali, considererò come l'alluminio possa avere un impatto sul sistema nervoso centrale a vari livelli di organizzazione e come possa essere coinvolto in vari stati patologici neurologici nell'arco della vita. Questi disturbi includono quelli dell'infanzia e della fanciullezza, come il disturbo dello spettro autistico (ASD), e quelli dell'età adulta, come la malattia di Alzheimer. La natura bidirezionale delle interazioni tra SNC e sistema immunitario sarà presa in considerazione e inserita nel contesto dei disturbi neurologici che hanno una componente autoimmune. Si sosterrà che l'esposizione di uomini e animali a questo elemento deve essere ridotta se si vogliono ridurre alcuni disturbi del SNC e del sistema immunitario.
- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0946672X17300950>  
J Trace Elem Med Biol. 2018 Jul;48:67-73. **Riconsiderazione dei livelli di dose sicura pediatrica immunoterapeutica di alluminio.** Lyons-Weiler J1, Ricketson R2.  
Le normative FDA richiedono test di sicurezza per gli ingredienti costitutivi dei farmaci (21 CFR 610.15). Ad eccezione delle proteine estranee, non sono richiesti test di sicurezza per i vaccini o per i programmi vaccinali. Il dosaggio dell'alluminio nei vaccini si basa sulla produzione di titoli anticorpali, non sulla scienza della sicurezza. Qui stimiamo un limite di dose pediatrica che tiene conto del peso corporeo. Identifichiamo diversi gravi errori storici nelle analisi passate dei livelli provvisori di sicurezza dell'alluminio nei vaccini e forniamo aggiornamenti relativi all'esposizione infantile all'alluminio nel programma di vaccinazione pediatrica, considerando il peso corporeo dei bambini. Quando le dosi di alluminio sono stimate dal Federal Regulatory Code in base al peso corporeo, l'esposizione derivante dall'attuale calendario vaccinale risulta superiore alla nostra stima del limite di dose pediatrica corretto per il peso. I nostri calcoli mostrano che i livelli di alluminio suggeriti dai limiti attualmente in uso mettono i neonati a rischio di

esposizioni acute, ripetute e probabilmente croniche a livelli tossici di alluminio nei moderni programmi vaccinali. Le esposizioni individuali degli adulti sono in linea con i "limiti" della dose settimanale tollerabile provvisoria, ma alcuni individui possono essere intolleranti all'alluminio a causa della genetica o di precedenti esposizioni. La vaccinazione nei neonati e nei bambini a basso peso alla nascita deve essere rivalutata; vengono discusse altre implicazioni per l'uso di vaccini contenenti alluminio e ulteriori limiti nella nostra comprensione della neurotossicità e dei livelli di sicurezza dell'alluminio nei farmaci biologici.

- J Inorg Biochem. 2018 Apr;181:87-95. **Analisi critica degli studi di riferimento sulla tossicocinetica dei coadiuvanti a base di alluminio.** Masson JD1, Crépeaux G2, Authier FJ1, Exley C3, Gherardi RK4.

Abbiamo esaminato i tre studi tossicocinetici di riferimento comunemente utilizzati per suggerire che i coadiuvanti a base di alluminio (Al) sono innocui. Un unico studio sperimentale è stato condotto utilizzando il <sup>26</sup>Al isotopico (Flarend et al., Vaccine, 1997). Questo studio ha utilizzato sali di alluminio simili a quelli utilizzati nei vaccini, ma ha ignorato l'assorbimento dell'adiuvante da parte delle cellule, che all'epoca non era ancora pienamente documentato. È stato condotto per un breve periodo di tempo (28 giorni) e ha utilizzato solo due conigli per ogni adiuvante. Al termine, l'eliminazione dell'Al nelle urine era pari al 6% per l'idrossido di Al e al 22% per il fosfato di Al, risultati entrambi incompatibili con una rapida eliminazione dell'Al derivato dal vaccino nelle urine. Due studi teorici hanno valutato il rischio potenziale dell'Al vaccinale nei neonati, facendo riferimento a un "livello minimo di rischio" (LMR) orale estrapolato da studi sugli animali. Keith et al. (Vaccine, 2002) hanno utilizzato un LMR elevato (2 mg/kg/d), un modello errato di assorbimento immediato del 100% di Al da vaccino e non hanno considerato l'imaturità della barriera renale ed emato-encefalica. Mitkus et al. (Vaccine, 2011) hanno considerato solo l'Al solubilizzato, con calcoli errati sulla durata dell'assorbimento. La diffusione sistemica delle particelle di Al e il potenziale neuro-infiammatorio sono stati omessi. L'LMR da loro utilizzato era sia inappropriato (Al orale rispetto all'adiuvante iniettato) sia ancora troppo alto (1mg/kg/d) rispetto ai recenti studi sugli animali. La scarsità e le gravi carenze degli studi di riferimento suggeriscono fortemente la necessità di eseguire nuovi studi sperimentali sulla tossicocinetica degli adiuvanti a base di Al a lungo termine, comprese le esposizioni neonatali e adulte, per garantire la loro sicurezza e ripristinare la fiducia della popolazione nei vaccini contenenti Al.

- Biol Trace Elem Res. 2018 Jun;183(2):314-324. DOI: 10.1007/s12011-017-1139-3 **Quanto è negativa l'esposizione all'alluminio per i parametri riproduttivi nei ratti?** Mouro VGS1, Menezes TP1, Lima GDA1, Domingues RR1, Souza ACF1, Oliveira JA1, Matta SLP1, Machado-Neves M2.

L'alluminio (Al) è il metallo più ampiamente distribuito nell'ambiente ed è ampiamente utilizzato nella vita quotidiana dell'uomo senza alcuna funzione biologica nota. È noto che l'esposizione ad alte concentrazioni di Al ha un impatto negativo sui livelli sierici di testosterone, sull'istomorfometria testicolare e sui parametri spermatici; tuttavia, non sono disponibili informazioni sugli effetti di bassi livelli di esposizione sulla riproduzione. Le organizzazioni internazionali hanno stabilito che la concentrazione di Al tollerata nell'acqua potabile è di  $3,35 \times 10^{-4}$  mg/kg. Pertanto, abbiamo voluto confrontare gli effetti dell'esposizione a lungo termine a basse e alte concentrazioni di Al sulle funzioni riproduttive maschili, concentrandoci sui parametri di testicolo, epididimo e sperma. Ratti Wistar adulti sono stati esposti a cloruro di alluminio (AlCl<sub>3</sub>) a  $6,7 \times 10^{-5}$ ,  $3,35 \times 10^{-4}$ , 10, e 40 mg/kg per 112 giorni tramite gavage. Gli animali esposti all'Al hanno presentato bassi valori di peso del testicolo e dell'epididimo e livelli sierici di testosterone rispetto ai controlli. La stereologia delle cellule di Leydig, l'istomorfometria dell'epididimo, la motilità degli spermatozoi e l'integrità strutturale delle membrane spermatiche sono cambiate a seconda della concentrazione di Al. Per quanto riguarda l'istomorfometria dell'epididimo, il segmento iniziale e le regioni del caput sono state più colpite dall'esposizione all'Al rispetto alle regioni distali. Per il resto, l'istologia del testicolo e dell'epididimo non ha subito alterazioni dopo l'esposizione all'Al, così come la morfologia dello sperma. In sintesi, abbiamo concluso che le conseguenze dell'esposizione all'Al a bassi livelli erano negative quanto quelle ad alti livelli sui parametri riproduttivi, suggerendo un impatto negativo sulla fertilità maschile.

- J Inorg Biochem. 2018 Apr;181:96-103. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2017.11.012 **L'esposizione ai coadiuvanti dell'alluminio è associata a disturbi sociali nei topi? Uno studio pilota.** Sheth SKS1, Li Y2, Shaw CA2.

BACKGROUND: Il nostro gruppo ha dimostrato che esistono correlazioni significative tra i tassi di disturbo dello spettro autistico (ASD) e gli adiuvanti totali di alluminio somministrati ai bambini attraverso i vaccini in diversi Paesi occidentali. Queste correlazioni soddisfano otto dei nove criteri di Hill per la causalità. Studi sperimentali hanno dimostrato una serie di anomalie comportamentali nei topi giovani dopo l'esposizione postnatale all'alluminio. Sulla

base del nostro lavoro precedente, l'attuale studio analizzerà l'effetto degli adiuvanti dell'alluminio sul comportamento sociale nei topi. Le anomalie nell'interazione sociale sono una caratteristica fondamentale dei soggetti affetti da ASD.

**METODI:** Ai cuccioli di topo CD-1 neonati è stato iniettato un totale di 550µg di gel di idrossido di alluminio (gruppo sperimentale) o di soluzione fisiologica (controllo) distribuiti nelle prime due settimane di vita postnatale. I topi sono stati poi sottoposti a test comportamentali sull'interesse sociale e la novità sociale alla settimana postnatale 8, 17 e 29. I valori p sono stati calcolati utilizzando i test di Mann-Whitney e Kruskal Wallis.

**RISULTATI:** I topi iniettati di alluminio hanno mostrato una diminuzione dell'interesse sociale rispetto ai controlli alla settimana 8 ( $p=0,016$ ) e 17 ( $p=0,012$ ). Hanno anche dimostrato un'anomalia nella novità sociale rispetto ai controlli alla settimana 8 ( $p=0,002$ ) e alla settimana 29 ( $p=0,042$ ).

**CONCLUSIONI:** Questo è il primo studio sperimentale, a nostra conoscenza, a dimostrare che i coadiuvanti dell'alluminio possono compromettere il comportamento sociale se applicati nel primo periodo dello sviluppo

postnatale. Lo studio, tuttavia, non è sufficiente per fare affermazioni sul legame tra coadiuvanti a base di alluminio e ASD nell'uomo.

- Toxicology. 2017 Sep 1;390:10-21. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.08.004> **L'esposizione all'alluminio a livelli alimentari umani promuove la disfunzione vascolare e aumenta la pressione sanguigna nei ratti: un'azione concertata di NAD(P)H ossidasi e COX-2.** Martinez CS1, Piagette JT1, Escobar AG1, Martín Á2, Palacios R2, Peçanha FM1, Vassallo DV3, Exley C4, Alonso MJ2, Miguel M5, Salaices M6, Wiggers GA7.

L'alluminio (Al) è un metallo non essenziale e un importante contaminante ambientale ed è associato a una serie di malattie umane, tra cui quelle cardiovascolari. Abbiamo studiato gli effetti dell'esposizione all'Al a dosi simili ai livelli alimentari umani sul sistema cardiovascolare per un periodo di 60 giorni. I ratti maschi Wistar sono stati divisi in due gruppi principali e hanno ricevuto per via orale: 1) basso livello di alluminio - i ratti sono stati suddivisi e trattati per 60 giorni come segue: a) non trattati - acqua ultrapura; b) AlCl<sub>3</sub> alla dose di 8,3 mg/kg di peso corporeo per 60 giorni, che rappresenta l'esposizione umana all'Al attraverso la dieta; e 2) alto livello di alluminio - i ratti sono stati suddivisi e trattati per 42 giorni come segue: c) Non trattati - acqua ultrapura; d) AlCl<sub>3</sub> a 100mg/kg di peso corporeo per 42 giorni, che rappresenta un alto livello di esposizione umana all'Al. Effetti sulla pressione arteriosa sistolica (SBP) e la funzione vascolare delle arterie di resistenza aortica e mesenterica (MRA) sono state studiate. L'integrità dell'endotelio e della muscolatura liscia è stata valutata mediante curve concentrazione-risposta all'acetilcolina (ACh) e al nitroprussiato di sodio. Sono state analizzate le risposte vasocostrittrici alla fenilefrina (Phe) in presenza e in assenza di endotelio e in presenza dell'inibitore della NOS L-NAME, del bloccante dei canali del potassio TEA, dell'inibitore della NAD(P)H ossidasi apocinina, della superossidodismutasi (SOD), dell'inibitore non selettivo della COX indometacina e dell'inibitore selettivo della COX-2 NS 398. Sono state misurate le specie reattive dell'ossigeno (ROS) vascolari, la perossidazione lipidica e la capacità antiossidante totale. Sono state inoltre analizzate le espressioni di mRNA di eNOS, NAD(P)H ossidasi 1 e 2, SOD1, COX-2 e recettore del trombossano A<sub>2</sub> (TXA-2 R). L'esposizione all'Al a livelli dietetici umani ha compromesso il sistema cardiovascolare e questi effetti sono stati pressoché identici a quelli del sistema cardiovascolare come l'esposizione all'Al a livelli molto più elevati. L'Al ha aumentato la SBP, diminuito il rilassamento indotto dall'ACh, aumentato la risposta al Phe, diminuito la modulazione endoteliale delle risposte vasocostrittrici, la biodisponibilità dell'ossido nitrico (NO), il coinvolgimento dei canali del potassio nelle risposte vascolari, nonché aumentato la produzione di ROS da parte della NAD(P)H ossidasi e di prostanoidei contrattili principalmente da parte della COX-2 sia nell'aorta che nelle arterie mesenteriche. L'esposizione all'Al ha aumentato la produzione di ROS vascolari e la perossidazione lipidica e ha alterato lo stato antiossidante nell'aorta e nell'MRA. L'Al ha diminuito i livelli di mRNA di eNOS e SOD1 e ha aumentato i livelli di mRNA di NAD(P)H ossidasi 1, COX-2 e TXA-2. I nostri risultati indicano un eccesso di ROS provenienti principalmente dalla NAD(P)H ossidasi dopo l'esposizione all'Al e l'aumento dei prostanoidei vascolari provenienti dalla COX-2 che agiscono di concerto per diminuire la biodisponibilità di NO, inducendo così disfunzioni vascolari e aumentando la pressione sanguigna. Pertanto, l'esposizione cronica di 60 giorni all'Al, che riflette la comune assunzione di Al nella dieta umana, sembra rappresentare un rischio per il sistema cardiovascolare.

- Pharmacol Res. 2018 Nov 3. pii: S1043-6618(18)31373-2. **RITIRATO: Cognizione e comportamento in pecore inoculate ripetutamente con vaccini contenenti adiuvante di alluminio o solo adiuvante di alluminio.** Asín J<sup>1</sup>, Pascual-Alonso M<sup>2</sup>, Pinczowski P<sup>1</sup>, Gimeno M<sup>1</sup>, Pérez M<sup>3</sup>, Muniesa A<sup>4</sup>, Pablo-Maiso L<sup>5</sup>, Blas I<sup>4</sup>, Lacasta D<sup>4</sup>, Fernández A<sup>4</sup>, Andrés D<sup>5</sup>, María G<sup>6</sup>, Reina R<sup>5</sup>, Luján L<sup>7</sup>.

<https://retractionwatch.com/wp-content/uploads/2019/04/Scandalous-withdrawn-of-a-published-paper.pdf>

## RIPUBBLICAZIONE

J Inorg Biochem. 2020 Feb;203:110934 <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110934> **Cognizione e comportamento in pecore inoculate ripetutamente con vaccini contenenti adiuvante di alluminio o solo adiuvante di alluminio.** Asín, Javier & Pascual-Alonso, María & Pinczowski, Pedro & Gimeno, Marina & Pérez, Marta & Muniesa, Ana & Pablo-Maiso, Lorena & de Blas, Ignacio & Lacasta, Delia & Fernández, Antonio & De Andrés Cara, Damián & María, Gustavo & Reina, Ramsés & Luján, Lluís

I vaccini contenenti alluminio (Al) sono comuni nella gestione degli ovini e sono stati associati alla sindrome autoimmune/infiammatoria indotta dagli adiuvanti (sindrome ASIA). Lo scopo di questo studio è stato quello di indagare i cambiamenti cognitivi e comportamentali in pecore sottoposte a un protocollo di inoculazione ripetitiva con prodotti contenenti Al. Ventuno agnelli sono stati assegnati a tre gruppi (n = 7 ciascuno): A (controllo), B (solo adiuvante), C (vaccino). Il gruppo C è stato inoculato con vaccini commerciali contenenti Al; il gruppo B ha ricevuto la dose equivalente di solo Al (Alhydrogel®) e il gruppo A ha ricevuto PBS. Sono state somministrate sedici inoculazioni in un periodo di 349 giorni. I cambiamenti etologici sono stati studiati a fine estate (7 inoculazioni) e a metà inverno (16 inoculazioni). Gli animali dei gruppi B e C hanno mostrato cambiamenti comportamentali: le interazioni affiliative sono state significativamente ridotte e le interazioni aggressive e le stereotipie sono aumentate in modo significativo. Hanno anche mostrato un aumento significativo del comportamento eccitatorio e dell'alimentazione compulsiva. In generale, i cambiamenti sono stati più pronunciati nel gruppo del vaccino rispetto al gruppo del solo adiuvante. Alcuni cambiamenti erano già significativi in estate, dopo solo sette inoculazioni. Questo studio è il primo a descrivere i cambiamenti comportamentali nelle pecore dopo aver ricevuto iniezioni ripetute di prodotti contenenti Al, spiegando alcuni dei segni clinici osservati nella sindrome ASIA ovina.

- Journal of Inorganic Biochemistry. (2017) 177. **Iniezioni sottocutanee di alluminio a livelli di adiuvante vaccinale attivano nel cervello dei topi geni dell'immunità innata omologhi ai biomarcatori dell'autismo.** Li, Dan & Tomljenovic, Lucija & Li, Yongling & A. Shaw, Christopher.

L'autismo è un disturbo neurocomportamentale caratterizzato da disfunzioni immunitarie. Si manifesta nella prima infanzia, durante una finestra di vulnerabilità dello sviluppo precoce in cui la normale traiettoria di sviluppo è più suscettibile agli insulti xenobiotici. Gli adiuvanti dei vaccini a base di alluminio (Al) sono xenobiotici con proprietà immunostimolanti e neurotossiche a cui i bambini di tutto il mondo sono abitualmente esposti. Per studiare l'impatto immunitario e neurotossico dell'alluminio in vivo, abbiamo analizzato l'espressione di 17 geni implicati nell'autismo e nella risposta immunitaria innata in campioni di cervello di topi iniettati di alluminio rispetto a topi di controllo. Diversi attori chiave dell'immunità innata, come le citochine CCL2, IFNG e TNFA, sono stati significativamente sovra regolati, mentre l'inibitore del fattore nucleare-kappa beta (NF-κB) NFKBIB e l'enzima che controllano la degradazione del neurotrasmettitore acetilcolina (ACHE), sono stati sotto regolati nei topi maschi iniettati di Al. Inoltre, la diminuzione dell'inibitore NF-κB e il conseguente aumento dei segnali infiammatori hanno portato all'attivazione della via di segnalazione NF-κB, con il conseguente rilascio della chemochina MIP-1A e delle citochine IL-4 e IL-6. Sembra quindi che l'Al abbia innescato l'attivazione del sistema immunitario innato e alterato l'attività colinergica nei topi maschi, osservazioni coerenti con quelle dell'autismo. Le femmine sono risultate meno sensibili all'esposizione all'Al, poiché solo i livelli di espressione dell'inibitore NF-κB e del TNFA sono stati alterati. Anche i modelli regionali delle alterazioni dell'espressione genica presentavano differenze di genere, in quanto la corteccia frontale era l'area più colpita nei maschi e il cervelletto nelle femmine. Pertanto, il coadiuvante dell'Al promuove l'infiammazione cerebrale e i maschi sembrano essere più suscettibili agli effetti tossici dell'Al.

- J Inorg Biochem. 2017 Dec;177:39-54. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28923356/> **RITIRATO: Iniezioni sottocutanee di alluminio a livelli di adiuvante vaccinale attivano geni innato-immunitari nel cervello di topo che sono omologhi ai biomarcatori dell'autismo.** Li D1, Tomljenovic L1, Li Y1, Shaw CA2.

Ritirato in: "Iniezioni sottocutanee di alluminio a livelli di adiuvante vaccinale attivano geni immunitari innati nel cervello di topo che sono omologhi ai biomarcatori dell'autismo" [Journal of Inorganic Biochemistry 177 (2017) 39-54]. Commento in: "Ricercatori canadesi i cui studi mettevano in dubbio la sicurezza dei vaccini affrontano una seconda ritrattazione. [BMJ. 2017]

- Vaccine. 2016 Jan 9. pii: S0264-410X(16)00016-5. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.12.067 **RITIRATO: Anomalie comportamentali in giovani topi femmina in seguito alla somministrazione di adiuvanti a base di alluminio e del**

**vaccino Gardasil contro il papillomavirus umano (HPV).** Inbar R1, Weiss R2, Tomljenovic L3, Arango MT4, Deri Y5, Shaw CA6, Chapman J7, Blank M5, Shoenfeld Y8.

Questo articolo è stato ritirato su richiesta del caporedattore a causa di seri dubbi sulla sua solidità scientifica. La revisione da parte del caporedattore e la valutazione da parte di esperti esterni hanno confermato che la metodologia è gravemente difettosa e le affermazioni contenute nell'articolo sono ingiustificate. In qualità di rivista internazionale sottoposta a revisione paritaria, riteniamo che sia nostro dovere ritirare l'articolo dalla circolazione e informare la comunità di questo problema. La politica completa di Elsevier sul ritiro degli articoli è disponibile all'indirizzo <http://www.elsevier.com/locate/withdrawalpolicy>.

#### RIPUBBLICAZIONE

Immunol Res. 2017 Feb;65(1):136-149. DOI: 10.1007/s12026-016-8826-6 **Anomalie comportamentali in topi femmina in seguito alla somministrazione di coadiuvanti a base di alluminio e del vaccino Gardasil contro il papillomavirus umano (HPV).** Inbar R<sup>1,2</sup>, Weiss R<sup>3,4</sup>, Tomljenovic L<sup>1,5</sup>, Arango MT<sup>1,6</sup>, Deri Y<sup>1</sup>, Shaw CA<sup>5</sup>, Chapman J<sup>1,7</sup>, Blank M<sup>1</sup>, Shoenfeld Y<sup>8,9</sup>.

Gli adiuvanti vaccinali e i vaccini possono indurre manifestazioni autoimmuni e infiammatorie in individui sensibili. Ad oggi, la maggior parte degli studi sui vaccini umani utilizza adiuvanti a base di alluminio (Al) come placebo, nonostante le numerose prove che dimostrano che l'Al in esposizioni rilevanti per il vaccino può essere tossico per gli esseri umani e gli animali. Abbiamo cercato di valutare gli effetti dell'adiuvante Al e del vaccino HPV Gardasil rispetto al vero placebo su parametri comportamentali e infiammatori in topi femmina. A topi femmina C57BL/6 di sei settimane sono stati iniettati Gardasil, Gardasil + tossina della pertosse (Pt), idrossido di Al o un veicolo di controllo in quantità equivalenti all'esposizione umana. A 7,5 mesi di età, i topi iniettati con Gardasil e Al hanno trascorso significativamente più tempo a galleggiare nel test di nuoto forzato (FST) rispetto ai topi iniettati con il veicolo (Al,  $p = 0,009$ ; Gardasil,  $p = 0,025$ ; Gardasil + Pt,  $p = 0,005$ ). L'aumento del tempo di galleggiamento era già altamente significativo a 4,5 mesi di età per il gruppo Gardasil e Gardasil + Pt ( $p \leq 0,0001$ ). Non sono state osservate differenze significative nel numero di scale salite nel test delle scale che misura l'attività locomotoria. Questi risultati indicano che le differenze osservate nel FST non sono probabilmente dovute a disfunzioni locomotorie, ma piuttosto alla depressione. Inoltre, gli anticorpi anti-HPV dei sieri dei topi iniettati con Gardasil e Gardasil + Pt hanno mostrato una reattività incrociata con l'estratto proteico del cervello di topo. L'analisi immunoistochimica ha rivelato un'attivazione microgliale nell'area CA1 dell'ippocampo dei topi iniettati di Gardasil. Sembra che Gardasil, attraverso il suo coadiuvante Al e gli antigeni HPV, sia in grado di scatenare neuroinfiammazione e reazioni autoimmuni, provocando ulteriori cambiamenti comportamentali.

#### Aggiornamento letteratura alluminio adiuvante 2020-2024



Crépeaux G, Authier FJ, Exley C, Luján L, Gherardi RK. **The role of aluminum adjuvants in vaccines raises issues that deserve independent, rigorous and honest science.** J Trace Elem Med Biol. 2020 Dec;62:126632. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2020.126632>

Masson JD, Crépeaux G, Authier FJ, Exley C, Gherardi RK. **Critical analysis of reference studies on the toxicokinetics of aluminum-based adjuvants.** J Inorg Biochem. 2018 Apr;181:87-95. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.12.015> <https://www.fnob.it/wp-content/uploads/2018/09/Gherardi-studio.pdf>

Exley C. **An aluminium adjuvant in a vaccine is an acute exposure to aluminium.** J Trace Elem Med Biol. 2020 Jan;57:57-59. doi: 10.1016/j.jtemb.2019.09.010. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.09.010>

Kim H, Lim KY, Kang J, Park JW, Park SH. **Macrophagic myofasciitis and subcutaneous pseudolymphoma caused by aluminium adjuvants.** Sci Rep. 2020 Jul 16;10(1):11834. doi: 10.1038/s41598-020-68849-8. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7366910/>

Dórea JG. **Neurotoxic effects of combined exposures to aluminum and mercury in early life (infancy).** Environ Res. 2020 Sep;188:109734. doi: 10.1016/j.envres.2020.109734. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109734>

Petersen SB, Gluud C. **Was amorphous aluminium hydroxyphosphate sulfate adequately evaluated before**

**authorisation in Europe?** *BMJ Evid Based Med.* 2021 Dec;26(6):285-289. doi: 10.1136/bmjebm-2020-111419. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8639934/>

Masson JD, Badran G, Domdom MA, Gherardi RK, Mograbi B, Authier FJ, Crépeaux G. **Advances on the early cellular events occurring upon exposure of human macrophages to aluminum oxyhydroxide adjuvant.** *Sci Rep.* 2023 Feb 23;13(1):3198. doi: 10.1038/s41598-023-30336-1. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9950428/>

Cohen Tervaert JW, Martinez-Lavin M, Jara LJ, Halpert G, Watad A, Amital H, Shoenfeld Y. **Autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA) in 2023.** *Autoimmun Rev.* 2023 May;22(5):103287. doi: 10.1016/j.autrev.2023.103287. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2023.103287>

Danielsson R, Ferey N, Mile I, Eriksson H. **Metabolic Reprogramming of Macrophages upon In Vitro Incubation with Aluminum-Based Adjuvant.** *Int J Mol Sci.* 2023 Feb 23;24(5):4409. doi: 10.3390/ijms24054409. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10002480/>

Masson JD, Badran G, Gherardi RK, Authier FJ, Crépeaux G. **Widespread Myalgia and Chronic Fatigue: Phagocytes from Macrophagic Myofasciitis Patients Exposed to Aluminum Oxyhydroxide-Adjuvanted Vaccine Exhibit Specific Inflammatory, Autophagic, and Mitochondrial Responses.** *Toxics.* 2024 Jul 4;12(7):491. doi: 10.3390/toxics12070491. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11281175/>

Caldarelli M, Rio P, Giambra V, Gasbarrini A, Gambassi G, Cianci R. **ASIA Syndrome: State-of-the-Art and Future Perspectives.** *Vaccines (Basel).* 2024 Oct 17;12(10):1183. doi: 10.3390/vaccines12101183. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11511404/>

Tomljenovic L, McHenry LB. **A reactogenic "placebo" and the ethics of informed consent in Gardasil HPV vaccine clinical trials: A case study from Denmark.** *Int J Risk Saf Med.* 2024;35(2):159-180. doi: 10.3233/JRS-230032. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11191454/>

Mokeddem, K. **Aluminum Adjuvants and Childhood Disease Prevalence.** Preprints 2024, 2024021613. <https://doi.org/10.20944/preprints202402.1613.v1> (in corso di revisione)