

# Report analisi metagenomiche su campioni vaccinali

## Introduzione

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

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

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

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

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

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

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

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



## Descrizione del metodo utilizzato per l'analisi

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

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

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

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

## Campioni Analizzati

### Campione 1.

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

### Campione 2.

**Nome prodotto:** Measles vaccine live B.P.  
**Tipo di prodotto:** Vaccino monovalente morbillo  
**Produttore:** Poonawalla Group (Profarma AG, Baar)  
**Composizione<sup>2</sup>:** virus vivo attenuato di Morbillo (ssRNA): ceppo Edmonson-Zagreb propagato in cellule diploidi umane MRC-3.

### Campione 3.

**Nome prodotto:** MMR vax Pro  
**Tipo di prodotto:** Vaccino trivalente morbillo, parotite, rosolia  
**Produttore:** MSD Vaccins, Francia  
**Composizione<sup>3</sup>:** Virus vivi attenuati: 1) Morbillo (ssRNA) ceppo Enders Edmonston coltivato in colture di cellule embrionali di pollo; Parotite (ssRNA) ceppo Jeryl Linn (Livello B), coltivato in colture di cellule embrionali di pollo; Rosolia (ssRNA) ceppo Wistar RA 27/3, coltivato su fibroblasti di cellule diploidi umane WI-38.

### Campione 4.

**Nome prodotto:** Infanrix hexa  
**Tipo di prodotto:** Vaccino esavalente pediatrico: difterite, tetano, pertosse, epatite B, poliomielite, Haemophilus influenzae tipo b  
**Produttore:** GlaxoSmithKline, Belgio  
**Composizione<sup>4</sup>:** Tossoidi difterico e tetanico; antigeni Bordetella pertussis; antigeni ricombinanti (prodotti in cellule di Saccaromyces) di sup. per epatite B; polisaccaride dell' H. influenzae; 3 tipi di Virus poliomielite (ssRNA) inattivati: tipo 1 (ceppo Mahoney)-tipo 2 (ceppo MEF-1)-tipo 3 (ceppo Saukkett), propagati in cellule VERO (scimmia). Tossoidi + antigeni Bordetella adsorbiti su alluminio idrossido idrato; polisaccaride H. influenzae adsorbito su fosfato di alluminio

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

<sup>2</sup> [https://vaccines.procon.org/sourcefiles/Attenuvax\\_package\\_insert.pdf](https://vaccines.procon.org/sourcefiles/Attenuvax_package_insert.pdf)

<sup>3</sup> [http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2017/20171215139691/anx\\_139691\\_it.pdf](http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2017/20171215139691/anx_139691_it.pdf)

<sup>4</sup> [http://www.ema.europa.eu/docs/it\\_IT/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000296/WC500032505.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/it_IT/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000296/WC500032505.pdf)



### Campione 5.

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| <b>Nome prodotto:</b>            | <b>Poliolnfanrix</b>  |
| <b>Tipo di prodotto:</b>         | Vaccino pentavalente pediatrico: difterite, tetano, pertosse, epatite B, poliomielite   |
| <b>Produttore:</b>               | GlaxoSmithKline, Belgio   |
| <b>Composizione<sup>5</sup>:</b> | Tossoidi difterico e tetanico; antigeni Bordetella pertussis; antigeni ricombinanti (prodotti in <u>cellule di Saccaromyces</u> ) di superficie epatite B; 3 tipi di Virus poliomielite ( <u>ssRNA</u> ) inattivati: tipo 1 (ceppo Mahoney)-tipo 2 (ceppo MEF-1)-tipo 3 (ceppo Saukkett), propagati in <u>cellule VERO</u> (scimmia). Tossoidi e antigeni Bordetella adsorbiti su alluminio idrossido idrato. |

### Campione 6.

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| <b>Nome prodotto:</b>            | <b>Fluad</b>  |
| <b>Tipo di prodotto:</b>         | Vaccino influenza stagione 2017/2018  |
| <b>Produttore:</b>               | Seqirus Srl, Siena  |
| <b>Composizione<sup>6</sup>:</b> | Antigeni di superficie del virus dell'influenza (emoagglutinina = glicoproteina di superficie) coltivati in <u>uova</u> e adiuvati con MF59C.1, dei ceppi: A/Michigan/45/205 (H1N1)pdm09-A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2)-B/Brisbane/60/2008. Adjuvante MF59C.1=squalene, polisorbato 80, sorbitan trioleato, sodio citrato, acido citrico, acqua per sospensioni iniettabili |

### Campione 7.

|                                  |  |
|----------------------------------|--|
| <b>Nome prodotto:</b>            | <b>Vivotif</b>                                       |
| <b>Tipo di prodotto:</b>         | Vaccino contro la febbre tifoide                     |
| <b>Produttore:</b>               | PaxVax, Regno Unito                                  |
| <b>Composizione<sup>7</sup>:</b> | <u>Salmonella typhi Ty21a</u> , ceppo vivo attenuato |

<sup>5</sup> [https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer\\_000200\\_037157\\_RCP.pdf&retry=0&sys=m0b113](https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer_000200_037157_RCP.pdf&retry=0&sys=m0b113)

<sup>6</sup> [https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer\\_004166\\_031840\\_RCP.pdf&retry=0&sys=m0b113](https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer_004166_031840_RCP.pdf&retry=0&sys=m0b113)

<sup>7</sup> [https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer\\_004175\\_025219\\_RCP.pdf&retry=0&sys=m0b113](https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer_004175_025219_RCP.pdf&retry=0&sys=m0b113)



## Risultati Vaccini campioni 1, 2, 3

| Priorix Tetra  | MMR vax Pro  | Measles vaccine live B.P.  |
|--|--|--|
| <p><b>Analisi del DNA</b></p> <p><b>DNA totale estratto: 1729.8 ng</b><br/>Quantità in linea (ca 2 microgrammi) con quella riscontrata per un campione di Priorix Tetra analizzato in precedenza con lo stesso metodo</p> <p>Eseguita analisi DNA-seq tramite approccio metagenomico, su un totale di 13.11 milioni di sequenze prodotte</p> <p><b>Presente DNA genomico di:</b></p> <p>Varicella <b>14%</b><br/>Pollo <b>4%</b><br/>Uomo (MRC-5) <b>78%</b></p> | <p><b>Analisi del DNA</b></p> <p><b>DNA totale estratto:</b><br/>non quantificabile con metodi fluorimetrici standard (limite di sensibilità 0.1 ng/μl).</p> <p>Eseguita analisi DNA-seq tramite approccio metagenomico, su un totale di 20.89 milioni di sequenze prodotte.</p> <p><b>Presente DNA genomico di:</b></p> <p>Pollo <b>28%</b><br/>Uomo <b>14%</b></p>   | <p><b>Analisi del DNA</b></p> <p><b>DNA totale estratto: 13.6 ng</b></p> <p>Eseguita analisi DNA-seq tramite approccio metagenomico, su un totale di 10.53 milioni di sequenze prodotte.</p> <p><b>Presente DNA genomico di:</b></p> <p>Uomo (MRC-3) <b>56%</b></p>  |
| <p><b>Analisi dell'RNA</b></p> <p>RNA totale estratto:<br/>non quantificabile con metodi fluorimetrici standard (limite di sensibilità 0.1 ng/μl)</p> <p><b>Presente RNA di:</b></p> <p>Morbillo <b>0.02%</b><br/>Parotite <b>0.22%</b><br/>Rosolia <b>0%</b><br/>Varicella <b>5.15%</b><br/>Pollo <b>0.20%</b><br/>Uomo (MRC-5) <b>89.65%</b></p>   | <p><b>Analisi dell'RNA</b></p> <p>RNA totale estratto:<br/>non quantificabile con metodi fluorimetrici standard (limite di sensibilità 0.1 ng/μl).</p> <p>Eseguita analisi RNA-seq tramite approccio metatrascrittomico, su un totale di 29.57 milioni di sequenze prodotte.</p> <p><b>Presente RNA di:</b></p> <p>Morbillo <b>8%</b><br/>Parotite <b>17.70%</b><br/>Rosolia <b>0.2%</b><br/>Pollo <b>23%</b><br/>Uomo <b>12.75%</b></p> | <p><b>Analisi dell'RNA</b></p> <p>RNA totale estratto:<br/>non quantificabile con metodi fluorimetrici standard (limite di sensibilità 0.1 ng/μl).</p> <p>Eseguita analisi RNA-seq tramite approccio metatrascrittomico, su un totale di 21.56 milioni di sequenze prodotte.</p> <p><b>Presente RNA di:</b></p> <p>Morbillo <b>15.52%</b><br/>Uomo (MRC-3) <b>35.82%</b></p> |



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

Il Priorix Tetra è il vaccino con più alta quantità di DNA estraneo contaminante (DNA totale estratto = 1729.8 ng, di cui il 78% è umano, quindi proveniente dalle cellule MRC-5, e il 4% dalle cellule embrionali di pollo); segue il Measles vaccine con 13.6 ng di cui il 56% è umano, proveniente dalle cellule MRC-3, e infine l'MMR vax Pro per il quale il DNA estratto è in quantità inferiore a 0.1 ng/ µl di cui il 28% proveniente dalle cellule di pollo e il 14% dalle cellule WI-38.

Nel vaccino Priorix Tetra il DNA genomico umano è ad alto peso molecolare (>10.000bp) e la totale copertura in sequenza dell'intero genoma umano di riferimento (HG-19) **dimostra che è l'intero genoma delle cellule fetali utilizzate per la coltura dei virus vaccinici ad essere presente e non solo porzioni di esso.**

La quantità di tale DNA è talmente alta da impedire la quantificazione fluorimetrica dell'RNA dei virus vaccinici con più basso numero di basi nucleotidiche (Rosolia, Morbillo); in MMR vax Pro, in cui il DNA genomico contaminante è sotto il limiti di rilevabilità dello strumento, è infatti possibile quantificare l'RNA dei virus vaccinali con più accuratezza.

Dalla risposta dell'EMA al nostro quesito<sup>8</sup> sui limiti imposti ai residui di materiale genetico estraneo nei vaccini risulta che di fatto non ci sono dei limiti per ciascun vaccino ma solo per alcuni, riportati nelle monografie del prodotto; **il limite massimo previsto varia da 10 pg a 10 ng**, sulla base del calcolo teorico della possibilità da parte del DNA genomico estraneo di causare mutazioni oncogeniche.

È da notare che le autorità regolatorie non richiedono che queste contaminazioni vengano testate nel prodotto finale, ma solo nella fase di preparazione iniziale, e che per i vaccini a virus attenuati la purificazione di queste contaminazioni sono un passaggio critico<sup>9</sup>. L'EMA non ha fornito studi specifici sulla pericolosità del DNA residuo fetale, che consentano di valutare il rischio per la salute umana di queste contaminazioni, perciò tale limite rimane ad oggi arbitrario.

Ne segue che per questi tre campioni solo l'MMR vax Pro risulta conforme rispetto al limite di 10 ng, mentre il Priorix Tetra risulta circa 140 volte superiore al limite massimo di 10 ng e ben 140.000 volte superiore al limite minimo di 10 pg.

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

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

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

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

<sup>8</sup> Quesito EMA: <https://www.ivancatalano.eu/wp-content/uploads/2018/05/Letter.pdf>

<sup>9</sup> [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC500003322.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003322.pdf)  
[http://www.who.int/biologicals/Cell\\_Substrates\\_clean\\_version\\_18\\_April.pdf](http://www.who.int/biologicals/Cell_Substrates_clean_version_18_April.pdf)  
<http://www.who.int/biologicals/Molecular%20Methods%20Final%20Mtg%20Report%20April2005.pdf?ua=1>  
<https://pdfs.semanticscholar.org/presentation/0be5/9f9c69baa35c0f24086936bc541809ebc6.pdf>



## Risultati Vaccini campioni 4, 5, 6, 7

### Infanrix hexa

Il saggio è stato eseguito sul DNA estratto dalla soluzione ottenuta risospendendo la polvere della fiala del vaccino con la soluzione fisiologica sterile fornita assieme ad esso.

#### Analisi del DNA

DNA totale estratto: non quantificabile con metodi fluorimetrici standard (limite di sensibilità 0.1 ng/μl).

Eseguita analisi DNA-seq tramite approccio metagenomico, su un totale di 27.28 milioni di sequenze prodotte.

#### Presente DNA genomico di:

Scimmia **4.69%**

### PoliInfanrix

Il saggio è stato eseguito sul DNA estratto dalla soluzione ottenuta risospendendo la polvere della fiala del vaccino con la soluzione fisiologica sterile fornita assieme ad esso.

#### Analisi del DNA

DNA totale estratto: non quantificabile con metodi fluorimetrici standard (limite di sensibilità 0.1 ng/μl).

Eseguita analisi DNA-seq tramite approccio metagenomico, su un totale di 23.03 milioni di sequenze prodotte.

#### Presente DNA genomico di:

Scimmia **5.14%**

### Fluad

Il saggio è stato eseguito sul DNA estratto dalla soluzione ottenuta risospendendo la polvere della fiala del vaccino con la soluzione fisiologica sterile fornita assieme ad esso.

#### Analisi del DNA

DNA totale estratto: non quantificabile con metodi fluorimetrici standard (limite di sensibilità 0.1 ng/μl).

Eseguita analisi DNA-seq tramite approccio metagenomico, su un totale di 22.48 milioni di sequenze prodotte.

#### Presente DNA genomico di:

Pollo **8%**

#### Analisi dell'RNA

RNA totale estratto: non quantificabile con metodi fluorimetrici standard (limite di sensibilità 0.1 ng/μl). Fallita analisi RNA-seq tramite approccio metatrascrittomico.

#### Analisi dell'RNA

RNA totale estratto: non quantificabile con metodi fluorimetrici standard (limite di sensibilità 0.1 ng/μl). Fallita analisi RNA-seq tramite approccio metatrascrittomico.

#### Analisi dell'RNA

RNA totale estratto: non quantificabile con metodi fluorimetrici standard (limite di sensibilità 0.1 ng/μl). Fallita analisi RNA-seq tramite approccio metatrascrittomico.

### Vivotif

#### Analisi del DNA

Il saggio è stato eseguito su DNA estratto da capsula rigide gastrointestinali, polverizzata.

DNA totale estratto: 2500 ng per compressa. Eseguita analisi DNA-seq tramite approccio metagenomico, su un totale di 1.2 milioni di sequenze prodotte.

#### Presente DNA genomico di:

Salmonella typhi Ty21a **97%**

#### Analisi dell'RNA

RNA totale estratto: **2050 ng** per compressa. Eseguita analisi RNA-seq tramite approccio metatrascrittomico, su un totale di 0.34 milioni di sequenze prodotte.

#### Presente RNA di:

Salmonella typhi Ty21a **90 %**

Uomo **8%**



## Dall'esame dei risultati ottenuti si può evidenziare quanto segue:

**Vaccini Infanrix hexa e PoliInfanrix:** il DNA virale del poliovirus (virus inattivato durante la produzione del vaccino) è in quantità al di sotto dei limiti di rilevabilità sia di strumentazioni standard (ad es. fluorimetro per rilevare la concentrazione di DNA), ma anche al di sotto della sensibilità del deep sequencing, che è il metodo allo stato dell'arte più sensibile nella rilevazione di tracce di DNA. In entrambi i vaccini sono presenti tracce di DNA di scimmia proveniente dalla linea cellulare Vero.

**Vaccino Fluad:** presenta tracce di DNA proveniente dalla linea cellulare di pollo

**Vaccino Vivotif:** per motivi non spiegabili presenta l'8% di DNA umano

## Analisi delle Varianti Genetiche

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

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

### Campione 1. - Priorix Tetra

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

### Campione 2. - Measles vaccine live B.P.

Il genoma del virus del **morbillo** contenuto nel vaccino ha mostrato sei mutazioni rispetto al ceppo virale **Edmonston Zagreb** presente nelle banche dati pubbliche con il numero di accessione AF266290.1.

### Campione 3. - MMR vax Pro

- 1) Il genoma del virus del **morbillo** contenuto nel vaccino è identico alla sequenza del **ceppo Edmonston Swartz** depositato nelle banche dati avente numero di accessione AF266291.1. Il numero di varianti rilevate è stato infatti pari a 0
- 2) Il genoma del virus della **parotite** contenuto nel vaccino è risultato identico alla sequenza del ceppo virale **Jeryl-Lynn** depositato nelle banche dati, avente numero di accessione AF338106.1. Il numero di varianti rilevate è stato infatti pari a 0;
- 3) Il genoma del virus della **rosolia** contenuto nel vaccino è identico alla sequenza del **ceppo Wistar RA 27/3** depositato nelle banche dati avente numero di accessione FJ211587. Il numero di varianti rilevate è stato infatti pari a 0;

### Campione 7. - Vivotif

Il genoma batterico contenuto nel vaccino ha mostrato 154 mutazioni rispetto alla sequenza di Salmonella typhi Ty21a (numero di accessione in NCBI NC\_021176.1), dichiarata nelle banche dati pubbliche come sequenza del ceppo vaccinale.

La sequenza degli antigeni/genomi virali è un dato strettamente confidenziale che non viene fornito dall'EMA. Non sono disponibili

linee guida che regolamentano l'analisi delle mutazioni genetiche e lo studio degli effetti sulla salute umana.

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

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

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

**NOTE:** i documenti originali sono materiale protetto da contratto di riservatezza con il laboratorio di analisi. Tutta la documentazione sarà allegata agli esposti che l'Associazione Corvelva presenterà tramite i propri legali.



Allegato 1.

**TABELLA NUMERO DI VARIANTI RILEVATO**

| <b>Genoma di riferimento<br/>(NCBI Accession Number)</b>             | <b>1. Priorix<br/>Tetra lot.<br/>A71CB205A</b> | <b>2. Measles<br/>vaccine live<br/>B.P.lot. B.N.<br/>001M7001A</b> | <b>3. MMR vax<br/>Prolot.<br/>N023345</b> | <b>4. Infanrix<br/>hexa lot.<br/>A21CD072D</b> | <b>5. PoliInfanri<br/>x lot.<br/>AC20B351B<br/>C</b> | <b>6. Flud lot.<br/>170901<br/>(influenza<br/>stagione<br/>2017/2018)</b> | <b>Vivotif<br/>ceppo<br/>Ty21a lot.<br/>3003187 #</b> | <b>11. H2O<br/>CTRL NEG.</b> |
|--|--|--|---|--|--|---|---|------------------------------|
| <b>Morbillo Edmonston Swartz<br/>(AF266291.1)</b>                    | 0  | 43 (13)  | 0 (18)                                    | non eseguito                                   | non eseguito   | non eseguito  | non<br>eseguito                                       | 0*                           |
| <b>Morbillo Edmonston Zagreb<br/>(AF266290.1)</b>                    | 39 (2)   | 6 (14)   | 42 (10)                                   | non eseguito                                   | non eseguito   | non eseguito  | non<br>eseguito                                       | 0*                           |
| <b>Morbillo Edmonston Enders<br/>(Morten) (FJ211583.1)</b>           | non<br>eseguito                                | non<br>eseguito  | 0 (18)                                    | non eseguito                                   | non eseguito   | non eseguito  | non<br>eseguito                                       | 0*                           |
| <b>Parotite_JERYL-<br/>LYNN_major_component<br/>(AF338106.1)</b>     | 1 (28)   | 0*   | 0 (322)                                   | non eseguito                                   | non eseguito   | non eseguito  | non<br>eseguito                                       | 0*                           |
| <b>Parotite_JERYL-<br/>LYNN_minor_component JL2<br/>(AF345290.1)</b> | 411 (26)                                       | 0*   | 76 (356)                                  | non eseguito                                   | non eseguito   | non eseguito  | non<br>eseguito                                       | 0*                           |
| <b>Rosolia Wistar RA 27/3 (FJ211587)</b>                             | 0*   | 0*   | 0 (22)                                    | non eseguito                                   | non eseguito   | non eseguito  | non<br>eseguito                                       | 0*                           |
| <b>Varicella Human herpesvirus 3<br/>(AB097932.1)</b>                | 4 (28)   | non<br>eseguito  | non eseguito                              | non eseguito                                   | non eseguito   | non eseguito  | non<br>eseguito                                       | non<br>eseguito              |
| <b>Tifo Salmonella typhi Ty21a<br/>(NC_021176.1)</b>                 | non<br>eseguito                                | non<br>eseguito  | non eseguito                              | non eseguito                                   | non eseguito   | non eseguito  | 154 (16)  | non<br>eseguito              |

# Vivotif, lot. 3003187 (Composizione: Salmonella typhi Ty21a, ceppo vivo attenuato, produttore PaxVax, Regno Unito), chiamata di varianti eseguita su dati di metagenomica DNA-seq prodotti nel 2017 per lo stesso committente.

\* l'organismo non è presente

(ulteriori varianti putative, da confermare)

11. Controllo negativo (acqua bidistillata sterile)

