



**EMENDAMENTO SOSTITUTIVO all' EMENDAMENTO SOSTITUTIVO
MOZIONE N. 230/25**

Necessità di immediate misure di protezione civile

**È dimostrato che i nascituri sono esposti a una sostanza tossica che
uccide le cellule**

È in atto una riduzione della popolazione

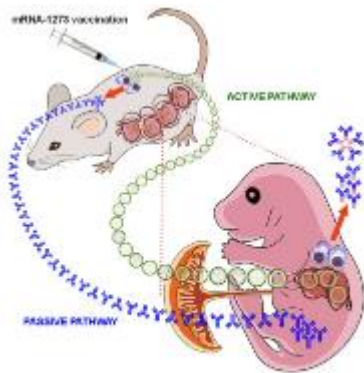
I peggiori timori sono stati confermati: i cosiddetti "vaccini" Covid-19 a base di modRNA (e i "vaccini" a base di modRNA in generale) raggiungono il feto in brevissimo tempo dopo l'iniezione ed espongono il nascituro alla produzione incontrollata della proteina *spike*, una tossina dannosa.

Uno studio *peer-reviewed* conferma ciò che gli esperti hanno affermato fin dall'inizio: i nanolipidi iniettati con i cosiddetti "vaccini" Covid-19 a base di modRNA, in cui è racchiuso l'RNA modificato, superano facilmente la barriera placentare e, negli esperimenti sugli animali, raggiungono il feto entro un'ora, si accumulano nei suoi organi e sviluppano in modo incontrollato in tutte le cellule del feto la tossica proteina *spike* che porta alla morte cellulare.

Si confermano così i peggiori timori.

[https://www.cell.com/molecular-therapy-family/nucleic-acids/pdf/S2162-2531\(25\)00043-5.pdf](https://www.cell.com/molecular-therapy-family/nucleic-acids/pdf/S2162-2531(25)00043-5.pdf)

(doc. 1.1 Studio in versione originale inglese, doc. 1.3 Studio tradotto in lingua italiana).



Ciò spiega anche il forte aumento, registrato dal 2021 nei paesi con un alto "tasso di copertura vaccinale" contro il Covid-19, del numero di aborti indesiderati, mortalità neonatale, malformazioni e infertilità.

Ciononostante, **il Ministero della Salute italiano e le autorità sanitarie locali, compreso l'Azienda Sanitaria dell'Alto Adige, continuano a raccomandare la cosiddetta "vaccinazione" Covid-19 alle donne incinte, nel periodo post-partem e alle donne in allattamento.**

<https://assets-eu-01.kc-usercontent.com/4f9976d6-18d1-018a-8c6e-05612fd6b893/d71c8595-21d6-4e68-82b3-706967dbedc8/gruppi-a-rischio-covid-19.pdf>

(doc. 2.2)

Il 6 settembre 2025 è stato pubblicato su PubMed (la banca dati online del *National Institute of Health* del governo degli USA) l'articolo scientifico che ha destato grandissima preoccupazione a livello mondiale, redatto da tre eminenti

scienziati statunitensi, che dimostra che i **due cosiddetti “vaccini” contro il Covid-19 a base di mRNA modificato - Comirnaty di Pfizer/BioNTech (attualmente somministrato anche alle donne in gravidanza in Sudtirolo-Alto Adige/Italia) e Spikevax di Moderna - contengono da miliardi a centinaia di miliardi di molecole di DNA per dose. Entrambe le sostanze superano da 36 a 627 volte le linee guida stabilite dalla FDA e dall'OMS per il DNA residuo di 10 ng/dose. Inoltre, la sostanza Comirnaty di Pfizer/ BioNTech, supera il limite legale per il promotore-*enhancer* SV40, che è noto per essere altamente cancerogeno e viene iniettato negli animali da laboratorio per produrre cellule tumorali al fine di testare farmaci antitumorali, poiché è associato a una serie di tumori maligni nell'uomo** (doc.3.1. Testo originale in inglese doc.3.3. Traduzione in lingua italiana).

Dai risultati ora pubblicati su PubMed emerge che i **cosiddetti “vaccini” Covid-19 a modRNA sono genotossici, cancerogeni e mutageni, ovvero possono alterare il genoma umano, poiché non si può interpretare diversamente l'enorme quantità di residui di DNA e il superamento del limite consentito del promotore-*enhancer* SV40, noto per essere altamente cancerogeno.**

E l'uso su donne in gravidanza di una sostanza con un enorme potenziale di genotossicità, cancerogenicità e mutagenicità (alterazione del genoma umano) è ancora raccomandato dall'Azienda sanitaria dell'Alto Adige e dal Ministero della Salute.

Ci troviamo di fronte a una situazione di emergenza civile che richiede l'immediata sospensione dell'uso di queste sostanze sperimentali, in particolare sulle donne in gravidanza, in allattamento e su tutta la popolazione in età fertile!

Il Sudtirolo/Alto Adige ha la competenza primaria in materia di protezione civile.

E il Sudtirolo/Alto Adige è responsabile della selezione e dell'applicazione conforme alla legge dei vaccini o di ciò che in contrasto con la composizione e il modo di azione viene dichiarato come tale.

Come risulta direttamente dalla documentazione di autorizzazione, **queste sostanze sperimentali prima della loro autorizzazione non sono mai state testate, tra l'altro, in punto genotossicità, carcinogenicità e mutagenicità, e le donne in gravidanza sono state escluse a priori dagli studi clinici in generale estremamente scarsi ed infine interrotti.**

Ora si moltiplicano anche le pubblicazioni di scienziati e docenti universitari italiani che in relazione ai cosiddetti "vaccini" Covid-19 parlano di sostanze sperimentali che non avrebbero mai dovuto essere somministrate alla popolazione senza studi approfonditi pluriennali. Si veda ad esempio l'articolo scientifico del docente Lorenzo Alibardi, docente presso la Facoltà di Biologia dell'Università di Bologna (doc. 4.1 nella versione originale inglese e doc. 4.3 nella traduzione in italiano):

<https://www.macrothink.org/journal/index.php/jbls/article/view/22643/17430>.

Gli articoli scientifici del direttore del Centro per la Salute Globale dell'Istituto Superiore di Sanità, nonché le sue dichiarazioni rese nel corso della conferenza stampa tenutasi il 4 dicembre 2024 nella sala di rappresentanza di questo Consiglio Provinciale, con cui il dott. M. Federico ha sottolineato la scarsa efficacia ma l'alto rischio dei "vaccini" Covid-19 a base di modRNA, sono già noti a questo Consiglio Provinciale.

All'inizio di agosto 2025, il Segretario/Ministro della Salute statunitense Robert Kennedy Jr. ha reso pubblico che gli Stati Uniti non intendono più affidarsi alla

tecnologia modRNA per prevenire le infezioni da virus respiratori, poiché comporta più rischi che benefici.

Di conseguenza, sono stati rescissi i contratti con i produttori di vaccini contro il Covid-19 e l'influenza basati sulla tecnologia modRNA.

Si veda qui la dichiarazione ufficiale del Segretario/Ministro della Salute statunitense Robert Kennedy Jr. sul canale X del Ministro della Salute statunitense

<https://x.com/seckennedy/status/1952851097019633766?s=12&t=2WLHtMNPGoerBa1r6tR77w>

e per tutti coloro che non sono su X, qui:

https://drive.google.com/file/d/1UOhzbfUWiursc_LLdj7hSRCiq29g_rmM/view?usp=drivesdk

Questa decisione è stata preceduta da un appello rivolto ai governi di tutto il mondo da parte di un gran numero di scienziati e medici di fama internazionale, che hanno chiesto il ritiro dal mercato dei cosiddetti "vaccini" Covid-19 a base di modRNA.

Si veda a questo proposito la pubblicazione scientifica *peer-reviewed* del cardiologo statunitense di fama internazionale Peter A. McCulloch (il più prolifico autore al mondo nel suo campo), dell'epidemiologo statunitense Nicolas Hulscher e della dottoressa statunitense Mary T. Bowden (doc. 5.1. nella versione originale inglese, doc. 5.3. nella traduzione italiana).

https://www.researchgate.net/publication/388452414_Review_Calls_for_Mark_and_Removal_of_COVID-19_Vaccines_Intensify_as_Risks_Far_Outweigh_Theoretical_Benefits

Nella loro panoramica degli studi internazionali, gli scienziati dimostrano che l'uso dei cosiddetti vaccini Covid-19 ha portato a un aumento della mortalità,

che queste sostanze sperimentali basate sull'ingegneria genetica hanno un'efficacia negativa, presentano elevate contaminazioni o residui di DNA e che i rischi superano di gran lunga i benefici teorici.

Per le donne incinte (e i bambini), gli Stati Uniti sotto la nuova amministrazione hanno già revocato la raccomandazione della vaccinazione Covid-19 nel maggio 2025, mentre in Sudtirolo/Alto Adige, e in Italia in generale, continua a essere raccomandata alle donne incinte la cosiddetta "vaccinazione" Covid-19.

Si veda qui la dichiarazione del Segretario/Ministro della Salute degli Stati Uniti sulla revoca della raccomandazione per le donne incinte relativa al cosiddetto "vaccino" Covid-19 il 27.05.2025 su X

<https://x.com/seckennedy/status/1927368440811008138?s=12&t=2WLHtMNPGoerBa1r6tR77w>

e per chi non è su X, ecco il video corrispondente:

https://drive.google.com/file/d/1qV-blfOJei0pz2AaoL_tU0geoRzA6Q-B/view?usp=drivesdk

I risultati di un nuovo studio (ancora in fase di *peer-review*) **pubblicato da eminenti scienziati israeliani e statunitensi** dei centri di ricerca BRI e MIT, delle università di Tel Aviv e Gerusalemme (tra cui Retsef Levi, membro del nuovo comitato consultivo della FDA - *Food & Drug Administration* - USA) (doc. 6.1. versione originale in inglese, doc. 6.3. traduzione in italiano) **forniscono indicazioni preoccupanti su un tasso più elevato del previsto di aborti involontari in relazione alle "vaccinazioni" modRNA-COVID-19 somministrate durante la fase iniziale della gravidanza (settimane 8-13).**

Lo studio si riferisce a 226.000 gravidanze nel periodo dal 2016 al 2022. Nel periodo compreso tra il 1° marzo 2020 e il 28 febbraio 2022, 94.251 donne incinte hanno ricevuto una cosiddetta vaccinazione Covid-19 a base di modRNA tra l'ottava e la

tedicesima settimana di gravidanza. Il numero di aborti osservati è stato superiore del 50% rispetto agli aborti previsti e si è attestato a 13 aborti indesiderati ogni 100 gravidanze. In oltre il 90% dei casi, le donne hanno ricevuto il cosiddetto "vaccino" Covid-19 Comirnaty di Pfizer/BioNTech (attualmente in uso anche in Sudtirolo/Alto Adige) e il resto Spikevax di Moderna.

Nello studio, gli scienziati sottolineano anche che le donne incinte sono state escluse dagli studi clinici, già di per sé scarsi e interrotti prematuramente, prima dell'approvazione dei cosiddetti studi Covid-19.

La proteina *spike* è stata trovata nel cordone ombelicale.

I feti sono quindi esposti alla tossina citotossica e cancerogena insieme alle donne incinte.

Infatti, nella documentazione di autorizzazione, la Commissione Europea sottolinea che mancano informazioni specifiche per l'uso su donne in gravidanza e in allattamento e che ci si basa esclusivamente su studi condotti su animali. Nel RISK MANAGEMENT PLAN si sottolinea espressamente che mancano informazioni sull'uso in gravidanza e nelle donne che allattano (vedi pagina 187 dell'RMP nella sua versione attuale nel doc. 7).

https://www.ema.europa.eu/en/documents/rmp/comirnaty-epar-risk-management-plan_en.pdf

Poiché in Italia la pubblicazione dei dati dettagliati da parte dell'ISS e dell'AIFA lascia molto a desiderare, e gli Stati Uniti, sotto la precedente amministrazione, hanno perseguito una "politica vaccinale" contro il Covid-19 aggressiva e analoga a quella praticata in Italia, si fa qui riferimento a dati ufficiali e valutazioni molto significativi del CDC.

I dati del CDC mostrano un aumento della mortalità neonatale dopo un decennio di calo (miglioramento dell'igiene, ecc.) dall'inizio della "vaccinazione di massa" contro il Covid-19.

<https://www.cdc.gov/nchs/data/nvsr/nvsr74/nvsr74-07.pdf>

(vedi doc. 8)

In una pubblicazione su "The Ethical Skeptic" (doc. 9)

<https://theethicalskeptic.com/2025/08/19/houston-we-have-another-problem/>

che ha suscitato grande interesse e consenso tra gli scienziati, sulla base dei dati ufficiali del CDC vengono fornite le seguenti indicazioni estremamente preoccupanti:

"Questo grafico tratto dal [National Vital Statistics Reports Volume 74, Numero 7, 10 giugno 2025, Infant Mortality in the United States, 2023](#), mostra la mortalità infantile per 1.000 nati vivi in un periodo di quasi tre decenni. Fino al 2021, i tassi di mortalità erano in costante calo, grazie ai progressi nell'assistenza sanitaria materna, nella neonatologia e ai miglioramenti socioeconomici. Tuttavia, il periodo a partire dal 2021 mostra un'interruzione di questa continuità trentennale: invece di continuare a diminuire, i tassi di mortalità neonatale e post-neonatale si discostano bruscamente dalla tendenza precedente e mostrano un andamento completamente nuovo.

Figure 1. Infant, neonatal, and postneonatal mortality rates: United States, 1995–2023

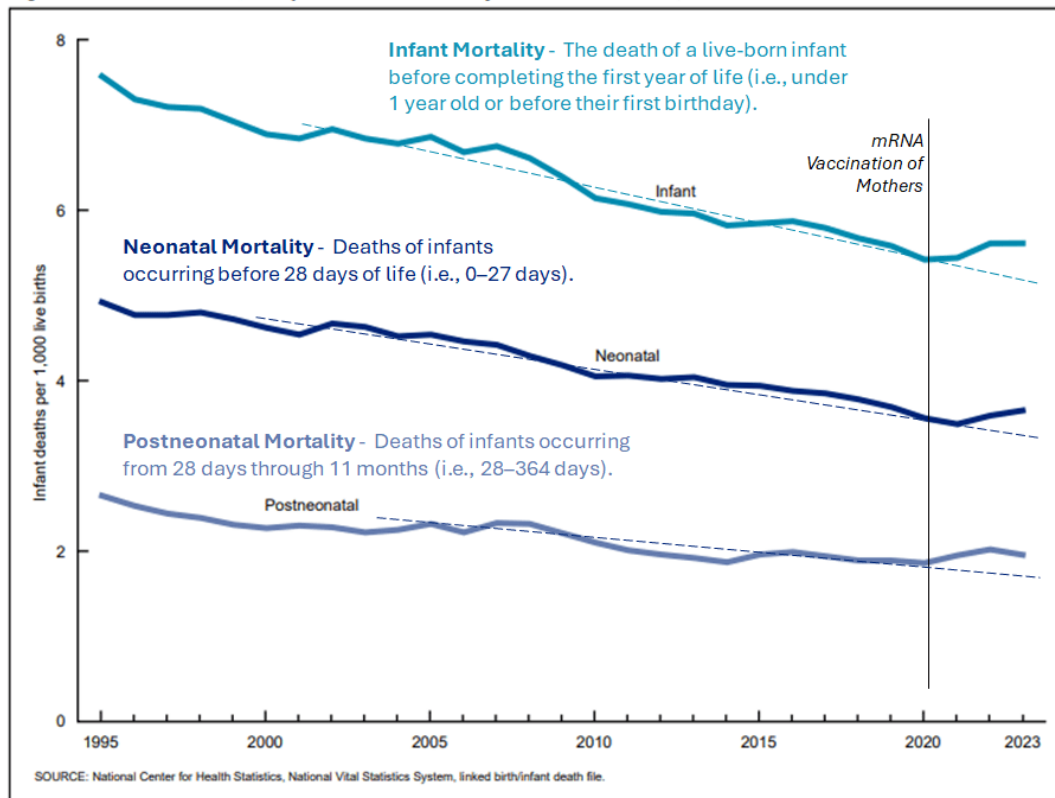


Grafico 1 – Rapporti nazionali sulle statistiche demografiche, volume 74, numero 7, 10 giugno 2025 Mortalità infantile negli Stati Uniti – Il periodo successivo alla vaccinazione con modRNA contro il Covid-19 mostra una rottura in una continuità trentennale: invece di continuare a diminuire, i tassi di mortalità neonatale e post-neonatale si discostano bruscamente dalla tendenza precedente e mostrano un andamento completamente nuovo. (Nota: le definizioni dei termini, la linea di demarcazione per i vaccini a modRNA e le linee di tendenza tratteggiate sono state aggiunte dall'autore di questo articolo).

Il segno verticale indica l'introduzione della vaccinazione a modRNA non solo alle donne in gravidanza, ma anche alle future mamme nel periodo [compreso tra febbraio e giugno 2021](#). L'interruzione del trend coincide con questa misura, il che suggerisce possibili effetti teratogeni. Sebbene una correlazione temporale non sia prova di un meccanismo, l'inversione di decenni di progressi giustifica un'indagine critica.

Il potenziale teratogeno indica la possibilità di causare morbidità o mortalità congenita in soggetti esposti in utero. Si riferisce a tutti i principi attivi o fattori che durante la gravidanza possono causare malformazioni, disturbi dello sviluppo o deficit funzionali in un embrione o feto. Nel contesto dei vaccini a modRNA, le preoccupazioni si concentrano sul trasferimento di istruzioni sintetiche di modRNA e sulle loro conseguenze biologiche attraverso la barriera placentare, dove tali esposizioni possono essere codificate nello sviluppo embrionale e fetale.

Potenziale transgenerazionale/epigenetico (generazione vaccinale) indica la possibilità di provocare cambiamenti biologici in termini di salute, sviluppo o rischio di malattia in generazioni che non sono mai state esposte direttamente all'agente originale. A differenza delle mutazioni genetiche, questi effetti sono causati da meccanismi epigenetici ereditari, come la metilazione del DNA, la modificazione degli istoni o l'RNA non codificante, che alterano l'espressione genica attraverso le generazioni. Nel contesto dei vaccini a modRNA, le preoccupazioni si concentrano sul passaggio delle istruzioni sintetiche dell'modRNA e sulle loro conseguenze biologiche attraverso il ciclo ovarico, ovocitario e zigotico della donna, dove le esposizioni che interessano le cellule germinali possono essere codificate nello sviluppo embrionale e trasmesse alla prole.

Grafici 2 e 3: Tutte le cause naturali di morte nella generazione vaccinata (età 0-4 anni)

Qui sono riportate le deviazioni della mortalità rispetto alla linea di base prevista per i bambini nati dopo la vaccinazione della madre e della candidata madre. Il persistere di questa deviazione fino a un periodo in cui oltre il 90% della popolazione statunitense non ha ricevuto ulteriori vaccinazioni a modRNA indica che **l'effetto non è limitato all'esposizione durante la gravidanza**. Ciò indica piuttosto un **effetto delle vaccinazioni precedenti nelle donne che sono rimaste incinte in un secondo momento, suggerendo che il rischio va oltre l'esposizione durante la gravidanza e include anche coloro che stanno semplicemente pianificando una gravidanza**.

I dati provengono dal CDC WONDER ed escludono tutti i decessi direttamente attribuibili al Covid-19. Il breve aumento alla fine del 2019 e all'inizio del 2020 riflette un effetto "dry-fuel" (esplosivo a secco), ovvero un aumento della mortalità in gruppi di popolazione già a rischio, che si è verificato in un momento in cui il virus non era ancora stato ufficialmente rilevato o riconosciuto come arrivato negli Stati Uniti. A ciò segue un sottile effetto pull forward (PFE), visibile nei dati di varianza degli otto mesi successivi. Nessuno di questi due artefatti del 2020 è stato incorporato nell'orientamento di base del grafico, che, come il lettore noterà, rimane ancorato al periodo più stabile del 2018-2019.

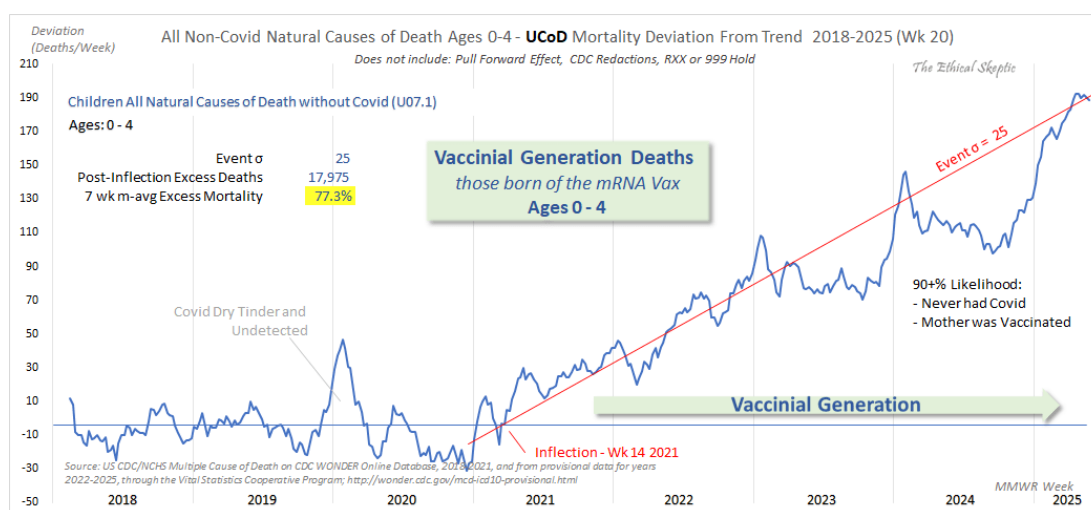


Grafico 2 - Tutte le cause naturali di morte tra 0 e 4 anni (nati da madri vaccinate in qualsiasi momento) - In questa coorte si sono verificati complessivamente 18.565 decessi in più, con uno scostamento del 76,7% rispetto alla tendenza precedente in questa classe di mortalità. A differenza delle categorie più ristrette di neonati nel grafico 1, questo grafico include tutte le nascite avvenute dopo l'introduzione del vaccino a modRNA.

Da notare nell'analisi di sensibilità: se la coorte viene estesa di un altro anno (età 5), il grafico rimane sostanzialmente invariato, dimostrando che l'effetto è specificamente limitato alla generazione le cui madri sono state precedentemente esposte al vaccino a modRNA. In altre parole, non si tratta di un effetto residuo del Covid-19.

Metodi e considerazioni sui dati

Il segnale più importante: un *punto di svolta* nella settimana 14 del 2021, subito dopo la vaccinazione di massa degli adulti in età fertile. Da quel momento in poi, la mortalità totale tra i bambini di età compresa tra 0 e 4 anni aumenta costantemente, raggiungendo una deviazione standard di $\sigma = 24$, ovvero 18.565 decessi in più (76,7% in più rispetto al valore iniziale). L'aumento non è un rumore casuale, ma è sistemico e riguarda diverse categorie di morbidità. Di particolare importanza e preoccupante è il fatto che, in una sintesi differenziata dei dati Wonder per periodo di tempo, la dinamica dei gruppi ICD riflette la stessa dinamica degli effetti della vaccinazione con modRNA nei soggetti adulti che ricevono la prima dose:

Mortalità in eccesso secondo un ampio raggruppamento ICD (aumento parallelo della mortalità negli adulti vaccinati):

1. Funzionalità renale (+135%)
2. Meningite (+112%)
3. Suscettibilità ai virus e alla sepsi (+90%)
4. Disturbi epatici/digestivi (+82%)
5. Disturbi respiratori (+54%)
6. Malformazioni congenite (+51%)
7. Malattie cardiache e polmonari (+38%)
8. Sindrome nervosa/epilettica (+37%)

Mortality Group	2018/19	2023/24	Diff	%Diff
Respiratory Diseases and Failure	1994	3075	1081	54%
Congenital Malformations	1296	1958	662	51%
Cardiopulmonary Disorders	1585	2192	607	38%
Increase in Susceptibility to Narcotics	147	711	564	384%
Virus and Septicaemia Susceptibility	517	982	465	90%
Other ill-defined and unspecified causes of mortality	465	899	434	93%
Epilepsy and Nervous Related	1154	1585	431	37%
Increase in Susceptibility to Non-fatal Submersion Eve	883	1206	323	37%
Disorders of Liver and Digestive Tract	251	458	207	82%
Renal Function Related	135	317	182	135%
Asphyxia and Respiratory Arrest	304	377	73	24%
Menengitis (various)	25	53	28	112%

Parallels the same excess mortality breakout as is currently observed in mRNA-vaccinated adults

Diagramma 3 – Mortalità in eccesso secondo un'ampia classificazione ICD – ordinata in base alle differenze nel tasso di mortalità grezzo prima e dopo l'introduzione della vaccinazione.

I dati qui presentati per il 2023/24 sono provvisori per diversi motivi. Non è stata ancora presa in considerazione la mortalità "999" a sei mesi e sono stati inclusi i codici ICD R00-

R99 (altre cause di morte non specificate e non meglio definite), poiché circa la metà di questa categoria è ancora in attesa di essere assegnata a codici ICD specifici per il 2023/24. Inoltre, questa analisi si basa sulla codifica della causa di morte sottostante (UCoD) e non sulla codifica delle cause multiple di morte (MCoD) per evitare duplicazioni dei dati.

Nel loro insieme, questi fattori indicano che i dati complessivi per il 2023/24 sottostimano quasi certamente l'entità effettiva dell'eccesso di mortalità in quel periodo, ma anche in questa forma conservativa i dati rimangono allarmanti rispetto al valore di riferimento del 2018/19, soprattutto in una coorte di mortalità che aveva registrato un calo significativo nei 30 anni precedenti. Tuttavia, la classifica stessa rimane provvisoriamente valida, poiché riflette l'impatto relativo tra le diverse categorie di cause di morte.

Questi raggruppamenti ICD rappresentano 7.600 decessi, pari al 41% della mortalità in eccesso riportata nella figura 2 sopra. L'impatto sui bambini non ancora nati non è quindi trascurabile, ma piuttosto ampio e si estende a diversi ambiti fisiologici. Un tale modello è più coerente con vulnerabilità ereditarie o impresse durante la gravidanza che con anomalie isolate, il che suggerisce disturbi epigenetici o alterazioni della linea germinale. **Non si tratta semplicemente di un effetto teratogeno su un singolo bambino, ma di un'eco transgenerazionale che risuona in migliaia di persone.**

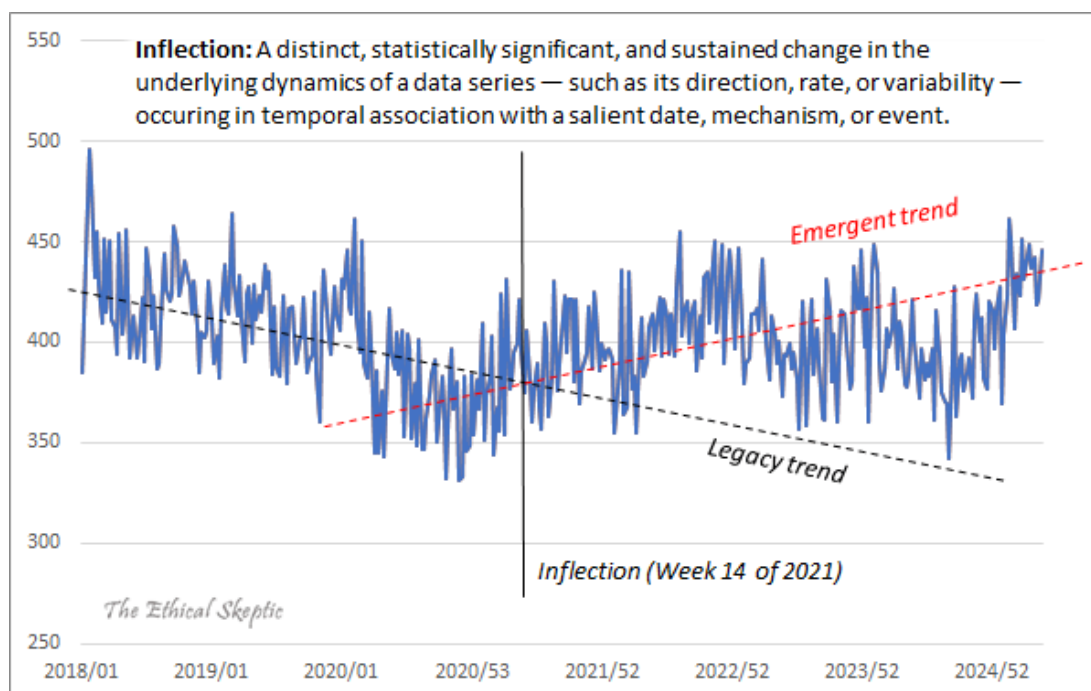
Il fatto che questi dati siano associati ad [un aumento dei tassi di mortalità negli adulti vaccinati con modRNA](#) è particolarmente allarmante.

Grafico 4: Che cos'è un'inflessione (grafico DFT)?

Un'inflessione è un cambiamento significativo (un contributo discreto, improvviso, limitato, pronunciato e chiaro), statisticamente significativo e persistente nella dinamica sottostante di una serie di dati - come la direzione, il tasso o la variabilità - che si verifica in relazione temporale con una data, un meccanismo o un evento significativo. **I trend di mortalità sono stati in calo per molto tempo, ma dopo il 2021 la tendenza si è improvvisamente invertita.**

L'analisi della deviazione dalla tendenza (DFT) filtra le fluttuazioni stagionali e le variazioni di fondo per rendere visibile il segnale sottostante. Questo metodo è spesso utilizzato in settori con una forte stagionalità, ad esempio nella previsione dei beni di consumo, dove serve a identificare improvvisi

picchi di domanda che si nascondono dietro cicli prevedibili legati alle festività o all'inizio dell'anno scolastico. In questo caso, mostra l'inizio dell'aumento della mortalità della "generazione vaccinale" come una chiara deviazione dai modelli precedenti. Senza la DFT, tali anomalie possono essere mascherate dalla media, dalla regressione lineare o dall'annualizzazione, tecniche che livellano i segnali e inducono a considerarli "rumore casuale", una tattica fin troppo spesso utilizzata dai sostenitori della narrativa farmaceutica guidati da un'agenda.



Il grafico 4 - punto di svolta per tutte le cause naturali di morte tra 0 e 4 anni (nati da madri vaccinate in qualsiasi momento) - mostra una chiara demarcazione nella settimana 14 del 2021, così come centinaia di altri grafici di deviazione (DFT) che abbiamo pubblicato.

Conclusione

Tali eventi di morbilità e mortalità raramente rimangono limitati a "casi rari"; nel corso del tempo si manifestano nell'intera popolazione dei destinatari, anche se con gravità variabile. Ad esempio, l'esposizione all'amianto non ha causato mesotelioma in tutti i lavoratori, ma nessuna

esposizione è rimasta senza conseguenze: alcuni hanno sofferto di disturbi respiratori, altri di infiammazioni croniche e altri ancora di malattie incurabili. **È solo la nostra tendenza al "pregiudizio della maglietta rossa" – ovvero considerare le prime vittime come sacrificabili o anomale – che ci permette di ignorare o marginalizzare la dissonanza di tali segnali.**

Pregiudizio di invulnerabilità o "errore della maglietta rossa"

Quando una persona presume erroneamente che le lesioni possano verificarsi solo a un gruppo limitato di persone (quelle che indossano le proverbiali "magliette rosse" di Star Trek) e non a se stessa.

Allo stesso modo, le prove qui presentate sollevano due problemi di portata storica:

Teratogenicità: i tassi di mortalità tra neonati, lattanti e bambini, nessuno dei quali è stato esposto al Covid-19 o al vaccino a modRNA, sono aumentati dopo decenni di costante declino, in coincidenza con l'introduzione di massa della vaccinazione a modRNA nelle donne in gravidanza e nelle future madri.

Effetto intergenerazionale: i bambini nati dopo l'introduzione mostrano una mortalità eccessiva persistente in diverse aree fisiologiche, un modello che corrisponde a un disturbo biologico sistemico. È allarmante che questi effetti corrispondano esattamente ai disturbi documentati negli adulti vaccinati direttamente con il vaccino modRNA Covid-19.

Questi segnali richiedono un'indagine immediata, trasparente e coraggiosa. Ignorarli significa non solo negare i dati, ma anche giocare incautamente con la salute dei vivi e dei nascituri.”

Oltre al fatto che **negli Stati Uniti la raccomandazione della cosiddetta "vaccinazione" Covid-19 è stata revocata sotto la nuova amministrazione nel maggio 2025 per le donne in gravidanza, un gruppo di lavoro dell'ACIP (Advisory Committee on Immunization Practices) presieduto dallo scienziato statunitense del MIT Resef Levi (vedi sopra), ha ricevuto dal Dipartimento della**

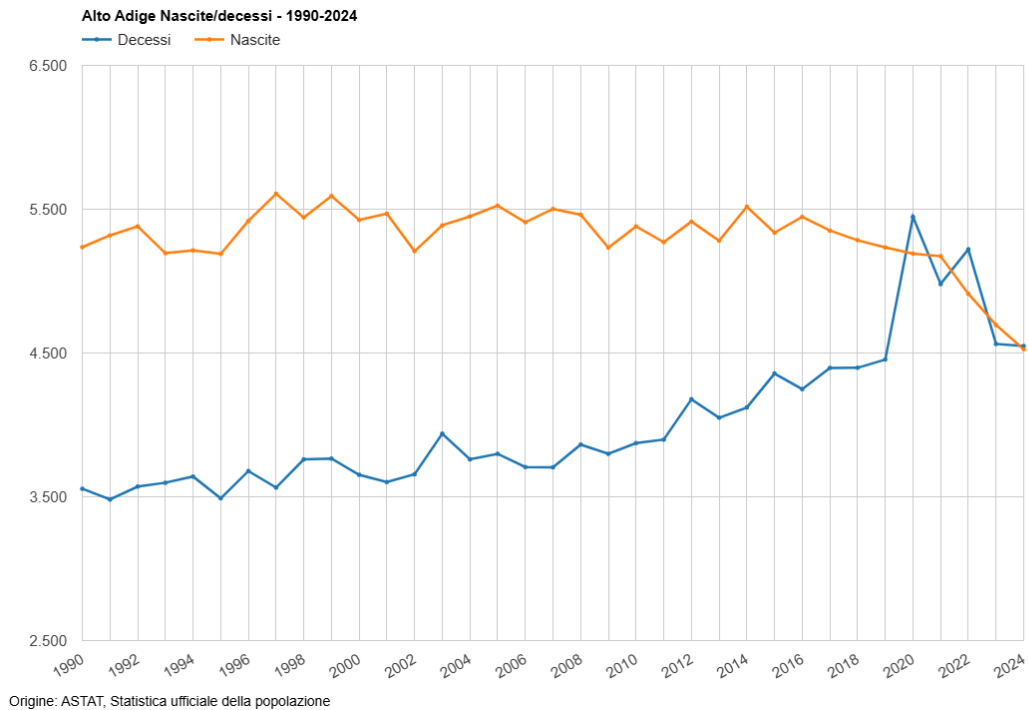
Salute degli Stati Uniti (HHS) l'incarico di effettuare una valutazione complessiva/revisione generale dei "vaccini" Covid-19.

L'investimento del governo statunitense nella tecnologia a modRNA per le malattie virali respiratorie (Covid-19 e influenza) è già stato sospeso con la motivazione che questa tecnologia comporta più rischi che benefici in questo campo (vedi sopra).

È molto probabile che negli Stati Uniti sia imminente la sospensione generale della campagna di vaccinazione con modRNA per le malattie virali respiratorie (Covid-19, influenza, ecc.).

Anche in Italia/Alto Adige è noto che dal 2022 si registra un calo particolarmente forte delle nascite (in Italia/Alto Adige la vaccinazione di massa della generazione in età fertile è iniziata solo nell'estate del 2021). Ciò non può essere spiegato solo con problemi economici e sociologici (che esistevano già negli anni precedenti).

Purtroppo non sono disponibili analisi dettagliate sugli aborti spontanei in Italia/Alto Adige.



Inoltre, è noto che determinati tipi di tumori maligni sono aumentati significativamente dall'inizio della cosiddetta campagna "vaccinale"-Covid-19.

Iniettare in donne incinte sostanze che contengono enormi residui di plasmidi di DNA e un contenuto di promotore SV-40 che supera di gran lunga il limite consentito, significa - come è stato dimostrato - esporre il feto, nel quale avviene un processo di divisione cellulare particolarmente rapido e delicato, a un enorme rischio genotossico, cancerogeno e mutageno irresponsabile.

A causa degli effetti disastrosi di queste sostanze sperimentali sul nostro tasso di natalità e lo sviluppo tumorale, e quindi sullo sviluppo della popolazione e la sua salute, è necessario agire immediatamente a livello locale, nell'ambito delle possibilità offerte, in particolare esercitando le possibilità che ci sono concesse dalla nostra autonomia.

Da qui la mia proposta di delibera:

Per questi motivi, il Consiglio della Provincia Autonoma di Bolzano obbliga la Giunta provinciale, sulla base delle più recenti conoscenze scientifiche e dell'evidente stato di emergenza civile

- 1) nell'ambito della competenza primaria in materia di protezione civile, a sospendere immediatamente in via precauzionale la raccomandazione della "vaccinazione" Covid-19 per le donne in gravidanza, in periodo post-partem e in allattamento**
- 2) nell'ambito della sua competenza primaria in materia di protezione civile, a sospendere immediatamente in via precauzionale la "vaccinazione" Covid-19 della popolazione in età fertile**
- 3) in persona del Presidente della Provincia, a chiedere subito alla Presidente del Governo ai sensi dell'art. 12 della legge n. 400 del 23.08.1988 di voler convocare con urgenza la Conferenza permanente per le relazioni tra lo Stato, le regioni e le province autonome al fine di**
 - 3.1. deliberare con urgenza la necessaria revoca della raccomandazione della cosiddetta "vaccinazione" Covid-19 per le donne in gravidanza, in periodo post-partem e in allattamento**
 - 3.2. decidere urgentemente la sospensione generale della "vaccinazione" Covid-19 per la popolazione in età fertile**
 - 3.3. provvedere all'urgente e necessaria valutazione dettagliata e alla pubblicazione dei dati relativi agli aborti spontanei - suddivisi per trimestre di gravidanza o settimana nel rispettivo anno dal**

2021 e separatamente per donne trattate con il "vaccino" Covid-19 e quelle non trattate



Avv. DDr. Renate Holzeisen
Membro del Consiglio della Provincia Autonoma di Bolzano
Gruppo VITA – Gruppo Consiliare VITA

mRNA-1273 is placenta-permeable and immunogenic in the fetus

Jeng-Chang Chen,^{1,2} Mei-Hua Hsu,^{3,4} Rei-Lin Kuo,^{5,6,7} Li-Ting Wang,⁶ Ming-Ling Kuo,^{7,8} Li-Yun Tseng,⁹ Hsueh-Ling Chang,⁹ and Cheng-Hsun Chiu^{3,4}

¹School of Medicine, College of Medicine, Chang Gung University, Taoyuan 333, Taiwan; ²Division of Pediatric Surgery, Department of Surgery, Chang Gung Memorial Hospital, Taoyuan 333, Taiwan; ³Division of Pediatric Infectious Diseases, Department of Pediatrics, Chang Gung Memorial Hospital, Taoyuan 333, Taiwan; ⁴Molecular Infectious Disease Research Center, Chang Gung Memorial Hospital, Taoyuan 333, Taiwan; ⁵Department of Medical Biotechnology and Laboratory Science, College of Medicine, Chang Gung University, Taoyuan 333, Taiwan; ⁶Research Center for Emerging Viral Infections, College of Medicine, Chang Gung University, Taoyuan 333, Taiwan; ⁷Division of Allergy, Asthma, and Rheumatology, Department of Pediatrics, Chang Gung Memorial Hospital, Taoyuan 333, Taiwan; ⁸Department of Microbiology and Immunology, Graduate Institute of Biomedical Sciences, College of Medicine, Chang Gung University, Taoyuan 333, Taiwan; ⁹Pediatric Research Center, Chang Gung Memorial Hospital, Taoyuan 333, Taiwan

COVID-19 mRNA vaccines are generally recognized as safe for gestational administration. However, their transplacental pharmacokinetics remain obscure. In this study, mRNA-1273 intramuscularly given to pregnant mice rapidly circulated in maternal blood and crossed the placenta within 1 h to spread in the fetal circulation. Although spike mRNA in fetal circulation faded away within 4–6 h, it could accumulate in fetal tissues, mainly the liver and get translated into spike protein. Transplacental mRNA-1273 proved immunogenic in the fetuses, as postnatally equipped with anti-spike immunoglobulin (Ig)M, paternal allotypic anti-spike IgG_{2a}, and heightened anti-spike cellular immunity. Gestationally administered, mRNA-1273 had a dose-dependent effect on its transplacental transfer and immunogenicity in the fetuses, with higher mRNA-1273 doses leading to increased transplacental mRNA-1273 passage and greater serum titers of endogenous anti-spike IgM/IgG generated by the fetuses. Thus, gestationally maternal mRNA-1273 vaccination might endow the newborns with not only passive but also active anti-spike immunity. Our results pose new insights into transplacental capacity of mRNA vaccines and their immunogenic potential in the fetuses, advancing our knowledge of mRNA medicine to protect the unborns against pathogens in perinatal life and broaden our horizons of prenatal mRNA molecular therapy.

INTRODUCTION

The two next-generation vaccines of Moderna mRNA-1273¹ and BioNTech BNT162b2,² based on SARS-CoV-2 spike protein-encoding mRNA strands packaged in lipid nanoparticles (LNPs),³ have been widely used during and after the COVID-19 pandemic. They conferred over 90% efficacy against COVID-19 with a favorable safety profile in adults.^{1,2} However, heightened pharmacovigilance pertaining to potential or unexpected embryotoxic/fetotoxic effects of brand-new medical products administered during pregnancy precluded gravid women from mRNA-LNP vaccination at

the outset⁴ even though COVID-19 during pregnancy tended to pose a higher risk for maternal or neonatal complications.⁵ Since accumulated clinical data and observations supported the safety of mRNA vaccines for the mother and fetus,⁵ mRNA-LNP vaccination prior to⁶ or during pregnancy⁷ has been highly recommended. However, the pharmacokinetics of mRNA-LNPs in gravid females remains shrouded in clouds, especially as to their transplacental capacity. Although LNPs were reported to enable *in vivo* vascular endothelial growth factor mRNA delivery to the placenta accompanied by its vasodilation,⁸ neither vaccine mRNA nor mRNA-decoded spike protein could be detected in the placenta⁹ and cord blood¹⁰ sampled 2 days at least and mostly over weeks or even months after final maternal BNT-162b2 or mRNA-1273 vaccination. It brought to the notion that the placenta acted as the natural barrier to mRNA-LNPs, providing additional reassurance about the safety of mRNA vaccines during pregnancy. However, it was reported that mRNA-LNPs were swiftly cleared from the circulation during the first 24 h with the time required for 50% decrement of mRNA-LNP concentration ($T_{1/2}$) in a range of 2.7–3.8 h,¹¹ implicating that transplacental mRNA-LNP transfer, if any, would most likely occur within 24 h after maternal vaccination. Moreover, mRNA-LNPs administered intravenously in fetal¹² or adult animals¹³ underwent rapid systemic spread with preferential LNP accumulation and peak mRNA functionality in the liver within 4 h followed by decreasing protein levels at 24 h after injection or translation ceasing on day 2. Taken together, it seemed premature to negate transplacental mRNA-LNP transfer on the basis of undetectable vaccine mRNA or its products in belatedly collected fetal blood or placenta that was even not favorable to harboring mRNA-LNPs or spike proteins. We conducted this murine study

Received 6 September 2024; accepted 13 February 2025;
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2025.102489>.

Correspondence: Cheng-Hsun Chiu, Department of Pediatrics, Chang Gung Memorial Hospital, No. 5, Fu-Shin Street, Kweishan, Taoyuan 333, Taiwan.

E-mail: chchiu@adm.cgmh.org.tw



to reappraise the transplacental capacity of mRNA-1273 and scrutinize its immunogenicity in the fetuses.

RESULTS

Detection of transplacental polyethylene glycol lipid

Following a single-dose intramuscular injection of 4 μ g mRNA-1273 into gestational day 14 (GD14) pregnant mice, the fetuses were delivered and euthanized at selected time points to search fetal blood for transplacental LNPs, using anti-polyethylene glycol (PEG) antibodies. PEGylated LNPs swiftly moved into the maternal bloodstream and efficiently crossed the placenta to spread in fetal circulation within 30 min (Figure 1A). However, they faded away in maternal circulation within 3–24 h but lasted over time in the fetal circulation for at least 7 days, indicating slower PEG breakdown in the fetuses than the dams. Further enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) confirmed that PEG levels stayed steady in fetal sera within 3 h after maternal 4 μ g mRNA-1273 vaccination, and dropped significantly at 6-h and 1- to 3-day time points (Figure 1B). PEG in the offspring's sera was barely found on days 7–11 post-maternal vaccination, and no longer detectable by days 14–18. There was no detectable PEG in fetal placenta, liver, and soft tissues by ELISA at any of the time points examined (data not shown). Notably, a reduction of maternal mRNA-1273 doses caused a decline in serum PEG levels in the fetuses within 3 h after maternal vaccination (Figure 1C).

Detection of transplacental spike mRNA

We then examined whether transplacental LNP transfer was coupled with vaccine active substance of SARS-CoV-2 spike mRNA by reverse transcription PCR (RT-PCR) (Figure S1). After maternal intramuscular vaccination of 4 μ g mRNA-1273, spike mRNA entered the maternal circulation and crossed the placenta to fetal blood within 1 h, whereas transplacental spike mRNA shortly became undetectable in fetal circulation by 4–6 h (Table S1). Thus, spike mRNA was more liable to degradation than PEG in fetal blood. Transplacental spike mRNA mainly accumulated in fetal livers, and also dwelt in fetal placentas and trunk soft tissues (Figure 1D; Table S1). Spike mRNA might persist in offspring's liver and spleen at least until postnatal 3 weeks (Table S1). Notably, immunofluorescence staining demonstrated the lodging of PEGylated LNPs and spike protein in fetal liver cells (Figure 1E). Taken together, transplacental mRNA-1273 transfer came along with mRNA-decoded protein expression in the fetus. In dams vaccinated with 0.2 μ g mRNA-1273, vaccine mRNA also rapidly spread to the maternal circulation, accrued to the placenta, and distributed to the fetus (Table S2). Although levels of spike mRNA in fetal placentas did not differ between 0.2 and 4.0 μ g mRNA-1273 administered to the dams, low-dose mRNA-1273 gave rise to less spike mRNA accumulation in fetal livers than high-dose ones (Figure 1F). Overall, transplacental mRNA-1273 transfer exhibited a maternally dose-dependent response, with higher maternal mRNA-1273 doses resulting in greater levels of PEG in the circulation and spike mRNA in the liver of the fetus. However, comparable levels of spike mRNA in fetal placentas between high- and low-dose mRNA-1273 given to the dams might suggest placental trapping of mRNA-1273 before reaching the fetus.

Examination of anti-spike IgG₁/IgG_{2a} with their virus-blocking efficacy

To elucidate the immunological consequences of transplacental mRNA-1273 transfer in the fetus, we scrutinize the influence of mRNA-1273 doses given intramuscularly to pregnant mice on serum anti-spike immunoglobulin levels of dams and pups. After maternal mRNA-1273 vaccination at the same dose of 0.2, 1.0, 2.0, or 4.0 μ g on GD14 and GD17, the dams and their pups were examined for serum anti-spike immunoglobulin (Ig) levels 1 month after delivery. The vaccinated mothers significantly generated anti-spike IgG₁/IgG_{2a} in the absence of a dose-responsive fashion, ranging respectively around 100–200 ng/mL and 20–40 μ g/mL with relatively steady levels over a postnatal period of 3 months (Figure 2A). However, mRNA-1273 given to pregnant mice exerted a dose-dependent effect on offspring's serum anti-spike IgG₁/IgG_{2a} levels, which showed a dwindling trend over time (Figure 2B). Virus-blocking efficacy of maternal sera was as high as 1024- to 2048-fold dilutions at least within postnatal 2–3.5 months, whereas the pup's sera at 2 months old had lower neutralization activity, which even vanished by 3.5 months old (Figure 2C). It was essentially consistent with the distinct durability of serum anti-spike IgG between the dams (Figure 2A) and their offspring (Figure 2B). The discordance between the first month anti-spike IgG₁/IgG_{2a} levels of mothers and their offspring in response to mRNA-1273 doses used to vaccinate the dams might have relevance to transplacental mRNA-1273 transfer in a maternally dose-dependent manner (Figures 1C and 1F; Tables S1 and S2). It called into question whether transplacental mRNA-1273 transfer was not only maternally dose-dependent but also exerted a dose-dependent effect on triggering the fetal immune system to generate endogenous anti-spike IgG.

Analyses of anti-spike IgG_{2a} allotypes in offspring

Investigations proceeded to assess the derivation of the offspring's anti-spike IgG_{2a} after maternal mRNA-1273 vaccination, using two allelic forms (Igh-1a and Igh-1b) of the Igh-1 (IgG_{2a}, γ 2a constant region). The mouse BALB/c strain possesses the IgG_{2a} of Igh-1a haplotype, whereas the C57BL/6 strain belongs to the Igh-1b haplotype. C57BL/6 females were mated to BALB/c males, and then given 4 μ g mRNA-1273 vaccination respectively on GD14 and GD17. Postnatally, the offspring (BALB/c male $\times$ C57BL/6 female, F1) co-expressed both Igh-1a and Igh-1b haplotypes of anti-spike IgG_{2a} at the age of 4 weeks despite fading-out of the Igh-1a haplotype by 8 weeks old (Figures 3A and 3B; Table S3). It provided the direct molecular evidence that the offspring were equipped with endogenous anti-spike IgG_{2a}, which could not originate from anything other than the offspring's B cell clones selectively expressing paternal Igh-1 allotype. Clearly, the offspring born to dams with gestational mRNA-1273 vaccination had been immunized by spike protein and additionally armed with endogenous anti-spike IgG. Incidentally, serum anti-spike IgG_{2a} of all C57BL/6 dams, mated to BALB/c males, was found to contain Igh-1a haplotype of fetal origin (Table S3), indicating a reverse direction of fetal-to-maternal anti-spike IgG_{2a} transfer. Thus, transplacental IgG transfer could be bidirectional. When gestational C57BL/6 dams were vaccinated with 0.2 μ g

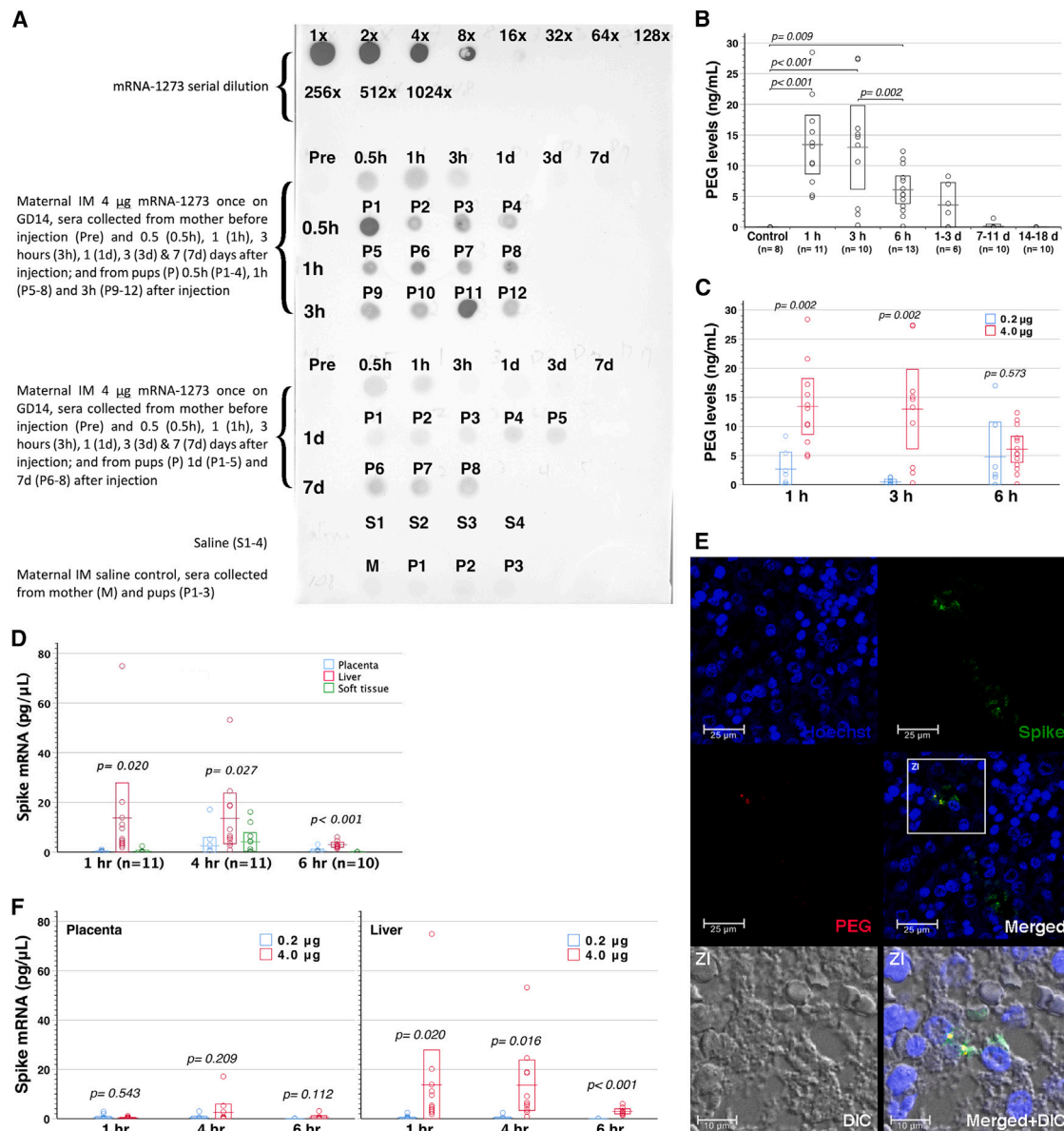


Figure 1. Transplacental mRNA-1273 transfer after maternal mRNA-1273 vaccination during pregnancy

(A) GD14 FVB/N mothers, intramuscularly (IM) vaccinated with a single-dose mRNA-1273 of 4.0 μ g, were subjected to serum collection before vaccination (Pre), and at indicated time points of 0.5–3 h and 1–7 days after injection. Their pups were delivered for serum sampling at the same time points. Immunodot blot assay demonstrated transplacental PEGylated LNP transfer. (B) ELISA disclosed that fetal sera contained significantly higher PEG levels at the time points of 1 h, 3 h, and 6 h after maternal mRNA-1273 vaccination than those with maternal saline injection (control), ANOVA with least significant difference (LSD) multiple comparison). A significant decrease of serum PEG levels occurred between 3 h and 6 h. Although PEG remained measurable in certain pups of groups 1–3 d and 7–11 d, their mean levels did not differ from that of saline controls. On days 14–18, PEG was completely absent in all neonatal sera, identical to saline controls. (C) At the time points of 1 h and 3 h following maternal vaccination, 4.0 μ g mRNA-1273 led to higher PEG levels in fetal sera than a dose of 0.2 μ g. (D) Spike mRNA in fetal placenta, liver, and soft tissue was quantified by RT-PCR after maternal 4 μ g mRNA-1273 vaccination (dams 234, 235, and 236 in Table S1). Spike mRNA levels of “(–)” and “< 0.021” were input as “0” and “0.021,” respectively in building this chart. Spike mRNA significantly dominated in fetal liver of groups 1, 4, and 6 h (ANOVA with LSD multiple comparison). (E) Immunostaining disclosed intracellular PEGylated LNPs and spike protein in fetal liver 6 h after maternal 4.0 μ g mRNA-1273 vaccination. DIC: differential interference contrast. ZI: zoom-in. (F) At the time points of 1, 4, and 6 h after maternal mRNA-1273 vaccination, levels of spike mRNA in fetal placentas did not differ between 4.0 and 0.2 μ g mRNA-1273 used to vaccinate the dams (Tables S1 and S2), whereas 4.0 μ g mRNA-1273 led to significantly greater spike mRNA accumulation in fetal livers than 0.2 μ g mRNA-1273. Error bar charts display the boxed areas of 95% confidence intervals for the means as box-crossing horizontal lines.

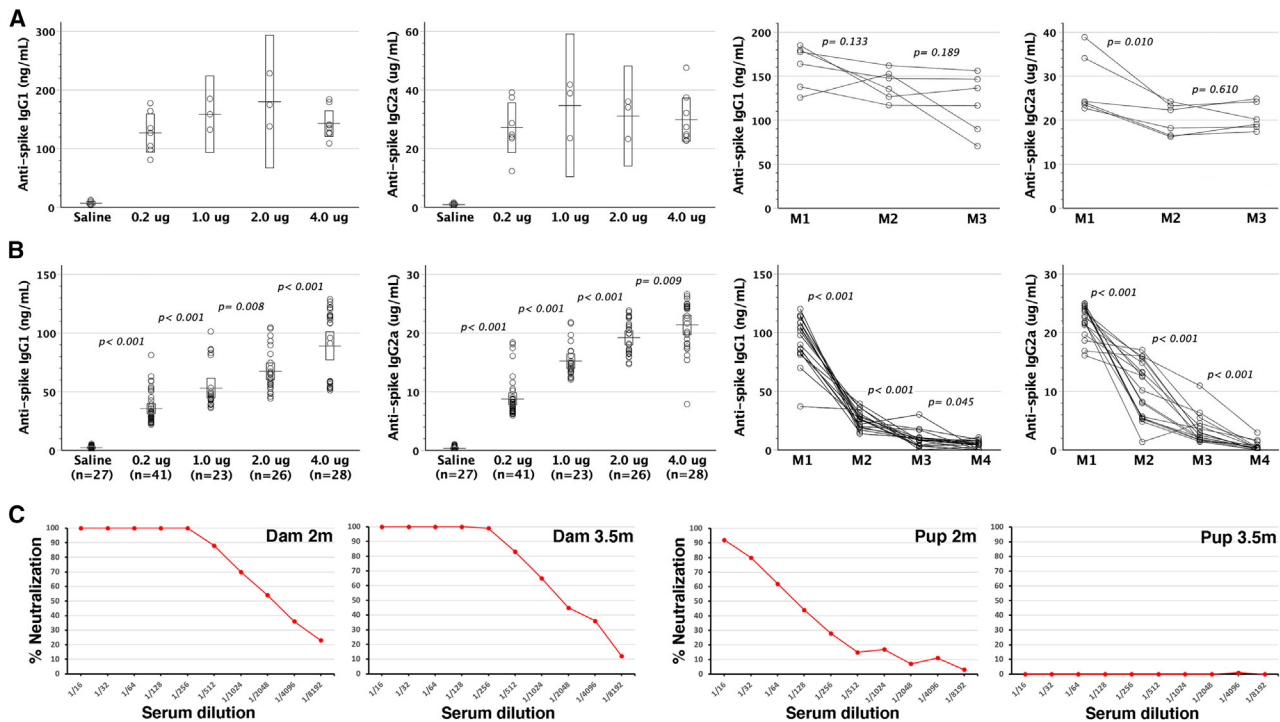


Figure 2. Anti-spike IgG₁/IgG_{2a} with virus-blocking efficacy in dams and their offspring after gestational mRNA-1273 administration

Pregnant FVB/N mice were intramuscularly vaccinated by the same doses of mRNA-1273 (0.2, 1, 2, or 4 μ g) on GD14 and GD17. (A) One month after delivery (M1), all four mRNA-1273 doses elicited significant levels of serum anti-spike IgG₁/IgG_{2a} in dams and (B) pups ($p < 0.001$, ANOVA), as compared with their saline controls. There were dose-responsive anti-spike IgG₁/IgG_{2a} levels in pups rather than dams (multiple comparisons by Fisher's LSD post hoc test). The dams ($n = 6$) kept steady anti-spike IgG₁/IgG_{2a} titers in sera within postnatal 3 months (M1–M3) except for an initial drop of anti-spike IgG_{2a} levels ($p = 0.010$, pairwise comparison) at M2, whereas anti-spike IgG₁/IgG_{2a} in pups' sera ($n = 18$) gradually faded away by M3–M4. The interconnected circles at different time points were the data of IgG₁/IgG_{2a} levels collected from an individual mouse. (C) Virus-blocking efficacy of maternal and offspring sera was evaluated by pseudovirus neutralization assays and shown in a representative mother and its offspring. Postnatal 2- and 3.5-month maternal sera had the neutralization titers of 2048- and 1024-fold dilutions, respectively, whereas neutralization activity of offspring sera was 64-fold at 2 months old but vanished by 3.5 months old. Error bar charts display the boxed areas of 95% confidence intervals for the means as box-crossing horizontal lines.

mRNA-1273 twice, their offspring barely generated anti-spike IgG_{2a} of Igh-1a haplotype despite high titers of Igh-1b allotypic anti-spike IgG_{2a} in sera (Figure 3C; Table S4). These results pointed to a dose-responsive relationship between mRNA-1273 doses used to vaccinate the dams and serum titers of endogenous anti-spike IgG in the fetuses. As a consequence, mRNA-1273 had a maternally dose-dependent effect on not only its transplacental capacity but also its immunogenicity as to the productivity of endogenous anti-spike IgG in the fetuses.

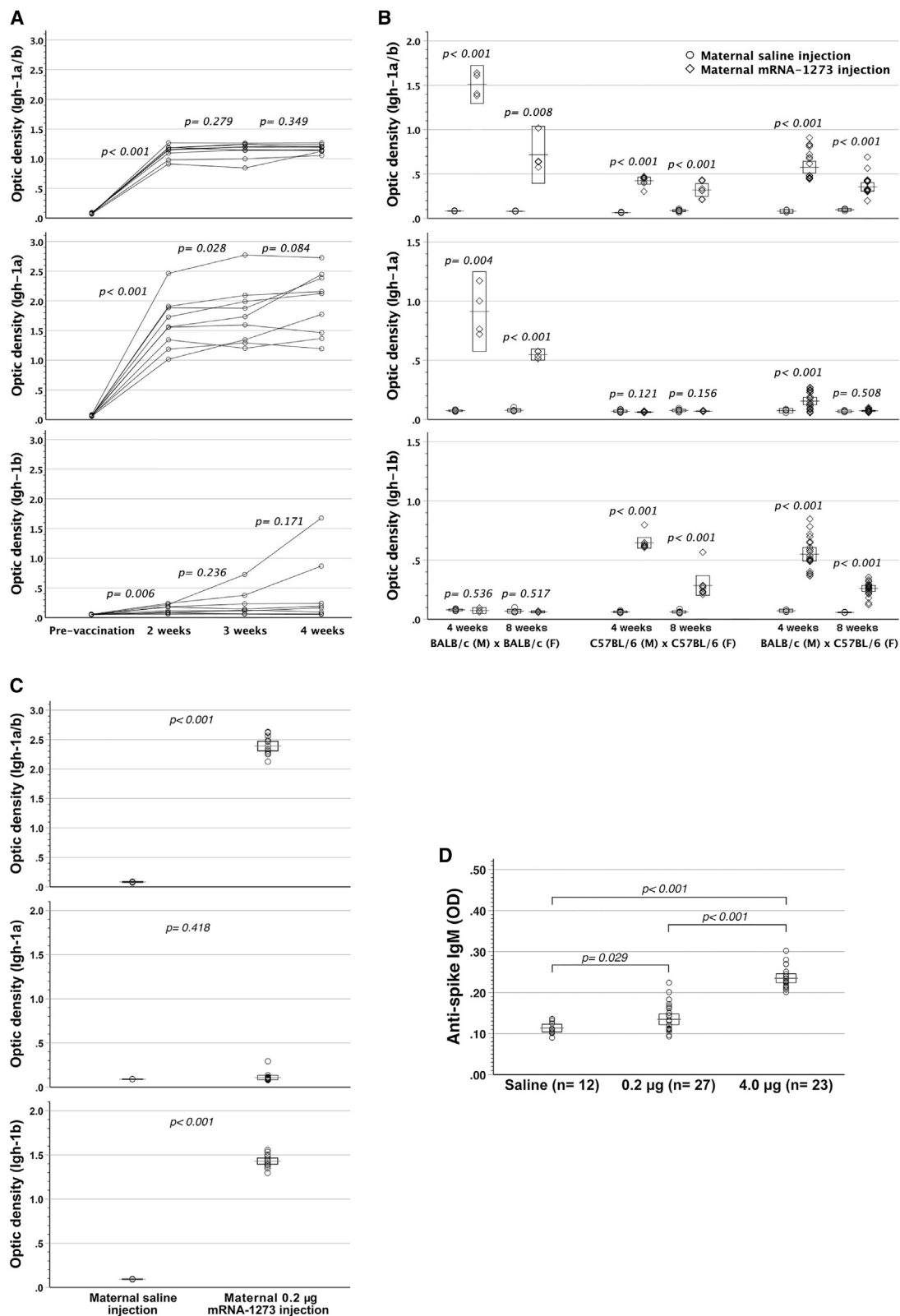
Assessment of anti-spike IgM and cellular immunity

Being placenta-impermeable, anti-spike IgM in offspring was measured to reconfirm fetal immunization by transplacental mRNA-1273. Maternal vaccination with either 0.2 or 4.0 μ g mRNA-1273 gave rise to heightened anti-spike IgM levels in offspring by the age of 4 weeks (Figure 3D). High-dose mRNA-1273 led to higher serum titers of fetal anti-spike IgM than low-dose ones. Vaccinated dams and their offspring were further examined for cellular immunity to spike protein by the readout of incorporated tritium into lymphocytes. Both compared favorably in spike protein-specific

lymphocyte proliferation (Figures 4A and 4B) with their respective saline control counterparts. Additionally, spike-reactive interferon (IFN)- γ - and interleukin (IL)-2-secreting T cells were enumerated by enzyme-linked immunospot assay (ELISpot), proving at significantly heightened frequencies as opposed to their saline controls (Figures 4C and 4D). Altogether, maternal mRNA-1273 vaccination during pregnancy might trigger adaptive immunity against spike protein in dams and their pups.

Immunological outcome of direct fetal exposure to mRNA-1273

To further validate the immunogenic effects of mRNA-1273 on pre-immune fetuses, we directly subjected GD14 murine fetuses to intraperitoneal mRNA-1273 injection. Postnatally, fetal recipients exhibited heightened titers of serum anti-spike IgG₁/IgG_{2a} (Figures 5A and 5B), which decreased gradually within the postnatal 3 months. Their lymphocytes also proliferated specifically in response to SARS-CoV-2 spike protein (Figure 5C) in association with a heightened frequency of spike-reactive IFN- γ and IL-2-secreting T cells (Figure 5D). These results signified fetal immunoreactivity to



(legend on next page)

mRNA-1273 administered *in utero* even before full T cell development.

DISCUSSION

Maternal mRNA COVID-19 vaccination during pregnancy offered a “two-for-one” deal to protect mothers as well as their infants.⁷ This added infant protection has long since been attributed to transplacental transfer of vaccine-elicited maternal anti-spike antibodies,^{4,7} likened to maternal vaccination against influenza, tetanus, diphtheria, and pertussis.¹⁴ In this study, murine placentas proved permeable to mRNA-1273 along with mRNA-decoded spike protein translation in GD14 murine fetuses, which lacked functionally competent T cells as murine T cell receptors were not expressed until GD17.¹⁵ However, vertical mRNA-1273 transmission made maternal mRNA-1273 vaccination immunogenic rather than tolerogenic in developing fetuses. It is in line with an immunization event arising after artificial fetal exposure to foreign peptides,^{16,17} wherein fetal macrophages sequestered endocytosed antigens and differentiated toward dendritic cells to instruct well-developed T cells later on in life.¹⁶ Thus, the developing immune system of fetuses born to mothers with gestational mRNA-1273 vaccination still had an active role in protecting against pathogens.

Mammalian placentas are categorized into epitheliochorial, endo-theriochorial, and hemochorial types on the basis of the cell layers intervening between maternal and fetal circulations,¹⁸ known as interhemal barriers that influence placental permeability of animal species. Both humans and mice possess hemochorial placentas with similar cell types of placental trophoblasts^{19,20} to mediate materno-fetal exchange. Hemochorial placentation lacks interhemal barriers of uterine endometrium (including its epithelia, stroma, and vascular endothelia), leading to direct immersion of fetal trophoblast layers in maternal blood. It benefits bio-substance exchange between mothers and their fetuses by providing direct access of fetal trophoblasts to maternal blood.²¹ In light of the identical interhemal barriers in the placenta, the mouse model should be appropriate for simulating placental exchange of bio-substances in humans. However, one should exercise caution in extrapolating the findings of transplacental mRNA-1273 transmission from this murine study to human subjects since there is a distinction in histoarchitectures between murine and human placentas, evidenced by three-layered trophoblasts (hemotrichorial) at the murine materno-fetal interface in contrast to one-layered syncytiotrophoblast (hemomonochorial) of human placenta.²⁰ It remained unclear

whether the two extra trophoblast layers in murine placentas exerted negative or positive impacts on materno-fetal exchange of bio-substances, let alone mRNA-1273. This murine study demonstrated that mRNA-1273 possessed the dose-dependent transplacental capacity in gravid dams and exhibited immunogenic potential in the fetuses. These findings urge the need to reappraise transplacental capacity of mRNA-LNPs and clarify the status of immunoreactivity to spike protein in human fetuses or infants with gestational maternal mRNA COVID-19 vaccination. The information obtained will have a profound influence on the COVID-19 vaccination strategy in infants born to gestationally vaccinated mothers.

mRNA vaccines exhibited good safety profiles in humans^{1,2} and even pregnant individuals.^{22–24} However, the positive safety outcomes in the clinical arena could not alleviate the apprehensions about the potential genotoxicity such as genome integration, oncogenesis, or germline transmission,^{25–27} which was fueled by enduring biodistribution of vaccine mRNA^{28,29} or its product^{30,31} in post-marketing studies. These inconvenient findings somewhat reflected the rapid marketing authorization of mRNA vaccines with incomplete preclinical studies due to the urgent health needs in the face of a public health crisis caused by the COVID-19 pandemic.²⁵ This murine study filled the void in transplacental pharmacokinetics of mRNA vaccines, which has been missing in preclinical studies even though mRNA vaccines themselves involved several new biotechnologies. In this research, mRNA-1273 did not pose discernible safety issues in pregnant mice and their pups. However, the proof of transplacental mRNA-1273 transmission with enduring mRNA retention in the offspring's liver or spleen inevitably aroused an interest in the genotoxic effects of mRNA vaccines on the developing fetus, where heightened activities of cell multiplication and specialization potentially created genomic instability^{32,33} to render the fetus vulnerable to the integration of exogenous genetic elements.^{34,35} Considering the occurrence of SARS-CoV-2 RNA retro-integration into the human cell genome,²⁶ the risk of long-term genotoxicity in the offspring born to mRNA-vaccinated mothers cannot be overlooked.

Given the success of mRNA COVID-19 vaccines and today's biotech landscape, there is a prospect of extending mRNA-LNP technology to the genetic diseases with defective/missing proteins or enzymes such as cystic fibrosis, propionic acidemia, and

Figure 3. Analyses of anti-spike IgG_{2a} allotypes and anti-spike IgM in offspring born to the dams with gestational mRNA-1273 vaccination

(A) After mRNA-1273 vaccination, BALB/c (Igh-1a) × C57BL/6 (Igh-1b) F1 mice ($n = 9$) significantly secreted anti-spike IgG_{2a} (Igh-1a/b) in sera within 2–4 weeks (pairwise comparison). Igh-1a haplotype dominated the allotypes of anti-spike IgG_{2a}. (B) C57BL/6 females (F) mated to BALB/c males (M) were vaccinated with 4 μ g mRNA-1273 twice on GD14 and GD17. Both paternal Igh-1a and maternal Igh-1b allotypic anti-spike IgG_{2a} significantly showed up in BALB/c (M) × C57BL/6 (F) F1 mice at 4 weeks old ($p < 0.001$) despite undetectable paternal Igh-1a allotype by 8 weeks old ($p = 0.508$). (C) In the case of 0.2 μ g mRNA-1273 vaccination in C57BL/6 pregnant mice, BALB/c × C57BL/6 F1 offspring ($n = 17$) did not compare favorably in serum anti-spike IgG_{2a} of Igh-1a ($p = 0.418$) with their saline controls ($n = 5$) but owned significantly higher levels of Igh-1b ($p < 0.001$) allotype than the controls by their age of 4 weeks. (D) After maternal vaccination with either 0.2 or 4.0 μ g mRNA-1273 twice, offspring showed significantly heightened levels of serum anti-spike IgM by their age of 4 weeks, as compared with the controls with maternal saline injection. Besides, 4.0 μ g mRNA-1273 given to the dams elicited higher serum titers of anti-spike IgM in offspring than 0.2 μ g mRNA-1273 ($p < 0.001$). OD: optic density at 450 nm. Error bar charts display the boxed areas of 95% confidence intervals for the means as box-crossing horizontal lines.

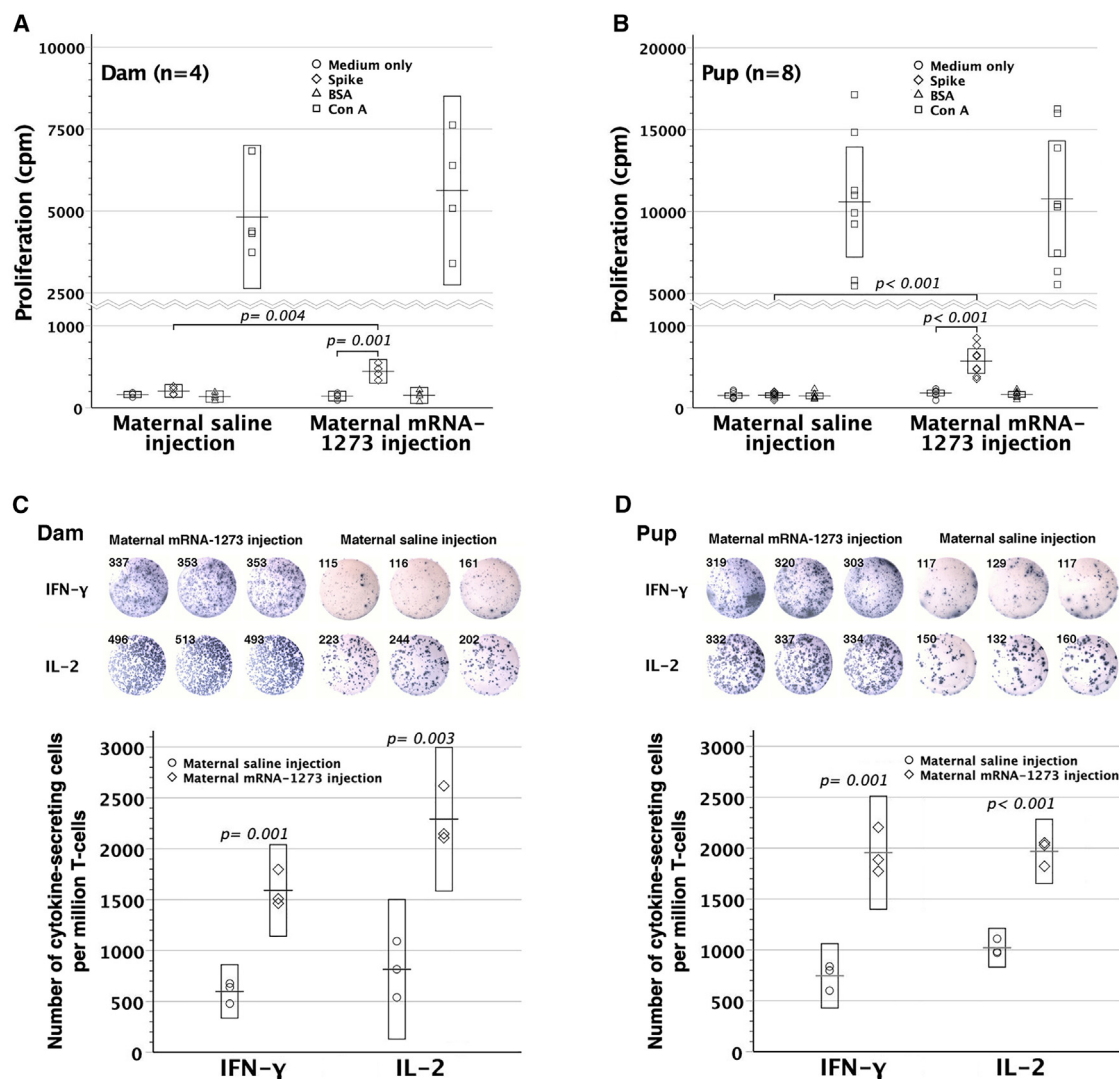


Figure 4. Anti-spike cellular immunity in dams and their pups after maternal mRNA-1273 vaccination during pregnancy

(A and B) After maternal vaccination with 4 μ g mRNA-1273 twice, the dams and pups were examined for spike-specific lymphocyte proliferation by the readout of incorporated tritium *in vitro*. Splenic lymphocytes of both dams ($p = 0.001$) and pups ($p < 0.001$) proliferated specifically in response to spike, as opposed to those with maternal saline injection. Besides, the dams ($p = 0.004$) and pups ($p < 0.001$) with maternal mRNA-1273 vaccination were superior in spike-specific lymphocyte proliferation to their respective saline controls. Bovine serum albumin (BSA) was the third-party stimulators, and Con-A was a mitogen to non-specifically stimulate T cells. (C and D) IFN- γ - and IL-2 ELISpot images in triplicate shown were from a representative dam and pup with maternal mRNA-1273 (4 μ g) or saline vaccination during pregnancy. Both groups exhibited heightened frequencies of IFN- γ - and IL-2-secreting T cells, as compared with their respective control counterparts. Error bar charts display the boxed areas of 95% confidence intervals for the means as box-crossing horizontal lines.

phenylketonuria.³ These candidate diseases if diagnosed prenatally can be managed by prenatal mRNA therapies before the onset or in the early stage of irreversible pathology to minimize disease morbidity and mortality, and achieve high therapeutic efficacy. In consideration of transplacental mRNA-1273 passage, the unmet need of fetal mRNA therapies may be fulfilled simply through maternal mRNA-LNP administration in case of no harm to the mothers, but the potential immunogenicity of mRNA-decoded peptides must be taken into consideration even in pre-immune fe-

tuses. However, it is better to note that the ability of LNPs to deliver mRNA and accumulate within desired tissues or organs varied with changes in LNP chemistry.^{12,36} Thus, modifications in lipid excipients used for mRNA-LNP formulations might affect their transplacental capacity and warrant an evaluation of their transplacental properties.

In this era of mRNA medicine, the new insights into transplacental pharmacokinetics of mRNA vaccines and immunogenic potential

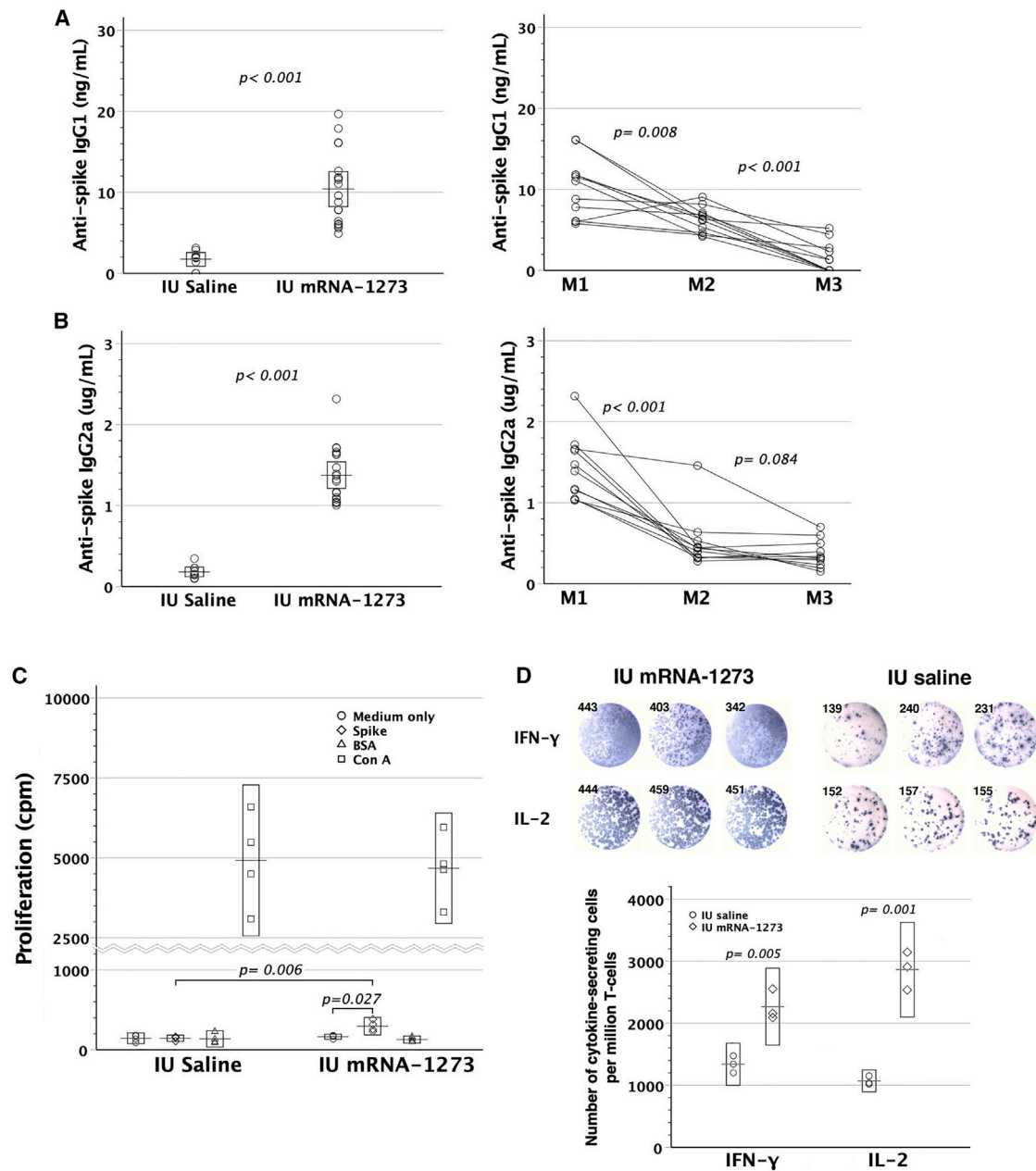


Figure 5. Immunological consequences of *in utero* mRNA-1273 injection

GD14 FVB/N fetuses were subjected to intraperitoneal injection of mRNA-1273 (IU mRNA-1273, $n = 19$). (A and B) Postnatally, serum anti-spike IgG₁/IgG_{2a} was examined at the age of 1 month. IU mRNA-1273 led to significantly higher titers of anti-spike IgG₁/IgG_{2a}, as compared with *in utero* saline injection (IU saline, $n = 9$). Serum anti-spike IgG₁/IgG_{2a} gradually decreased within postnatal 3 months. Circles interconnected by a line represent IgG₁/IgG_{2a} levels measured at 1 (M1), 2 (M2), and 3 (M3) months old from an individual mouse ($n = 11$). (C) Lymphocyte proliferation in response to spike protein was measured by the readout of incorporated tritium ($n = 4$) as counts per minute (cpm). Medium only was used as background controls, BSA as third-party stimulators, and Con-A as a mitogen to stimulate the T cell population. IU mRNA-1273 significantly proliferated specifically in response to spike protein ($p < 0.027$), whereas IU saline ($n = 4$) failed to show lymphocyte proliferation under spike protein stimulation. There was a significant difference in lymphocyte proliferation under spike protein stimulation between IU mRNA-1273 and IU saline ($p < 0.006$). Rectangles within a dataset represent 95% confidence intervals for the means, which are shown as transverse lines crossing the rectangles. (D) Spike-reactive IFN- γ - and IL-2-secreting cells of splenic lymphocytes were enumerated by ELISpot. Figures showed the spots with their counts from the representative mice of IU mRNA-1273 and IU saline. The frequency of spike-reactive IFN- γ - and IL-2-secreting T cells was calculated by the mean of ELISpot readouts (triplicates) divided by the CD3⁺ cell ratio of splenic lymphocytes in each individual mouse.

of mRNA-decoded protein in the fetuses may advance our knowledge to better protect the unborns against pathogens in perinatal life and broaden our horizons of prenatal mRNA therapeutics.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Inbred FVB/N, BALB/c (Igh-1a of IgG_{2a}, γ 2a constant region) and C57BL/6 (Igh-1b of IgG_{2a}, γ 2a constant region) mice were purchased from National Laboratory Animal Center (Taipei, Taiwan) at the age of 6–8 weeks. Animals were housed in the Animal Care Facility at Chang Gung Memorial Hospital (CGMH) under the standard guidelines from "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" and with the approval of the CGMH Committee on Animal Research. Females were caged with males in the afternoon and checked for vaginal plugs the following morning. The day the plug was observed was designated as day 0 of the pregnancy.

Harvest of fetal tissues

Under anesthesia for pregnant mice, midline laparotomy was performed to expose the uteri. The fetuses were delivered through hysterotomy and immediately washed with saline. After decapitation, fetal blood was collected by pipetmans. Then, fetal placenta, liver, and trunk soft tissues were obtained. Samples were stored in RNAlater solution at -80°C for downstream analyses or subjected to homogenization in organic solvents of ethanol or dimethyl sulfoxide (DMSO) for PEG extraction.

mRNA-1273 vaccination in pregnant mice

Pregnant mice received intramuscular (thigh) injection of mRNA-1273 on their GD14 and GD17, each at the same dose of 0.2, 1, 2, or 4 μg , diluted in 100 μL saline. Postnatally, sera of the dams and their offspring were sampled periodically for downstream experimental analyses. For mRNA-1273 component tracking in the fetuses, a single dose of 0.2 or 4 μg mRNA-1273 was intramuscularly given to the mothers on their GD14. The fetuses were then delivered by cesarean at indicated time points after maternal vaccination to harvest fetal tissues and placentas for downstream analyses.

In utero injection of mRNA-1273

Under anesthesia, the uteri of GD14 pregnant mice were exposed through a vertical laparotomy. A 60- μm glass micropipette with beveled tip was used to inject 0.05–0.1 μg of mRNA-1273 in 5 μL saline into the peritoneal cavities of all fetuses at a litter via *trans*-uterine approach. The control mice received *in utero* saline injection. Murine abdomen was closed in two layers by 5-0 silk suture. Then, mice were housed in an undisturbed room without bedding changes for 1 week. Pups were weaned at 3 weeks of age.

Immunodot blot assay to detect LNPs of mRNA-1273

This method was modified from the fat blot assay by Munnik and Wierchowicka³⁷ to semiquantitatively detect mRNA-LNPs. Mouse sera and serially diluted mRNA-1273 (1 μL for each sample) were spotted onto a nitrocellulose membrane (0.45 NC, Amer-

sham Protran). The membrane was first blocked with 5% milk in Tri-buffered saline containing 0.05% Tween 20 (TBST) for 1 h on a rotating shaker and then incubated with anti-polyethylene glycol (PEG) antibody (1:3,000, PEG-B-47, ab51257, Abcam, reacting only with conjugated forms) for 2 h. After washing with TBST three times, the membrane was treated with peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:5,000, AP132P, Sigma-Aldrich) for 2 h, followed by Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) for 2 min. Finally, the blots were subjected to chemiluminescence imaging detection (UVP Chemstudio). Positive controls were 2-fold serial dilutions of mRNA-1273, and negative controls included saline and maternal/pups' sera collected after maternal saline injection.

RT-PCR to quantify spike mRNA

RNA was isolated from tissue samples of fetuses with maternal mRNA-1273 vaccination using GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's protocol. RNA concentration was determined using Nanodrop. RNA samples of 500 ng were reversely transcribed into cDNA using PrimeScript RT reagent Kit (TaKaRa Bio). Primers used to detect target cDNA were as follows:^{10,38} Forward primer: AACGCCACCAACGTGGTCATC. Reverse primer: GTTGTGGCGCTGCTGTACAC. Bio-Rad iQ5 real-time PCR detection system and 2xSYBR qPCR Mix (BioTools) were used for PCR: 30 s at 95°C followed by 40 cycles of 5 s at 95°C and 20 s at 60°C . All samples (2 μL) were run in duplicate as 20- μL reactions. For setup of spike mRNA standard curves, cDNA reversely transcribed from 100 ng/ μL mRNA-1273 was serially diluted in a 1:2 ratio. These 3-fold serial dilutions of 2- μL cDNA samples were further $10\times$ diluted to 20 μL (corresponding to $10^4 - 0.0021$ pg/ μL of spike mRNA) in PCR amplification. Negative results were determined by the Ct values of tissue samples from the fetuses with maternal saline injection.

Determination of serum anti-spike IgG₁, IgG_{2a}, and IgM levels

ELISA microtiter plates (Corning, Corning, NY, USA) were first coated with 25 ng/mL and 50 ng/mL SARS-CoV-2 spike protein (GTx02774-pro, GeneTex) respectively for the measurement of mouse anti-spike IgG₁ and IgG_{2a}/IgM levels. The wells were blocked with 3% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich) in PBS, and incubated with 100 μL of diluted samples. In each well, biotinylated anti-mouse IgG₁ (Clone RMG1-1, BioLegend, San Diego, CA, USA) was used for IgG₁ detection, biotinylated anti-mouse IgG_{2a} (Clone RMG2a-62, BioLegend) for IgG_{2a} detection, and biotinylated anti-mouse IgM (Clone RMM-1, BioLegend) for IgM detection. Subsequently, streptavidin-horseradish peroxidase (HRP, Sigma-Aldrich) was added to the wells. Then, the reaction was developed by adding 100 μL NeA-blue tetramethylbenzidine substrate (TMB) (Clinical Science Products, Mansfield, MA, USA) and stopped with 2M H₂SO₄. The optical density at 450 nm was read using an ELISA reader. Serum anti-spike IgG₁ and IgG_{2a} levels were determined by the standard curves of mouse monoclonal anti-SARS-CoV-2 spike IgG₁ (1A9, GTx632604, GeneTex) and mouse monoclonal anti-SARS-CoV-1/2 S Protein IgG_{2a} (clone 2B3E5, Sigma-Aldrich),

respectively. Serum anti-spike IgM titers were recorded as the values of optical density.

Determination of anti-spike IgG_{2a} allotypes

Igh-1a and Igh-1b allotypes of IgG_{2a} were used to examine whether the pups (BALA/c [Igh-1a] male × C57BL/6 [Igh-1b] female, F1) generated endogenous anti-spike IgG_{2a} after maternal intramuscular vaccination of 0.2 or 4.0 µg mRNA-1273, respectively, on GD14 and GD17 during pregnancy. ELISA was performed as described above, using 10× diluted serum samples treated with primary antibodies of biotinylated anti-mouse IgG_{2a} (1:20,000, Clone RMG2a-62, reacting with both Igh-1a and Igh-1b [Igh-1a/b] haplotypes), biotinylated anti-mouse Igh-1a (1:2,000, clone 8.3, BD Pharmingen) or biotinylated anti-mouse Igh-1b (1:2,000, clone 5.7, BD Pharmingen), respectively. The color developed was read at optic density of 450 nm. Controls included BALB/c (male) × BALB/c (female) and C57BL/6 (male) × C57BL/6 (female) F1 mice.

Quantification of PEG by sandwich ELISA

Sera or supernatants of tissue homogenates from murine fetuses were subjected to PEG quantification by ELISA kits (Life Diagnostics, Cat. #: MPEG) with the capture antibody specific to PEG backbone and the detection antibody to the terminal methoxy group of vaccine PEGylated lipid. This sandwich ELISA was conducted according to the manufacturer's instructions.

Lymphocyte proliferative responses to spike protein

Spleens were obtained from the mice (6–8 weeks old) with maternal mRNA-1273 vaccination during pregnancy. Splenic lymphocytes were enriched by density gradient centrifugation and then cultured in triplicate each with 2×10^5 cells in 200 µL RPMI 1640 medium containing 10% fetal calf serum in 96-well plates. Responder lymphocytes were grown in medium only as background controls and stimulated with SARS-CoV-2 spike protein (1 µg/mL), third-party stimulator of BSA (100 ng/mL), or non-specific mitogen of Con-A (1 µg/mL). For the measurement of lymphocyte proliferation, day 5 cells were first subjected to 16-h incubation with tritiated thymidine (ICN Biomedicals) at a final concentration of 1 µCi per well and then harvested for counting incorporated tritium in a liquid scintillation counter (1450 Microbeta Plus counter). Lymphocyte proliferation was determined by the readout of incorporated tritium as counts per minute. Controls were the mice with maternal saline injection.

IFN-γ and IL-2 ELISpot assay

Murine IFN-γ/IL-2-secreting T cells were quantified by mouse IFN-γ and IL-2 ELISpot Kits according to the manufacturer's instructions (R&D Systems). Briefly, splenic lymphocytes of each animal subject were enriched by density gradient centrifugation and then examined for their CD3 T cell fractions by flow cytometry after the treatment of fluorescence-conjugated anti-CD3 antibodies (BioLegend). Wells in the microplates were first rinsed with culture media of RPMI 1640 containing 10% fetal calf serum for 20 min at room temperature. Then, cells were loaded into wells in triplicate at

a dose of $10^6/100$ µL culture media per well and incubated in a humidified 37°C CO₂ incubator for 2 days under the stimulation of SARS-CoV-2 spike protein (1 µg/mL, GTX02774-pro, GeneTex). The plates were washed with Wash Buffer four times and incubated with diluted detection antibody mixture (100 µL/well) for 2 h at room temperature on a rocking platform. After wash, the plates were incubated with diluted Streptavidin-AP Concentrate A (100 µL/well) for 2 h. The final wash was followed by the treatment of BCIP/NBT Substrate for 1 h. After the chromogen was decanted, the plates were washed with deionized water and dried at room temperature. Plates were scanned and counted on an immunospot analyzer (Cellular Technologies Ltd). The readouts of spike-reactive IFN-γ/IL-2-secreting T cells in each mouse were divided by its splenic CD3⁺ T cell fraction to estimate their frequencies per million T cells.

Neutralization assay with SARS-CoV-2 spike pseudovirus

HEK-293T cells stably expressing human ACE2 (293T-ACE2 cells) were grown in 96-well plates (6×10^4 cells/well) at 37°C with 5% CO₂ for 24 h. Serial 2-fold dilutions of mouse sera were mixed with SARS-CoV-2 wild-type spike pseudotyped lentivirus containing luciferase gene (4,000 relative infection unit), provided by RNA Technology Platform and Gene Manipulation Core, Academia Sinica, in DMEM with 1% fetal bovine serum (FBS) at 37°C for 1 h. Then, the serum-pseudovirus mixtures were added to 293T-ACE2 cells, which was incubated at 37°C with 5% CO₂ for 24 h and in DMEM with 10% FBS for another 24 h. The luciferase activity was determined by Bright-Glo Luciferase Assay kit (Promega, Madison, WI, USA) and the Synergy 2 (BioTek, Winooski, VT, USA) microplate reader.³⁹ Neutralization titer was determined by the highest serum dilution that reduced the viral infectivity by at least 50%, compared with the corresponding control wells without sera added.

Histological examination of mRNA-LNPs and spike protein by immunofluorescence staining

The fetuses were fixed in 4% paraformaldehyde overnight and embedded in paraffin. Tissue sections were deparaffinized, rehydrated, and then subjected to heat-induced antigen retrieval. After permeabilization with Tween 20 and blocked with 1% BSA, the sections were incubated with primary antibodies against PEG (1:100, PEG-B-47, ab51257, Abcam) and spike protein (1:100, chimeric mAb, D001, MBS8119537) for 1.5 h, followed by fluorescence-conjugated donkey anti-rabbit IgG (1:100, Poly4064, BioLegend) and rat anti-human IgG Fc (1:100, M1310G05, BioLegend). Visualization of the nuclei was achieved by Hoechst 33342 staining (1:20,000, Invitrogen). Sections were mounted with Dako fluorescence mounting medium. Images were taken using a confocal microscope.

Statistical analyses

All error bar charts were shown as 95% confidence intervals (boxed areas) for the means (transverse lines crossing the boxes) along with superimposed data points of individual mice. The equality of means was examined by Student's t test between two independent or paired groups, or by one-way analysis of variance (ANOVA)

among three or more groups with post hoc Fisher's least significant difference (LSD) multiple comparisons. Differences were regarded as significant in all tests at $p < 0.05$.

DATA AND CODE AVAILABILITY

- Data reported in this paper will be shared by the correspondence author upon request.
- Any additional information required to reanalyze the data reported in this paper is available from the correspondence author upon request.

ACKNOWLEDGMENTS

Special thanks go to Shiang-Chi Chen for her construction of graphic abstract. Shiang-Chi Chen is now studying for Master of Fine Arts (MFA) in the Visual Development, Academy of Art University, San Francisco, California, USA.

This project was financially supported by NSTC-112-2314-B-182-033 (J.-C.C.) and NSTC-113-2321-B-182-003 (C.-H.C.) from the National Science and Technology Council (NSTC), Taiwan, and CMRPG3N0931 (J.-C.C.) from Chang Gung Medical Foundation.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.-C.C. conceptualized this study, acquired funding, performed *in utero* injection, analyzed the data, prepared the figures and wrote the manuscript. M.-H.H. conducted the experiments of all immunoassays and RT-PCR. R.-L.K. and L.-T.W. performed pseudovirus neutralization assay. M.-L.K. helped to design the experiments of anti-spike IgG_{2a} allotypes. L.-Y.T. and H.-L.C. performed immunostaining and assisted in experiments and animal surgery as well as care. C.-H.C. conceptualized this study, acquired funding, assisted in data analyses, supervised and coordinated the overall research, and edited the manuscript.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2025.102489>.

REFERENCES

1. Baden, L.R., El Sahly, H.M., Essink, B., Kotloff, K., Frey, S., Novak, R., Diemert, D., Spector, S.A., Rouphael, N., Creech, C.B., et al. (2021). Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N. Engl. J. Med.* 384, 403–416.
2. Polack, F.P., Thomas, S.J., Kitchin, N., Absalon, J., Gurtman, A., Lockhart, S., Perez, J.L., Pérez Marc, G., Moreira, E.D., Zerbini, C., et al. (2020). Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N. Engl. J. Med.* 383, 2603–2615.
3. Qin, S., Tang, X., Chen, Y., Chen, K., Fan, N., Xiao, W., Zheng, Q., Li, G., Teng, Y., Wu, M., and Song, X. (2022). mRNA-based therapeutics: powerful and versatile tools to combat diseases. *Signal Transduct. Targeted Ther.* 7, 166.
4. Gray, K.J., Bordt, E.A., Atyeo, C., Deriso, E., Akinwunmi, B., Young, N., Baez, A.M., Shook, L.L., Cvrk, D., James, K., et al. (2021). Coronavirus disease 2019 vaccine response in pregnant and lactating women: a cohort study. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 225, 303.e1–303.e17.
5. Jamieson, D.J., and Rasmussen, S.A. (2022). An update on COVID-19 and pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 226, 177–186.
6. Halasa, N.B., Olson, S.M., Staat, M.A., Newhams, M.M., Price, A.M., Pannaraj, P.S., Boom, J.A., Sahni, L.C., Chiotos, K., Cameron, M.A., et al. (2022). Maternal Vaccination and Risk of Hospitalization for Covid-19 among Infants. *N. Engl. J. Med.* 387, 109–119.
7. Rasmussen, S.A., and Jamieson, D.J. (2022). Covid-19 Vaccination during Pregnancy - Two for the Price of One. *N. Engl. J. Med.* 387, 178–179.
8. Swingle, K.L., Safford, H.C., Geisler, H.C., Hamilton, A.G., Thatte, A.S., Billingsley, M.M., Joseph, R.A., Mrksich, K., Padilla, M.S., Ghalsasi, A.A., et al. (2023). Ionizable Lipid Nanoparticles for In Vivo mRNA Delivery to the Placenta during Pregnancy. *J. Am. Chem. Soc.* 145, 4691–4706.
9. Santos, A., Sauer, M., Neil, A.J., Solomon, I.H., Hornick, J.L., Roberts, D.J., Quade, B.J., and Parra-Herran, C. (2022). Absence of SARS-CoV-2 Spike glycoprotein expression in placentas from individuals after mRNA SARS-CoV-2 vaccination. *Mod. Pathol.* 35, 1175–1180.
10. Prah, M., Golan, Y., Cassidy, A.G., Matsui, Y., Li, L., Alvarenga, B., Chen, H., Jigmeddagva, U., Lin, C.Y., Gonzalez, V.J., et al. (2022). Evaluation of transplacental transfer of mRNA vaccine products and functional antibodies during pregnancy and infancy. *Nat. Commun.* 13, 4422.
11. (CHMP), C.f.M.P.f.H.U. (2021). Spikevax (Previously COVID-19 Vaccine Moderna) : EPAR - Public Assessment Report (European Medicines Agency). EMA/15689/2021.
12. Riley, R.S., Kashyap, M.V., Billingsley, M.M., White, B., Alameh, M.G., Bose, S.K., Zoltick, P.W., Li, H., Zhang, R., Cheng, A.Y., et al. (2021). Ionizable lipid nanoparticles for in utero mRNA delivery. *Sci. Adv.* 7, eaba1028.
13. Pardi, N., Tuyishime, S., Muramatsu, H., Kariko, K., Mui, B.L., Tam, Y.K., Madden, T.D., Hope, M.J., and Weissman, D. (2015). Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes. *J. Contr. Release* 217, 345–351.
14. Etti, M., Calvert, A., Galiza, E., Lim, S., Khalil, A., Le Doare, K., and Heath, P.T. (2022). Maternal vaccination: a review of current evidence and recommendations. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 226, 459–474.
15. Snodgrass, H.R., Kisielow, P., Kiefer, M., Steinmetz, M., and von Boehmer, H. (1985). Ontogeny of the T-cell antigen receptor within the thymus. *Nature* 313, 592–595.
16. Chen, J.C., Chan, C.C., Wu, C.J., Ou, L.S., Yu, H.Y., Chang, H.L., Tseng, L.Y., and Kuo, M.L. (2016). Fetal Phagocytes Take up Allergens to Initiate T-Helper Cell Type 2 Immunity and Facilitate Allergic Airway Responses. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 194, 934–947.
17. Chen, J.C., Ou, L.S., Kuo, M.L., Tseng, L.Y., and Chang, H.L. (2020). Fetal exposure to oncoantigen elicited antigen-specific adaptive immunity against tumorigenesis. *J. Immunother. Cancer* 8, e000137.
18. Furukawa, S., Kuroda, Y., and Sugiyama, A. (2014). A comparison of the histological structure of the placenta in experimental animals. *J. Toxicol. Pathol.* 27, 11–18.
19. Malassine, A., Frendo, J.L., and Evain-Brion, D. (2003). A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. *Hum. Reprod. Update* 9, 531–539.
20. Dilworth, M.R., and Sibley, C.P. (2013). Review: Transport across the placenta of mice and women. *Placenta* 34, S34–S39.
21. Enders, A.C., and Carter, A.M. (2004). What can comparative studies of placental structure tell us?—A review. *Placenta* 25, S3–S9.
22. Shimabukuro, T.T., Kim, S.Y., Myers, T.R., Moro, P.L., Oduyebo, T., Panagiotakopoulos, L., Marquez, P.L., Olson, C.K., Liu, R., Chang, K.T., et al. (2021). Preliminary Findings of mRNA Covid-19 Vaccine Safety in Pregnant Persons. *N. Engl. J. Med.* 384, 2273–2282.
23. Zauche, L.H., Wallace, B., Smoots, A.N., Olson, C.K., Oduyebo, T., Kim, S.Y., Petersen, E.E., Ju, J., Beauregard, J., Wilcox, A.J., et al. (2021). Receipt of mRNA Covid-19 Vaccines and Risk of Spontaneous Abortion. *N. Engl. J. Med.* 385, 1533–1535.
24. DeSilva, M., Haapala, J., Vazquez-Benitez, G., Vesco, K.K., Daley, M.F., Getahun, D., Zerbo, O., Naleway, A., Nelson, J.C., Williams, J.T.B., et al. (2022). Evaluation of Acute Adverse Events after Covid-19 Vaccination during Pregnancy. *N. Engl. J. Med.* 387, 187–189.
25. Banoun, H. (2023). mRNA: Vaccine or Gene Therapy? The Safety Regulatory Issues. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 10514.
26. Zhang, L., Richards, A., Barrasa, M.I., Hughes, S.H., Young, R.A., and Jaenisch, R. (2021). Reverse-transcribed SARS-CoV-2 RNA can integrate into the genome of cultured human cells and can be expressed in patient-derived tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 118, e2105968118.
27. Guerriard, M., and Kohli, E. (2022). RNA-based drugs and regulation: Toward a necessary evolution of the definitions issued from the European union legislation. *Front. Med.* 9, 1012497.
28. Roltgen, K., Nielsen, S.C.A., Silva, O., Younes, S.F., Zaslavsky, M., Costales, C., Yang, F., Wirz, O.F., Solis, D., Hoh, R.A., et al. (2022). Immune imprinting, breadth of

- variant recognition, and germinal center response in human SARS-CoV-2 infection and vaccination. *Cell* 185, 1025–1040.e1014.
29. Fertig, T.E., Chitoiu, L., Marta, D.S., Ionescu, V.S., Cismasiu, V.B., Radu, E., Angheluta, G., Dobre, M., Serbanescu, A., Hinescu, M.E., and Gherghiceanu, M. (2022). Vaccine mRNA Can Be Detected in Blood at 15 Days Post-Vaccination. *Biomedicines* 10, 1538.
 30. Ogata, A.F., Cheng, C.A., Desjardins, M., Senussi, Y., Sherman, A.C., Powell, M., Novack, L., Von, S., Li, X., Baden, L.R., and Walt, D.R. (2022). Circulating Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Vaccine Antigen Detected in the Plasma of mRNA-1273 Vaccine Recipients. *Clin. Infect. Dis.* 74, 715–718.
 31. Yonker, L.M., Swank, Z., Bartsch, Y.C., Burns, M.D., Kane, A., Boribong, B.P., Davis, J.P., Loisel, M., Novak, T., Senussi, Y., et al. (2023). Circulating Spike Protein Detected in Post-COVID-19 mRNA Vaccine Myocarditis. *Circulation* 147, 867–876.
 32. Munisha, M., and Schimenti, J.C. (2021). Genome maintenance during embryogenesis. *DNA Repair* 106, 103195.
 33. Comaills, V., Kabeche, L., Morris, R., Buisson, R., Yu, M., Madden, M.W., LiCausi, J.A., Boukhali, M., Tajima, K., Pan, S., et al. (2016). Genomic Instability Is Induced by Persistent Proliferation of Cells Undergoing Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Cell Rep.* 17, 2632–2647.
 34. Mohrenweiser, H., and Zingg, B. (1995). Mosaicism: the embryo as a target for induction of mutations leading to cancer and genetic disease. *Environ. Mol. Mutagen.* 25 Suppl 26, 21–29.
 35. Bose, S.K., Menon, P., and Peranteau, W.H. (2021). In Utero Gene Therapy: Progress and Challenges. *Trends Mol. Med.* 27, 728–730.
 36. Trepotec, Z., Lichtenegger, E., Plank, C., Aneja, M.K., and Rudolph, C. (2019). Delivery of mRNA Therapeutics for the Treatment of Hepatic Diseases. *Mol. Ther.* 27, 794–802.
 37. Munnik, T., and Wierchowicka, M. (2013). Lipid-binding analysis using a fat blot assay. *Methods Mol. Biol.* 1009, 253–259.
 38. Golan, Y., Prahl, M., Cassidy, A., Lin, C.Y., Ahituv, N., Flaherman, V.J., and Gaw, S.L. (2021). Evaluation of Messenger RNA From COVID-19 BTN162b2 and mRNA-1273 Vaccines in Human Milk. *JAMA Pediatr.* 175, 1069–1071.
 39. Liu, K.T., Gong, Y.N., Huang, C.G., Huang, P.N., Yu, K.Y., Lee, H.C., Lee, S.C., Chiang, H.J., Kung, Y.A., Lin, Y.T., et al. (2022). Quantifying Neutralizing Antibodies in Patients with COVID-19 by a Two-Variable Generalized Additive Model. *mSphere* 7, e0088321.

mRNA-1273 è permeabile alla placenta e immunogenico nel feto

Jeng-Chang Chen,^{1,2} Mei-Hua Hsu,^{3,4} Rei-Lin Kuo,^{5,6,7} Li-Ting Wang,⁶ Ming-Ling Kuo,^{7,8} Li-Yun Tseng,⁹ Hsueh-Ling Chang,⁹ e Cheng-Hsun Chiu^{3,4}

¹ Facoltà di Medicina, Università Chang Gung, Taoyuan 333, Taiwan; ² Divisione di Chirurgia Pediatrica, Dipartimento di Chirurgia, Chang Gung Memorial Hospital, Taoyuan 333, Taiwan; ³ Divisione di Malattie Infettive Pediatriche, Dipartimento di Pediatria, Chang Gung Memorial Hospital, Taoyuan 333, Taiwan; ⁴ Centro di ricerca sulle malattie infettive molecolari, Chang Gung Memorial Hospital, Taoyuan 333, Taiwan; ⁵ Dipartimento di Biotecnologie Mediche e Scienze di Laboratorio, Facoltà di Medicina dell', Chang Gung University, Taoyuan 333, Taiwan; ⁶ Centro di ricerca sulle infezioni virali emergenti, Facoltà di Medicina, Chang Gung University, Taoyuan 333, Taiwan; ⁷ Divisione di Allergia, Asma e Reumatologia, Dipartimento di Pediatria, Chang Gung Memorial Hospital, Taoyuan 333, Taiwan; ⁸ Dipartimento di Microbiologia e Immunologia dell' e, Istituto di Scienze Biomediche, Facoltà di Medicina, Chang Gung University, Taoyuan 333, Taiwan; ⁹ Centro di Ricerca Pediatrica, Chang Gung Memorial Hospital, Taoyuan 333, Taiwan

I vaccini a mRNA contro il COVID-19 sono generalmente riconosciuti come sicuri per la somministrazione durante la gravidanza. Tuttavia, la loro farmacocinetica transplacentare rimane poco chiara. In questo studio, il vaccino mRNA-1273 somministrato per via intramuscolare a topi gravidi ha rapidamente circolato nel sangue materno e ha attraversato la placenta entro

1 ora per diffondersi nella circolazione fetale. Sebbene l'mRNA spike nella circolazione fetale sia scomparso entro 4-6 ore, potrebbe accumularsi nei tessuti fetali, principalmente nel fegato, e essere tradotto in proteina spike. L'mRNA-1273 transplacentare si è dimostrato immunogenico nei feti, che dopo la nascita presentavano immunoglobuline (Ig)M anti-spike, IgG_(2a) anti-spike allotipiche materne e un'immunità cellulare anti-spike potenziata. Somministrato durante la gestazione, l'mRNA-1273 ha avuto un effetto dose-dipendente sul suo trasferimento transplacentare e sull'immunogenicità nei feti, con dosi più elevate di mRNA-1273 che hanno portato ad un aumento del passaggio transplacentare dell'mRNA-1273 e a titoli sierici più elevati di IgM/IgG anti-spike endogene generate dai feti. Pertanto, la vaccinazione materna con mRNA-1273 durante la gestazione potrebbe conferire ai neonati non solo un'immunità passiva, ma anche attiva contro la proteina spike. I nostri risultati forniscono nuove informazioni sulla capacità transplacentare dei vaccini a mRNA e sul loro potenziale immunogenico nei feti, ampliando le nostre conoscenze sulla medicina a mRNA per proteggere i nascituri dai patogeni nella vita perinatale e allargando i nostri orizzonti nella terapia molecolare prenatale con mRNA.

INTRODUZIONE

I due vaccini di nuova generazione Moderna mRNA-1273¹ e BioNTech BNT162b2,² basati su filamenti di mRNA che codificano la proteina spike del SARS-CoV-2 racchiusi in nanoparticelle lipidiche (LNP),³ sono stati ampiamente utilizzati durante e dopo la pandemia di COVID-19. Hanno conferito un'efficacia superiore al 90% contro il COVID-19 con un profilo di sicurezza favorevole negli adulti.^{(1) (2)} Tuttavia, l'accresciuta farmacovigilanza relativa ai potenziali o inattesi effetti embriotossici/fetotossici di prodotti medici di nuova concezione somministrati durante la gravidanza ha impedito alle donne in gravidanza di sottoporsi alla vaccinazione con mRNA-LNP.

Fin dall'inizio⁴, nonostante il COVID-19 durante la gravidanza tendesse a comportare un rischio più elevato di complicanze materne o neonatali⁽⁵⁾ poiché i dati clinici e le osservazioni accumulate hanno confermato la sicurezza dei vaccini a mRNA per la madre e il feto⁽⁶⁾, la vaccinazione con mRNA-LNP prima⁶ o durante la gravidanza⁷ è stata altamente raccomandata. Tuttavia, la farmacocinetica delle mRNA-LNP nelle donne in gravidanza rimane avvolta nel mistero, in particolare per quanto riguarda la loro capacità transplacentare. Sebbene sia stato riportato che le LNP consentono il rilascio *in vivo* del mRNA del fattore di crescita endoteliale vascolare alla placenta, accompagnato dalla sua vasodilatazione,⁸ né l'mRNA del vaccino né la proteina spike decodificata dall'mRNA sono stati rilevati nella placenta⁹ e nel sangue cordonale¹⁰ campionati almeno 2 giorni e per lo più settimane o addirittura mesi dopo la vaccinazione materna finale con BNT-162b2 o mRNA-1273. Ciò ha portato all'idea che la placenta fungesse da barriera naturale per le mRNA-LNP, fornendo un'ulteriore assicurazione sulla sicurezza dei vaccini a mRNA durante la gravidanza. Tuttavia, è stato riportato che le mRNA-LNP venivano rapidamente eliminate dalla circolazione durante le prime 24 ore, con il tempo necessario per una riduzione del 50% della concentrazione di mRNA-LNP ($T^{(1/2)}$) in un intervallo compreso tra 2,7 e 3,8 ore,¹¹ il che implica che il trasferimento transplacentare di mRNA-LNP, se presente, avverrebbe molto probabilmente entro 24 ore dalla vaccinazione materna. Inoltre, le mRNA-LNP somministrate per via endovenosa in animali fetali⁽¹²⁾ o adulti⁽¹³⁾ hanno subito una rapida diffusione sistemica con accumulo preferenziale di LNP e picco di funzionalità dell'mRNA nel fegato entro 4 ore, seguito da una diminuzione dei livelli proteici a 24 ore dall'iniezione o dalla cessazione della traduzione il secondo giorno. Nel complesso, sembrava prematuro negare il trasferimento transplacentare di mRNA-LNP sulla base dell'impossibilità di rilevare mRNA del vaccino o suoi prodotti nel sangue fetale o nella placenta raccolti in ritardo, che non erano nemmeno favorevoli alla presenza di mRNA-LNP o proteine spike. Abbiamo condotto questo studio sui topi

Ricevuto il 6 settembre 2024; accettato il 13 febbraio 2025;
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2025.102489>.

Corrispondenza: Cheng-Hsun Chiu, Dipartimento di Pediatria, Chang Gung Memorial Hospital, No. 5, Fu-Shin Street, Kweishan, Taoyuan 333, Taiwan.
E-mail: chchiu@adm.cgmh.org.tw



per rivalutare la capacità transplacentare dell'mRNA-1273 e analizzare la sua immunogenicità nei feti.

RISULTATI

Rilevazione di polietilenglicole lipidico transplacentare

Dopo una singola dose intramuscolare di 4 mg di mRNA-1273 somministrata a topi gravidi al 14° giorno di gestazione (GD14), i feti sono stati partoriti e sottoposti a eutanasia in momenti prestabiliti per ricercare LNP transplacentari nel sangue fetale, utilizzando anticorpi anti-polietilenglicole (PEG). Le LNP PEGilate sono passate rapidamente nel flusso sanguigno materno e hanno attraversato efficacemente la placenta per diffondersi nella circolazione fetale entro 30 minuti (Figura 1A). Tuttavia, sono scomparse dalla circolazione materna entro 3-24 ore, ma sono rimaste nella circolazione fetale per almeno 7 giorni, indicando una degradazione più lenta del PEG nei feti rispetto alle madri. Un ulteriore test immunoenzimatico (ELISA) ha confermato che i livelli di PEG sono rimasti stabili nel siero fetale entro 3 ore dalla vaccinazione materna con 4 mg di mRNA-1273 e sono diminuiti significativamente a 6 ore e da 1 a 3 giorni (Figura 1B). Il PEG nel siero dei figli era appena rilevabile nei giorni 7-11 dopo la vaccinazione materna e non era più rilevabile nei giorni 14-18. Non è stato rilevato PEG nella placenta fetale, nel fegato e nei tessuti molli mediante ELISA in nessuno dei punti temporali esaminati (dati non mostrati). È importante notare che una riduzione delle dosi materne di mRNA-1273 ha causato un calo dei livelli sierici di PEG nei feti entro 3 ore dalla vaccinazione materna (Figura 1C).

Rilevazione di picchi di mRNA transplacentare

Abbiamo quindi esaminato se il trasferimento transplacentare di LNP fosse associato alla sostanza attiva del vaccino SARS-CoV-2 spike mRNA mediante PCR con trascrizione inversa (RT-PCR) (Figura S1). Dopo la vaccinazione intramuscolare materna con 4 mg di mRNA-1273, l'mRNA spike è entrato nella circolazione materna e ha attraversato la placenta raggiungendo il sangue fetale entro 1 ora, mentre l'mRNA spike transplacentare è diventato rapidamente non rilevabile nella circolazione fetale entro 4-6 ore (Tabella S1). Pertanto, l'mRNA spike era più soggetto a degradazione rispetto al PEG nel sangue fetale. L'mRNA spike transplacentare si è accumulato principalmente nel fegato fetale, ma è rimasto anche nella placenta fetale e nei tessuti molli del tronco (Figura 1D; Tabella S1). L'mRNA spike potrebbe persistere nel fegato e nella milza dei neonati almeno fino a 3 settimane dopo la nascita (Tabella S1). In particolare, la colorazione immunofluorescente ha dimostrato la presenza di LNP PEGilate e della proteina spike nelle cellule epatiche fetali (Figura 1E). Nel complesso, il trasferimento transplacentare di mRNA-1273 è stato accompagnato dall'espressione della proteina decodificata dall'mRNA nel feto. Nelle madri vaccinate con 0,2 mg di mRNA-1273, l'mRNA del vaccino si è rapidamente diffuso anche nella circolazione materna, accumulandosi nella placenta e distribuendosi al feto (Tabella S2). Sebbene i livelli di mRNA spike nelle placente fetali non differissero tra 0,2 e 4,0 mg di mRNA-1273 somministrati alle madri, basse dosi di mRNA-1273 hanno dato luogo a un minore accumulo di mRNA spike nei fegati fetali rispetto alle dosi elevate (Figura 1F). Nel complesso, il trasferimento transplacentare di mRNA-1273 ha mostrato una risposta dose-dipendente dalla madre, con dosi materne più elevate di mRNA-1273 che hanno determinato livelli più elevati di PEG nella circolazione e di mRNA spike nel fegato del feto. Tuttavia, livelli comparabili di mRNA spike nelle placente fetali tra mRNA-1273 ad alto e basso dosaggio somministrato alle madri potrebbero suggerire un intrappolamento placentare dell'mRNA-1273 prima che raggiunga il feto.

Esame delle IgG₁/IgG_{2a} anti-spike e della loro efficacia nel bloccare il virus

Per chiarire le conseguenze immunologiche della trasmissione transplacentare

Trasferimento di mRNA-1273 nel feto: esaminiamo l'influenza delle dosi di mRNA-1273 somministrate per via intramuscolare a topi gravidi sui livelli sierici di immunoglobuline anti-spike nelle madri e nei piccoli. Dopo la vaccinazione materna con mRNA-1273 alla stessa dose di 0,2, 1,0, 2,0 o 4,0 mg al GD14 e al GD17, le madri e i loro piccoli sono stati esaminati per i livelli sierici di immunoglobuline anti-spike (Ig) un mese dopo il parto. Le madri vaccinate hanno generato in modo significativo IgG₍₁₎/IgG_(2a) anti-spike in assenza di una risposta dose-dipendente, con livelli compresi rispettivamente tra 100-200 ng/mL e 20-40 mg/mL, relativamente stabili durante un periodo postnatale di 3 mesi (Figura 2A). Tuttavia, l'mRNA-1273 somministrato alle topi gravide ha esercitato un effetto dose-dipendente sui livelli sierici di IgG₍₁₎/IgG_(2a) anti-spike della prole, che hanno mostrato una tendenza al calo nel tempo (Figura 2B). L'efficacia di blocco del virus del siero materno era pari a diluizioni da 1024 a 2048 volte almeno nei 2-3,5 mesi postnatali, mentre il siero dei cuccioli a 2 mesi di età presentava un'attività di neutralizzazione inferiore, che scompariva addirittura a 3,5 mesi (Figura 2C). Ciò era sostanzialmente coerente con la diversa durata delle IgG anti-spike sieriche tra le madri (Figura 2A) e la loro prole (Figura 2B). La discordanza tra i livelli di IgG anti-spike (1)/IgG (2a) nel primo mese di vita dei cuccioli in risposta alle dosi di mRNA-1273 utilizzate per vaccinare le madri potrebbe essere rilevante per il trasferimento transplacentare di mRNA-1273 in modo dose-dipendente dalla madre (Figure 1C e 1F; Tabelle S1 e S2). Ciò ha messo in discussione se il trasferimento transplacentare di mRNA-1273 non fosse solo dose-dipendente dalla madre, ma esercitasse anche un effetto dose-dipendente nell'attivare il sistema immunitario fetale per generare IgG anti-spike endogeni.

Analisi degli allotipi IgG_{2a} anti-spike nella prole

Sono state condotte indagini per valutare la derivazione delle IgG anti-spike della prole dopo la vaccinazione materna con mRNA-1273, utilizzando due forme alleliche (Igh-1a e Igh-1b) dell'Ig-1 (IgG_{2a}, regione costante g2a). Il ceppo murino BALB/c possiede l'IgG_(2a) dell'aplotipo Igh-1a, mentre il ceppo C57BL/6 appartiene all'aplotipo Igh-1b. Femmine C57BL/6 sono state accoppiate con maschi BALB/c e poi vaccinate con 4 mg di mRNA-1273 rispettivamente al GD14 e al GD17. Dopo il parto, la prole (maschi BALB/c[×] e femmine C57BL/6, F1) ha coespresso entrambi gli aplotipi Igh-1a e Igh-1b di IgG_(2a) anti-spike all'età di 4 settimane, nonostante la scomparsa dell'aplotipo Igh-1a all'età di 8 settimane (Figure 3A e 3B; Tabella S3). Ciò ha fornito la prova molecolare diretta che la prole era dotata di IgG anti-spike endogene (2a), che non potevano provenire da altro che dai cloni di cellule B della prole che esprimevano selettivamente l'allotipo paterno Igh-1. Chiaramente, i figli nati da madri vaccinate con mRNA-1273 durante la gestazione erano stati immunizzati dalla proteina spike e inoltre dotati di IgG anti-spike endogene. Per inciso, le IgG anti-spike (2a) sieriche di tutte le femmine C57BL/6 accoppiate con maschi BALB/c sono risultate contenere l'aplotipo Igh-1a di origine fetale (Tabella S3), indicando una direzione inversa del trasferimento delle IgG anti-spike (2a) dal feto alla madre. Pertanto, il trasferimento transplacentare delle IgG potrebbe essere bidirezionale. Quando le femmine C57BL/6 in gestazione sono state vaccinate con 0,2 mg

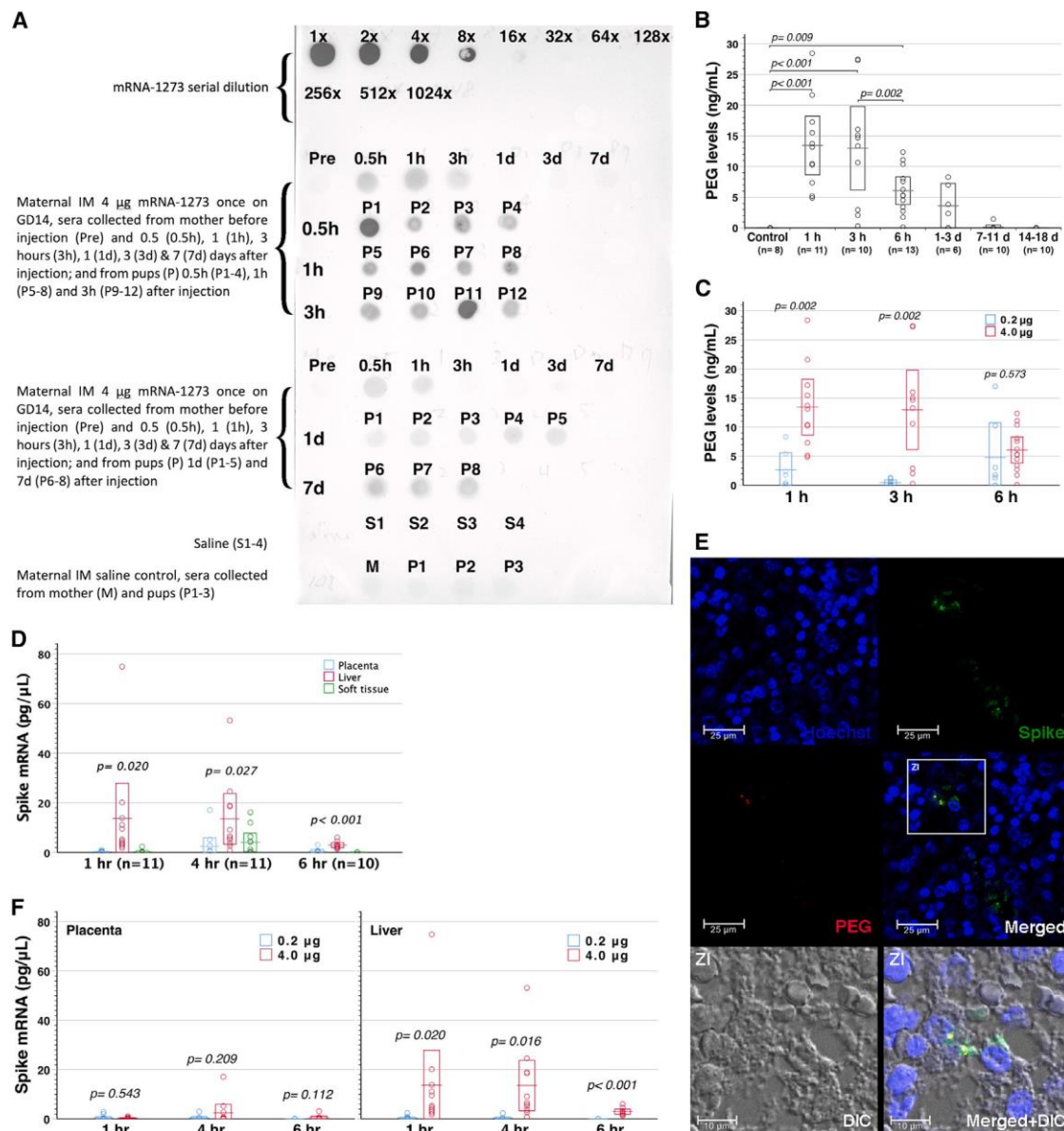


Figura 1. Trasferimento transplacentare di mRNA-1273 dopo vaccinazione materna con mRNA-1273 durante la gravidanza

(A) Madri GD14 FVB/N, vaccinate per via intramuscolare (IM) con una singola dose di mRNA-1273 da 4,0 mg, sono state sottoposte a prelievo di siero prima della vaccinazione (Pre) e nei momenti indicati di 0,5-3 ore e 1-7 giorni dopo l'iniezione. I loro cuccioli sono stati consegnati per il prelievo di siero negli stessi momenti. Il test Immunodot blot ha dimostrato il trasferimento transplacentare di LNP PEGilato. (B) Il test ELISA ha rivelato che il siero fetale conteneva livelli significativamente più elevati di PEG nei momenti di 1 ora, 3 ore e 6 ore dopo la vaccinazione materna con mRNA-1273 rispetto a quelli con iniezione materna di soluzione salina (controllo, ANOVA con confronto multiplo della differenza minima significativa (LSD)). Tra 3 e 6 ore si è verificata una significativa diminuzione dei livelli sierici di PEG. Sebbene il PEG fosse ancora misurabile in alcuni cuccioli dei gruppi 1-3 giorni e 7-11 giorni, i loro livelli medi non differivano da quelli dei controlli con soluzione salina. Nei giorni 14-18, il PEG era completamente assente in tutti i sieri neonatali, identico ai controlli con soluzione salina. (C) Ai tempi di 1 ora e 3 ore dopo la vaccinazione materna,

4,0 mg di mRNA-1273 hanno portato a livelli di PEG più elevati nel siero fetale rispetto a una dose di 0,2 mg. (D) L'mRNA Spike nella placenta fetale, nel fegato e nei tessuti molli è stato quantificato mediante RT-PCR dopo la vaccinazione materna con 4 mg di mRNA-1273 (madri 234, 235 e 236 nella [tabella S1](#)). I livelli di mRNA spike di "(—)" e "0,021" sono stati inseriti rispettivamente come "0" e "0,021" nella creazione di questo grafico. L'mRNA spike era significativamente predominante nel fegato fetale dei gruppi 1, 4 e 6 h (ANOVA con confronto multiplo LSD). (E) L'immunofluorescenza ha rivelato la presenza di LNP PEGilate intracellulari e della proteina spike nel fegato fetale 6 ore dopo la vaccinazione materna con 4,0 mg di mRNA-1273. DIC: contrasto interferenziale differenziale. ZI: zoom. (F) Ai tempi di 1, 4 e 6 ore dopo la vaccinazione materna con mRNA-1273, i livelli di mRNA spike nelle placente fetali non differivano tra 4,0 e 0,2 mg di mRNA-1273 utilizzati per vaccinare le madri ([Tabelle S1 e S2](#)), mentre 4,0 mg di mRNA-1273 hanno portato ad un accumulo significativamente maggiore di mRNA spike nei fegati fetali rispetto a 0,2 mg di mRNA-1273. I grafici con barre di errore mostrano le aree racchiuse in riquadri che rappresentano gli intervalli di confidenza al 95% per le medie come linee orizzontali che attraversano i riquadri.

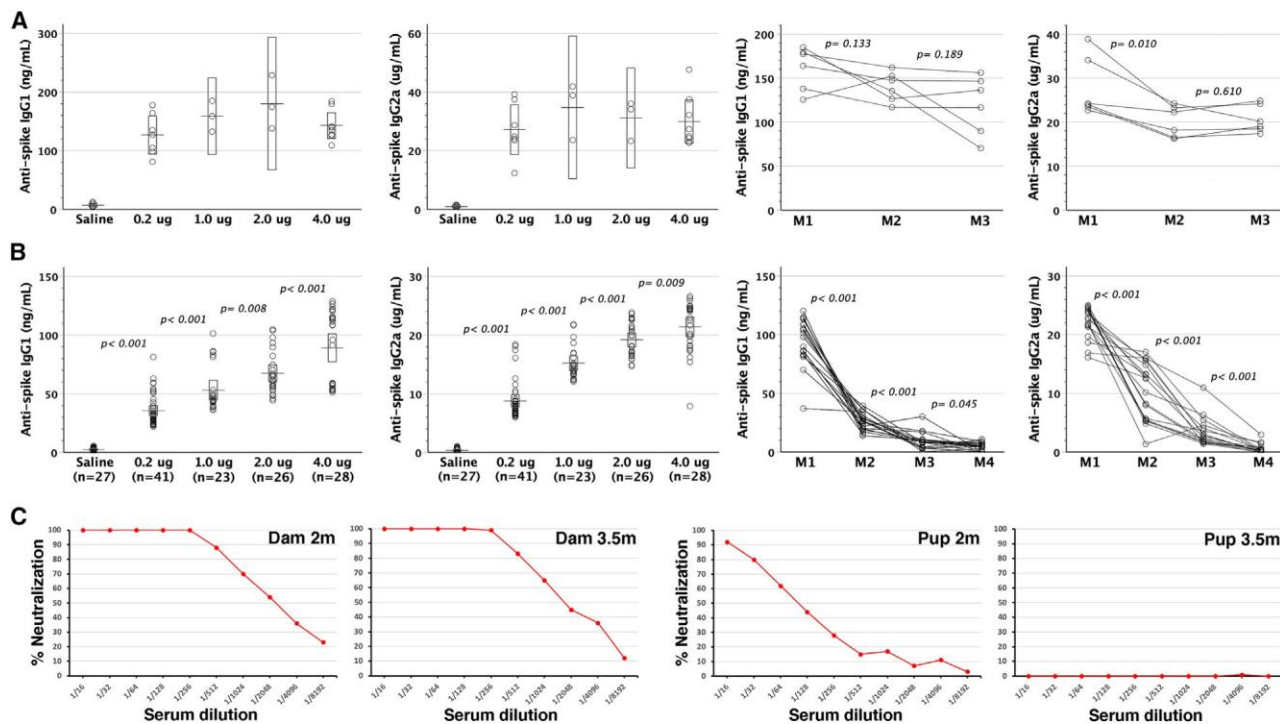


Figura 2. IgG anti-spike ₁ /IgG_{2a} con efficacia di blocco del virus nelle madri e nella loro prole dopo somministrazione gestazionale di mRNA-1273.

Topi FVB/N gravidi sono stati vaccinati per via intramuscolare con le stesse dosi di mRNA-1273 (0,2, 1, 2 o 4 mg) nei giorni GD14 e GD17. (A) Un mese dopo il parto (M1), tutte e quattro le dosi di mRNA-1273 hanno indotto livelli significativi di IgG₁ /IgG_{2a} anti-spike nel siero delle madri e (B) dei cuccioli ($p < 0,001$, ANOVA), rispetto ai controlli con soluzione salina. Sono stati osservati livelli di IgG₁ /IgG_{2a} anti-spike dose-dipendenti nei cuccioli piuttosto che nelle madri (confronto multiplo mediante test post hoc LSD di Fisher). Le madri ($n = 6$) hanno mantenuto titoli anti-spike IgG₁ /IgG_{2a} stabili nel siero nei 3 mesi postnatali (M1-M3), ad eccezione di un calo iniziale dei livelli di anti-spike IgG_{2a} ($p = 0,010$, confronto a coppie) a M2, mentre gli IgG anti-spike₁ /IgG_{2a} nel siero dei cuccioli ($n = 18$) sono gradualmente scomparsi entro M3-M4. I cerchi interconnessi in diversi momenti temporali rappresentano i dati dei livelli di IgG₁ /IgG_{2a} raccolti da un singolo topo. (C) L'efficacia di blocco del virus del siero materno e dei cuccioli è stata valutata mediante test di neutralizzazione con pseudovirus e mostrata in una madre rappresentativa e nei suoi cuccioli. I sieri materni postnatali a 2 e 3,5 mesi avevano titoli di neutralizzazione pari a diluizioni di 2048 e 1024 volte, rispettivamente, mentre l'attività di neutralizzazione dei sieri dei piccoli era di 64 volte a 2 mesi di età, ma scompariva a 3,5 mesi. I grafici con barre di errore mostrano le aree racchiuse in riquadri che rappresentano gli intervalli di confidenza al 95% per le medie come linee orizzontali che attraversano i riquadri.

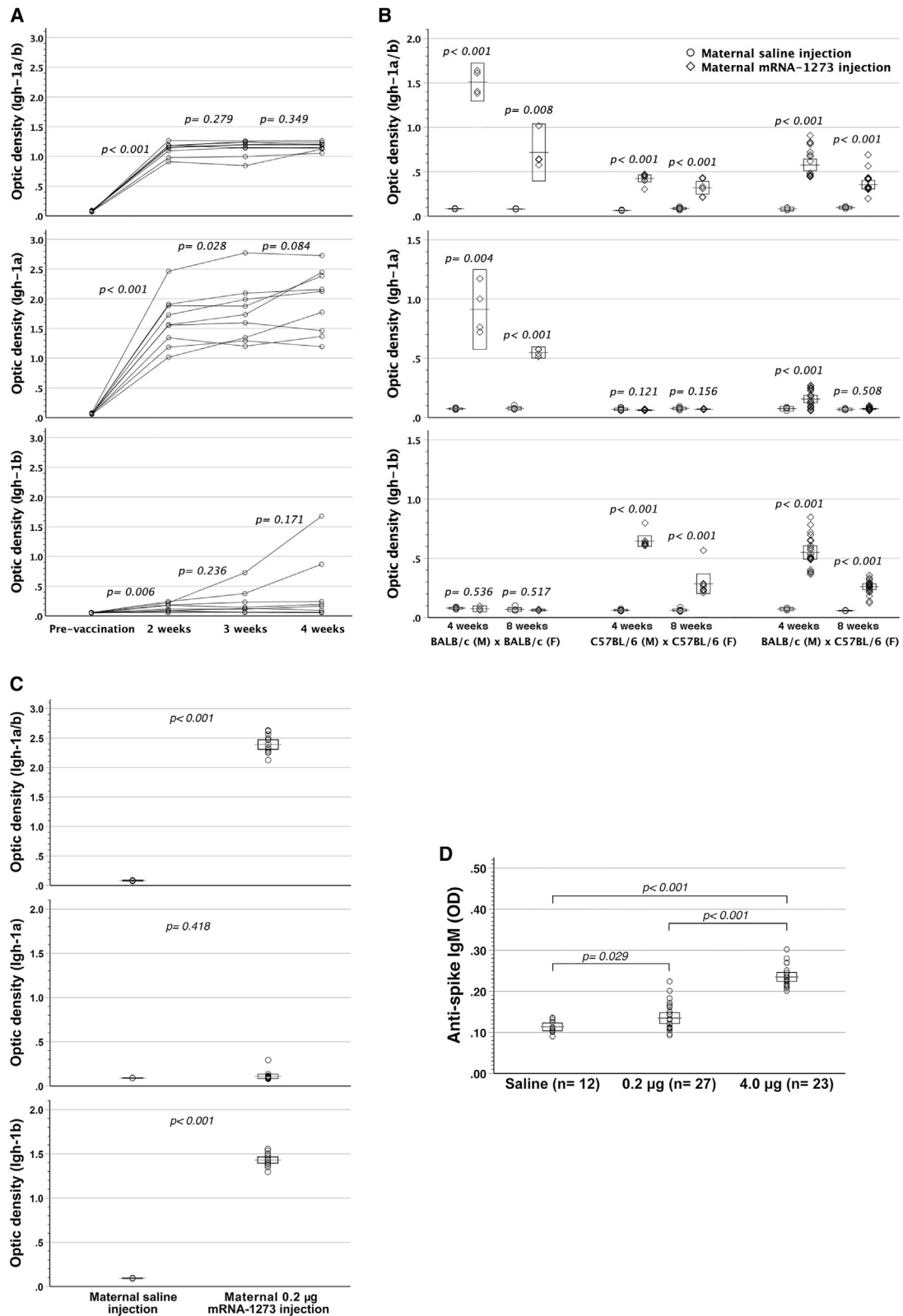
mRNA-1273 due volte, la loro prole ha generato solo una quantità minima di IgG anti-spike_{2a} dell'aplotipo Igh-1a nonostante titoli elevati di IgG anti-spike allotropico Igh-1b_{2a} nel siero (Figura 3C; Tabella S4). Questi risultati hanno evidenziato una relazione dose-risposta tra le dosi di mRNA-1273 utilizzate per vaccinare le madri e i titoli sierici di IgG anti-spike endogeni nei feti. Di conseguenza, mRNA-1273 ha avuto un effetto dose-dipendente dalla madre non solo sulla sua capacità transplacentare, ma anche sulla sua immunogenicità in termini di produttività di IgG anti-spike endogeni nei feti.

Valutazione delle IgM anti-spike e dell'immunità cellulare

Essendo impermeabile alla placenta, l'IgM anti-spike nella prole è stata misurata per riconfermare l'immunizzazione fetale tramite mRNA-1273 transplacentare. La vaccinazione materna con 0,2 o 4,0 mg di mRNA-1273 ha determinato un aumento dei livelli di IgM anti-spike nella prole all'età di 4 settimane (Figura 3D). Il mRNA-1273 ad alto dosaggio ha portato a titoli sierici più elevati di IgM anti-spike fetali rispetto a quelli a basso dosaggio. Le madri vaccinate e la loro prole sono state ulteriormente esaminate per l'immunità cellulare alla proteina spike mediante la lettura del trizio incorporato nei linfociti. Entrambi hanno dato risultati favorevoli nella proliferazione dei linfociti specifici per la proteina spike

(Figure 4A e 4B) rispetto ai rispettivi controlli con soluzione salina. Inoltre, i linfociti T che secernono interferone (IFN)- γ e interleuchina (IL)-2 reattivi alla proteina spike sono stati enumerati mediante saggio immunoenzimatico (ELISpot), dimostrando frequenze significativamente più elevate rispetto ai controlli con soluzione salina (Figure 4C e 4D). Nel complesso, la vaccinazione materna con mRNA-1273 durante la gravidanza potrebbe innescare un'immunità adattativa contro la proteina spike nelle madri e nei loro cuccioli.

Risultati immunologici dell'esposizione fetale diretta all'mRNA-1273 Per convalidare ulteriormente gli effetti immunogenici dell'mRNA-1273 sui feti pre-immuni, abbiamo sottoposto direttamente feti murini GD14 a iniezione intraperitoneale di mRNA-1273. Dopo la nascita, i feti trattati hanno mostrato titoli elevati di IgG₁ /IgG_{2a} anti-spike nel siero (Figure 5A e 5B), che sono diminuiti gradualmente nei 3 mesi successivi alla nascita. I loro linfociti hanno anche proliferato in modo specifico in risposta alla proteina spike del SARS-CoV-2 (Figure 5C) in associazione con una maggiore frequenza di cellule T secernenti IFN- γ e IL-2 reattive al spike (Figure 5D). Questi risultati hanno indicato l'immunoreattività fetale al



(legenda nella pagina successiva)

mRNA-1273 somministrato *in utero* anche prima del completo sviluppo delle cellule T.

DISCUSSIONE

La vaccinazione materna con mRNA COVID-19 durante la gravidanza ha offerto un vantaggio doppio, proteggendo sia le madri che i loro bambini.⁷ Questa protezione aggiuntiva per i neonati è stata da tempo attribuita al trasferimento transplacentare degli anticorpi anti-spike materni indotti dal vaccino,^{4,7} paragonabile alla vaccinazione materna contro l'influenza, il tetano, la difterite e la pertosse.¹⁴ In questo studio, le placente murine si sono dimostrate permeabili all'mRNA-1273 insieme alla traduzione della proteina spike decodificata dall'mRNA in feti murini GD14, che non avevano cellule T funzionalmente competenti poiché i recettori delle cellule T murine non erano espressi fino al GD17.¹⁵ Tuttavia, la trasmissione verticale dell'mRNA-1273 ha reso la vaccinazione materna con mRNA-1273 immunogenica piuttosto che tollerogena nei feti in via di sviluppo. Ciò è in linea con un evento di immunizzazione che si verifica dopo l'esposizione fetale artificiale a peptidi estranei,^{16,17} in cui i macrofagi fetali sequestravano gli antigeni endocitati e si differenziavano in cellule dendritiche per istruire cellule T ben sviluppate in una fase successiva della vita.¹⁶ Pertanto, il sistema immunitario in via di sviluppo dei feti nati da madri vaccinate con mRNA-1273 durante la gestazione continuava a svolgere un ruolo attivo nella protezione contro i patogeni.

Le placente dei mammiferi sono classificate in tipi epitelio-coriali, endotelio-coriali ed emocoriali in base agli strati cellulari che intercorrono tra la circolazione materna e quella fetale,¹⁸ noti come barriere intertermiche che influenzano la permeabilità placentare delle specie animali. Sia gli esseri umani che i topi possiedono placente emochoriali con tipi cellulari simili di trofoblasti placentari^{(19) (20)} che mediano lo scambio materno-fetale. La placentazione emochoriale è priva di barriere intertermiche dell'endometrio uterino (compresi l'epitelio, lo stroma e l'endotelio vascolare), il che porta all'immersione diretta degli strati trofoblastici fetali nel sangue materno. Ciò favorisce lo scambio di sostanze biologiche tra la madre e il feto, fornendo ai trofoblasti fetali un accesso diretto al sangue materno.⁽²¹⁾ Alla luce delle identiche barriere intertermiche presenti nella placenta, il modello murino dovrebbe essere appropriato per simulare lo scambio placentare di sostanze biologiche nell'uomo. Tuttavia, è necessario prestare attenzione nell'estrapolare i risultati della trasmissione transplacentare dell'mRNA-1273 da questo studio sui topi ai soggetti umani, poiché esiste una differenza nell'architettura istologica tra la placenta murina e quella umana, evidenziata dalla presenza di trofoblasti a tre strati (emotrichoriali) nell'interfaccia materno-fetale murina, in contrasto con i trofoblasti a strato singolo (sincytiotrofoblasti) (emomonochoriale) della placenta umana.⁽²⁰⁾ Non è chiaro

se i due strati trofoblastici supplementari presenti nella placenta murina esercitassero un impatto negativo o positivo sullo scambio materno-fetale di sostanze biologiche, per non parlare dell'mRNA-1273. Questo studio murino ha dimostrato che l'mRNA-1273 possiede una capacità transplacentare dose-dipendente nelle femmine gravide e mostra un potenziale immunogenico nei feti. Questi risultati rendono urgente la necessità di rivalutare la capacità transplacentare dell'mRNA-LNP e di chiarire lo stato di immunoreattività alla proteina spike nei feti umani o nei neonati con vaccinazione materna gestazionale contro il COVID-19. Le informazioni ottenute avranno un profondo impatto sulla strategia di vaccinazione contro il COVID-19 nei neonati nati da madri vaccinate durante la gestazione.

I vaccini a mRNA hanno mostrato buoni profili di sicurezza negli esseri umani^{1,2} e persino nelle donne in gravidanza.²²⁻²⁴ Tuttavia, i risultati positivi in termini di sicurezza ottenuti in ambito clinico non hanno potuto alleviare i timori relativi alla potenziale genotossicità, come l'integrazione genomica, l'oncogenesi o la trasmissione germinale,²⁵⁻²⁷ alimentate dalla biodistribuzione persistente dell'mRNA del vaccino^{28,29} o del suo prodotto^{30,31} negli studi post-commercializzazione. Questi risultati scomodi riflettevano in qualche modo la rapida autorizzazione all'immissione in commercio dei vaccini a mRNA con studi preclinici incompleti a causa delle urgenti esigenze sanitarie di fronte alla crisi di salute pubblica causata dalla pandemia di COVID-19.⁽²⁵⁾ Questo studio sui topi ha colmato il vuoto nella farmacocinetica transplacentare dei vaccini a mRNA, che era assente negli studi preclinici nonostante i vaccini a mRNA stessi coinvolgessero diverse nuove biotecnologie. In questa ricerca, l'mRNA-1273 non ha presentato problemi di sicurezza evidenti nelle topi gravide e nei loro piccoli. Tuttavia, la prova della trasmissione transplacentare di mRNA-1273 con ritenzione persistente di mRNA nel fegato o nella milza della prole ha inevitabilmente suscitato interesse per gli effetti genotossici dei vaccini a mRNA sul feto in via di sviluppo, dove l'aumento dell'attività di moltiplicazione e specializzazione cellulare potrebbe creare instabilità genomica^{(32) (33)} che rendono il feto vulnerabile all'integrazione di elementi genetici esogeni.^{(34) (35)} Considerando il verificarsi della retrointegrazione dell'RNA del SARS-CoV-2 nel genoma delle cellule umane,⁽²⁶⁾ non può essere trascurato il rischio di genotossicità a lungo termine nella prole nata da madri vaccinate con mRNA.

Dato il successo dei vaccini mRNA contro il COVID-19 e l'attuale panorama biotecnologico, esiste la possibilità di estendere la tecnologia mRNA-LNP alle malattie genetiche con proteine o enzimi difettosi/assenti, come la fibrosi cistica, l'acidemia propionica e

Figura 3. Analisi degli allotipi IgG_{2a} anti-spike e IgM anti-spike nei figli nati da madri vaccinate con mRNA-1273 durante la gravidanza.

(A) Dopo la vaccinazione con mRNA-1273, i topi BALB/c (Igh-1a) × C57BL/6 (Igh-1b) F1 (n = 9) hanno secreto in modo significativo IgG anti-spike_{2a} (Igh-1a/b) nel siero entro 2-4 settimane (confronto a coppie). L'allotipo Igh-1a ha dominato gli allotipi delle IgG_{2a} anti-spike. (B) Femmine C57BL/6 (F) accoppiate con maschi BALB/c (M) sono state vaccinate con 4 mg di mRNA-1273 due volte al GD14 e al GD17. Sia l'Igh-1a paterno che l'Igh-1b materno allotipico anti-spike IgG_{2a} sono risultati significativamente presenti nei topi BALB/c (M) × C57BL/6 (F) F1 a 4 settimane di età (p < 0,001), nonostante l'allotipo paterno Igh-1a non fosse rilevabile a 8 settimane di età (p = 0,508). (C) Nel caso della vaccinazione con 0,2 mg di mRNA-1273 in topi gravidi C57BL/6, la progenie F1 BALB/c × C57BL/6 (n = 17) non ha ottenuto risultati favorevoli nel siero anti-spike IgG_{2a} di Igh-1a (p = 0,418) rispetto ai controlli trattati con soluzione salina (n = 5), ma presentavano livelli significativamente più elevati di allotipo Igh-1b (p < 0,001) rispetto ai controlli all'età di 4 settimane. (D) Dopo la vaccinazione materna con 0,2 o 4,0 mg di mRNA-1273 due volte, i figli hanno mostrato livelli significativamente più elevati di IgM anti-spike nel siero all'età di 4 settimane, rispetto ai controlli con iniezione materna di soluzione salina. Inoltre, 4,0 mg di mRNA-1273 somministrati alle madri hanno indotto titoli sierici di IgM anti-spike più elevati nella prole rispetto a 0,2 mg di mRNA-1273 (p < 0,001). OD: densità ottica a 450 nm. I grafici con barre di errore mostrano le aree racchiuse in riquadri che rappresentano gli intervalli di confidenza al 95% per le medie come linee orizzontali che attraversano i riquadri.

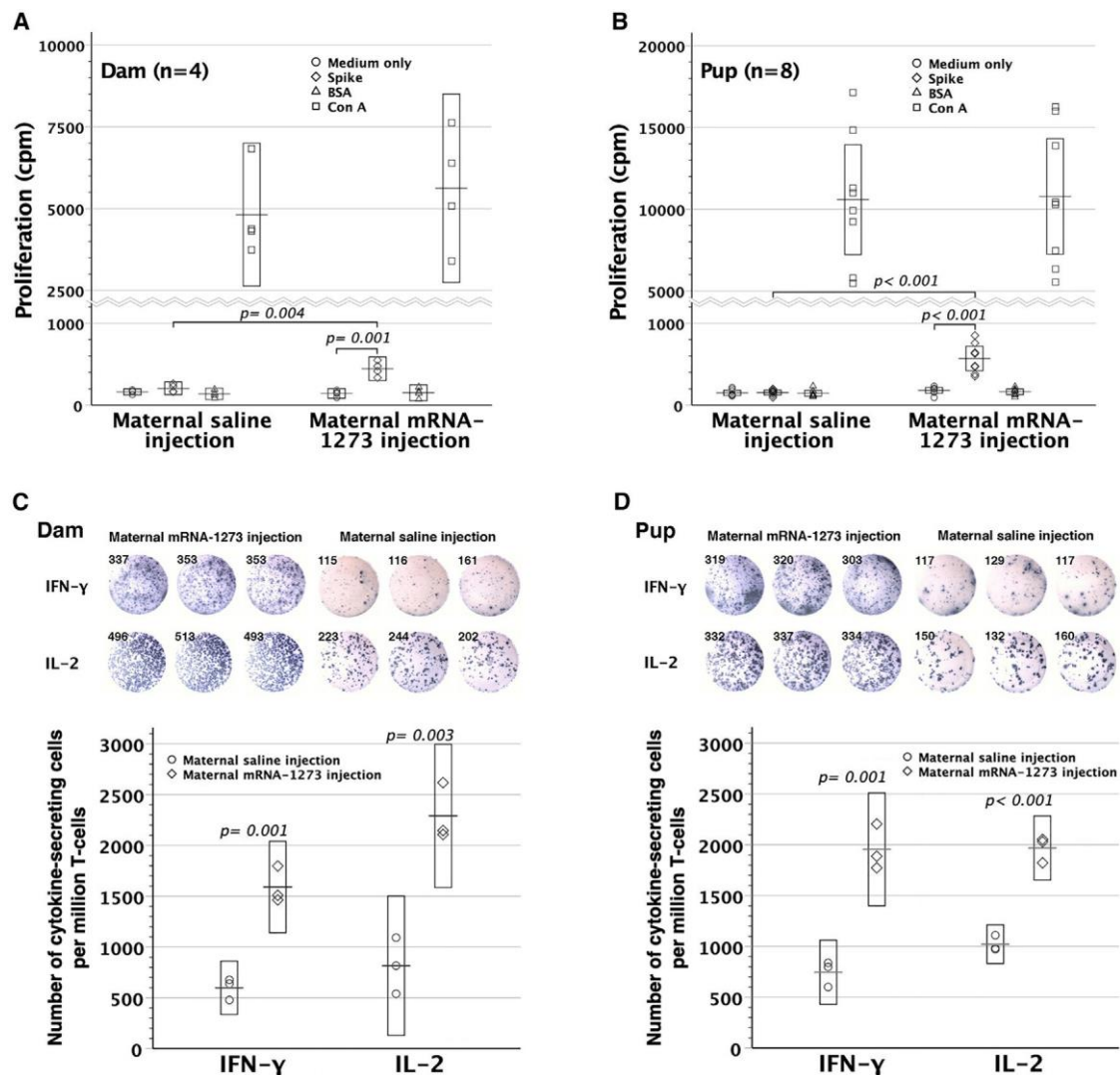


Figura 4. Immunità cellulare anti-spike nelle madri e nei loro piccoli dopo vaccinazione materna con mRNA-1273 durante la gravidanza

(A e B) Dopo la vaccinazione materna con 4 mg di mRNA-1273 somministrato due volte, le madri e i cuccioli sono stati esaminati per verificare la proliferazione dei linfociti specifici per il picco mediante la lettura del trizio incorporato *in vitro*. I linfociti splenici sia delle madri ($p = 0.001$) che dei cuccioli ($p < 0.001$) hanno proliferato in modo specifico in risposta allo spike, a differenza di quelli con iniezione materna di soluzione salina. Inoltre, le madri ($p = 0.004$) e i cuccioli ($p < 0.001$) con vaccinazione materna con mRNA-1273 hanno mostrato una proliferazione dei linfociti specifici per spike superiore rispetto ai rispettivi controlli con soluzione salina. L'albmina sierica bovina (BSA) era lo stimolatore di terze parti e il Con-A era un mitogeno per stimolare in modo non specifico i linfociti T. (C e D) Le immagini ELISpot di IFN- γ e IL-2 in triplicato mostrate provengono da una madre e un cucciolo rappresentativi con vaccinazione materna con mRNA-1273 (4 mg) o soluzione salina durante la gravidanza. Entrambi i gruppi hanno mostrato frequenze elevate di cellule T secernenti IFN- γ e IL-2 rispetto ai rispettivi controlli. I grafici con barre di errore mostrano le aree racchiuse in riquadri che rappresentano gli intervalli di confidenza al 95% per le medie, sotto forma di linee orizzontali che attraversano i riquadri.

fenilchetonuria.³ Queste malattie candidate, se diagnosticate prima della nascita, possono essere gestite con terapie prenatali a base di mRNA prima dell'insorgenza o nella fase iniziale della patologia irreversibile, al fine di ridurre al minimo la morbidità e la mortalità associate alla malattia e ottenere un'elevata efficacia terapeutica. In considerazione del passaggio transplacentare dell'mRNA-1273, l'esigenza non soddisfatta delle terapie con mRNA fetale potrebbe essere soddisfatta semplicemente attraverso la somministrazione materna di mRNA-LNP in assenza di danni per le madri, ma la potenziale immunogenicità dei peptidi decodificati dall'mRNA deve essere presa in considerazione anche nei feti preimmuni

. Tuttavia, è bene notare che la capacità delle LNP di trasportare l'mRNA e di accumularsi nei tessuti o negli organi desiderati varia a seconda delle modifiche chimiche delle LNP.^{12,36} Pertanto, le modifiche degli eccipienti lipidici utilizzati nelle formulazioni di mRNA-LNP potrebbero influenzare la loro capacità transplacentare e richiedere una valutazione delle loro proprietà transplacentari.

In questa era della medicina basata sull'mRNA, le nuove conoscenze sulla farmacocinetica transplacentare dei vaccini a mRNA e sul potenziale immunogenico

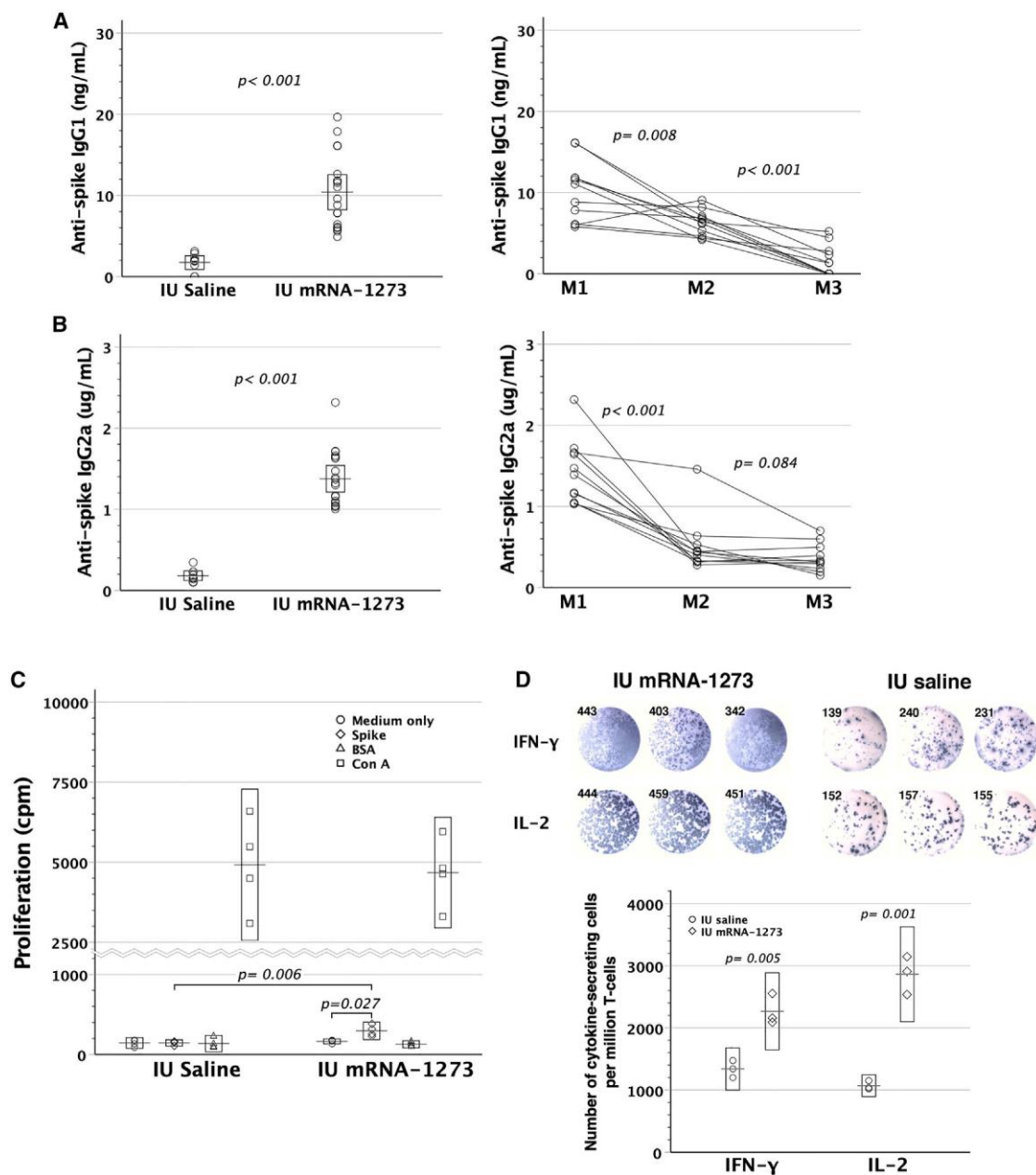


Figura 5. Conseguenze immunologiche dell'iniezione *in utero* di mRNA-1273

I feti GD14 FVB/N sono stati sottoposti a iniezione intraperitoneale di mRNA-1273 (IU mRNA-1273, $n = 19$). (A e B) Dopo la nascita, è stato esaminato il siero anti-spike IgG₍₁₎/IgG_(2a) all'età di 1 mese. IU mRNA-1273 ha portato a titoli significativamente più elevati di anti-spike IgG₍₁₎/IgG_(2a) rispetto all'iniezione *intrauterina* di soluzione salina (IU soluzione salina, $n = 9$). Gli IgG₍₁₎/IgG_(2a) anti-spike sierici sono diminuiti gradualmente nei 3 mesi successivi alla nascita. I cerchi collegati da una linea rappresentano i livelli di IgG₍₁₎/IgG_(2a) misurati a 1 (M1), 2 (M2) e 3 (M3) mesi di età in un singolo topo ($n = 11$). (C) La proliferazione dei linfociti in risposta alla proteina spike è stata misurata mediante la lettura del trizio incorporato ($n = 4$) come conteggio al minuto (cpm). Come controlli di fondo è stato utilizzato solo il mezzo, come stimolatori di terze parti è stata utilizzata la BSA e come mitogeno per stimolare la popolazione di cellule T è stato utilizzato il Con-A. IU mRNA-1273 ha proliferato in modo significativo in risposta alla proteina spike ($p < 0,027$), mentre IU soluzione salina ($n = 4$) non ha mostrato proliferazione linfocitaria sotto stimolazione con la proteina spike. È stata osservata una differenza significativa nella proliferazione linfocitaria sotto stimolazione con la proteina spike tra IU mRNA-1273 e IU soluzione salina ($p < 0,006$). I rettangoli all'interno di un set di dati rappresentano gli intervalli di confidenza al 95% per le medie, che sono mostrati come linee trasversali che attraversano i rettangoli. (D) Le cellule dei linfociti splenici che secernono IFN- γ e IL-2 reattive alla proteina spike sono state enumerate mediante ELISpot. Le figure mostrano i punti con i relativi conteggi dei topi rappresentativi trattati con IU mRNA-1273 e IU soluzione salina. La frequenza delle cellule T che secernono IFN- γ e IL-2 reattive alla proteina Spike è stata calcolata dalla media dei risultati ELISpot (triplicati) divisa per il rapporto tra cellule CD3⁺ e dei linfociti splenici in ciascun singolo topo.

delle proteine decodificate dall'mRNA nei feti potrebbe far progredire le nostre conoscenze per proteggere meglio i nascituri dai patogeni nella vita perinatale e ampliare i nostri orizzonti nella terapia prenatale con mRNA.

MATERIALI E METODI

Topi

Topi inbred FVB/N, BALB/c (Igh-1a di IgG_{2a}, regione costante g2a) e C57BL/6 (Igh-1b di IgG_{2a}, regione costante g2a) sono stati acquistati dal National Laboratory Animal Center (Taipei, Taiwan) all'età di 6-8 settimane. Gli animali sono stati ospitati nella struttura di cura degli animali del Chang Gung Memorial Hospital (CGMH) secondo le linee guida standard della "Guida per la cura e l'uso degli animali da laboratorio" e con l'approvazione del Comitato per la ricerca sugli animali del CGMH. Le femmine sono state messe in gabbia con i maschi nel pomeriggio e controllate per verificare la presenza di tappi vaginali il mattino seguente. Il giorno in cui è stato osservato il tappo è stato designato come giorno 0 della gravidanza.

Prelievo dei tessuti fetali

Sotto anestesia per topi gravidi, è stata eseguita una laparotomia mediana per esporre gli uteri. I feti sono stati espulsi tramite isterotomia e immediatamente lavati con soluzione salina. Dopo la decapitazione, il sangue fetale è stato raccolto con pipette. Quindi sono stati prelevati la placenta fetale, il fegato e i tessuti molli del tronco. I campioni sono stati conservati in soluzione RNAlater a -80 °C per analisi successive o sottoposti a omogeneizzazione in solventi organici quali etanolo o dimetilsolfossido (DMSO) per l'estrazione con PEG.

Vaccinazione con mRNA-1273 in topi gravidi

Topi gravidi hanno ricevuto un'iniezione intramuscolare (nella coscia) di mRNA-1273 nei giorni GD14 e GD17, ciascuno alla stessa dose di 0,2, 1, 2 o 4 mg, diluito in 100 µL di soluzione salina. Dopo il parto, sono stati prelevati periodicamente campioni di siero dalle madri e dalla loro prole per analisi sperimentali a valle. Per tracciare il componente mRNA-1273 nei feti, è stata somministrata una singola dose di 0,2 o 4 mg di mRNA-1273 per via intramuscolare alle madri al 14° giorno di gestazione. I feti sono stati poi partoriti con taglio cesareo nei momenti indicati dopo la vaccinazione materna per raccogliere i tessuti fetali e le placente per le analisi successive.

Iniezione *in utero* di mRNA-1273

Sotto anestesia, gli uteri di topi gravidi GD14 sono stati esposti tramite laparotomia verticale. Una micropipetta di vetro da 60 µm con punta smussata è stata utilizzata per iniettare 0,05-0,1 mg di mRNA-1273 in 5 µL di soluzione salina nelle cavità peritoneali di tutti i feti di una figliata tramite approccio transuterino. I topi di controllo hanno ricevuto un'iniezione *intrauterina* di soluzione salina. L'addome dei topi è stato chiuso in due strati con sutura di seta 5-0. Successivamente, i topi sono stati alloggiati in una stanza tranquilla senza cambi di lettiera per 1 settimana. I cuccioli sono stati svezzati all'età di 3 settimane.

Test immunodot blot per rilevare LNP di mRNA-1273

Questo metodo è stato modificato dal test fat blot di Munnik e Wierchowicka³⁷ per rilevare in modo semiquantitativo le mRNA-LNP. Il siero di topo e l'mRNA-1273 diluito in serie (1 µL per ciascun campione) sono stati applicati su una membrana di nitrocellulosa (0,45 NC, Amer-

sham Protran). La membrana è stata prima bloccata con latte al 5% in soluzione salina tri-tamponata contenente 0,05% Tween 20 (TBST) per 1 ora su un agitatore rotante e quindi incubata con anticorpo anti-poli(etil)englicole (PEG) (1:3.000, PEG-B-47, ab51257, Abcam, che reagisce solo con forme coniugate) per 2 ore. Dopo tre lavaggi con TBST, la membrana è stata trattata con IgG di capra anti-coniglio coniugato con perossidasi (1:5.000, AP132P, Sigma-Aldrich) per 2 ore, seguito da substrato HRP chemiluminescente Immobilon Western (Millipore) per 2 minuti. Infine, i blot sono stati sottoposti a rilevamento mediante imaging chemiluminescente (UVP Chemstudio). I controlli positivi erano diluizioni seriali doppie di mRNA-1273, mentre i controlli negativi includevano soluzione salina e sieri materni/dei cuccioli raccolti dopo l'iniezione di soluzione salina nella madre.

RT-PCR e a per quantificare l' spike

L'mRNA è stato isolato da campioni di tessuto di feti con vaccinazione materna con mRNA-1273 utilizzando il GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) secondo il protocollo del produttore. La concentrazione di RNA è stata determinata utilizzando Nanodrop. Campioni di RNA di 500 ng sono stati trascritti in cDNA utilizzando il PrimeScript RT Reagent Kit (TaKaRa Bio). I primer utilizzati per rilevare il cDNA target erano i seguenti: (10,38) Primer diretto: AACGCCACCAACGTGGTCATC. Primer inverso: GTTGTGGCGCTGCTGTACAC. PCR in tempo reale Bio-Rad iQ5. Per la PCR sono stati utilizzati il sistema di rilevamento e il mix 2xSYBR qPCR (BioTools): 30 secondi a 95 °C, seguiti da 40 cicli di 5 secondi a 95 °C e 20 secondi a 60 °C. Tutti i campioni (2 µL) sono stati analizzati in duplicato in reazioni da 20 µL. Per l'impostazione delle curve standard dell'mRNA spike, il cDNA trascritto in modo inverso da 100 ng/mL di mRNA-1273 è stato diluito in serie in un rapporto 1:2. Queste diluizioni seriali triplicate di campioni di cDNA da 2 µL sono state ulteriormente diluite a 10x e fino a 20 µL (corrispondenti a 10⁽⁻⁴⁾ — 0,0021 pg/mL di mRNA spike) nell'amplificazione PCR. I risultati negativi sono stati determinati dai valori Ct dei campioni di tessuto dei feti con iniezione materna di soluzione salina.

Determinazione delle IgG anti-spike sieriche 1, IgG_{2a} e IgM nel siero. Le piastre da microtitolazione ELISA (Corning, Corning, NY, USA) sono state prima rivestite con 25 ng/mL e 50 ng/mL di proteina spike SARS-CoV-2 (GTx02774-pro, GeneTex) rispettivamente per la misurazione dei livelli di IgG₁ e IgG_{2a}/IgM anti-spike nel siero di topo. I pozzetti sono stati bloccati con albumina sierica bovina al 3% (BSA, Sigma-Aldrich) in PBS e incubati con 100 µL di campioni diluiti. In ciascun pozzetto, per la rilevazione delle IgG₍₁₎ è stato utilizzato anti-IgG₍₁₎ biotinilato (Clone RMG1-1, BioLegend, San Diego, CA, USA), mentre per la rilevazione delle IgG_{2a} è stato utilizzato anti-IgG_(2a) biotinilato (Clone RMG2a-62, BioLegend) e anti-IgM biotinilato anti-topo (Clone RMM-1, BioLegend) per la rilevazione delle IgG_(2a) e IgM_{2a} (Clone RMG2a-62, BioLegend) per il rilevamento delle IgG_{2a} e anti-IgM biotinilato (Clone RMM-1, BioLegend) per il rilevamento delle IgM. Successivamente, è stata aggiunta streptavidina-perossidasi di rafano (HRP, Sigma-Aldrich) ai pozzetti. Quindi, la reazione è stata sviluppata aggiungendo 100 µL di substrato NeA-blue tetrametilbenzidina (TMB) (Clinical Science Products, Mansfield, MA, USA) e arrestata con 2M H₂SO₍₄₎. La densità ottica a 450 nm è stata letta utilizzando un lettore ELISA. I livelli sierici di IgG₍₁₎ e IgG_{2a} nel siero sono stati determinati mediante le curve standard dell'anticorpo monoclonale murino anti-SARS-CoV-2 spike IgG₁ (1A9, GTx632604, GeneTex) e dell'anticorpo monoclonale murino anti-SARS-CoV-1/2 S Protein IgG_{2a} (clone 2B3E5, Sigma-Aldrich).

rispettivamente. I titoli sierici di IgM anti-spike sono stati registrati come valori di densità ottica.

Determinazione degli allotipi anti-spike IgG_{2a}

Gli allotipi IgH-1a e IgH-1b delle IgG_{2a} sono stati utilizzati per esaminare se i cuccioli (BALB/c [IgH-1a] maschi× C57BL/6 [IgH-1b] femmine, F1) generavano IgG anti-spike endogene_{2a} dopo vaccinazione intramuscolare materna con 0,2 o 4,0 mg di mRNA-1273, rispettivamente, al GD14 e al GD17 durante la gravidanza. L'ELISA è stato eseguito come descritto sopra, utilizzando 10 campioni di siero diluito× trattati con anticorpi primari di IgG_{2a} anti-topo biotinilato (1:20.000, clone RMG2a-62, che reagisce con entrambi gli apotipi IgH-1a e IgH-1b [IgH-1a/b]), biotinilato anti-IgH-1a murino (1:2.000, clone 8.3, BD Pharmingen) o biotinilato anti-IgH-1b murino (1:2.000, clone 5.7, BD Pharmingen), rispettivamente. Il colore sviluppato è stato letto alla densità ottica di 450 nm. I controlli includevano topi BALB/c (maschi)× BALB/c (femmine) e C57BL/6 (maschi)× C57BL/6 (femmine) F1.

Quantificazione del PEG mediante ELISA sandwich

Il siero o il supernatante degli omogenati tissutali dei feti murini sono stati sottoposti a quantificazione del PEG mediante kit ELISA (Life Diagnostics, Cat. #: MPEG) con l'anticorpo di cattura specifico per la struttura del PEG e l'anticorpo di rilevamento per il gruppo metossilico terminale del lipide PEGilato del vaccino. Questo ELISA sandwich è stato condotto secondo le istruzioni del produttore.

Risposte proliferative dei linfociti alla proteina spike

Le milze sono state prelevate da topi (di 6-8 settimane di età) con vaccinazione materna con mRNA-1273 durante la gravidanza. I linfociti splenici sono stati arricchiti mediante centrifugazione a gradiente di densità e quindi coltivati in triplicato, ciascuno con 2×10^5 cellule in 200 mL di terreno RPMI 1640 contenente 10% di siero fetale bovino in piastre a 96 pozzetti. I linfociti responder sono stati coltivati solo in terreno di coltura come controlli di fondo e stimolati con proteina spike SARS-CoV-2 (1 mg/mL), stimolatore di terze parti BSA (100 ng/mL) o mitogeno non specifico Con-A (1 mg/mL). Per misurare la proliferazione dei linfociti, le cellule del quinto giorno sono state prima sottoposte a incubazione per 16 ore con timidina triziata (ICN Biomedicals) a una concentrazione finale di 1 mCi per pozzetto e poi raccolte per contare il trizio incorporato in un contatore a scintillazione liquida (contatore 1450 Microbeta Plus). La proliferazione dei linfociti è stata determinata dalla lettura del trizio incorporato come conteggio al minuto. I controlli erano costituiti dai topi con iniezione materna di soluzione salina.

Test ELISpot per IFN- γ e IL-2

Le cellule T murine secernenti IFN- γ /IL-2 sono state quantificate mediante kit ELISpot per IFN- γ e IL-2 di topo secondo le istruzioni del produttore (R&D Systems). In breve, i linfociti splenici di ciascun animale sono stati arricchiti mediante centrifugazione a gradiente di densità e quindi esaminati per le frazioni di cellule T CD3 mediante citometria a flusso dopo il trattamento con anticorpi anti-CD3 coniugati con fluorescenza (BioLegend). I pozzetti delle micropiastre sono stati prima risciacquati con terreno di coltura RPMI 1640 contenente siero fetale bovino al 10% per 20 minuti a temperatura ambiente. Quindi, le cellule sono state caricate nei pozzetti in triplicato a

una dose di 10^6 /100 mL di terreno di coltura per pozzetto e incubate in un incubatore umidificato a 37 °C CO₂ per 2 giorni sotto stimolazione della proteina spike SARS-CoV-2 (1 mg/mL, GTX02774-pro, GeneTex). Le piastre sono state lavate quattro volte con tampone di lavaggio e incubate con una miscela di anticorpi di rilevamento diluiti (100 mL/pozzetto) per 2 ore a temperatura ambiente su una piattaforma oscillante. Dopo il lavaggio, le piastre sono state incubate con Streptavidin-AP Concentrate A diluito (100 mL/pozzetto) per 2 ore. Il lavaggio finale è stato seguito dal trattamento con substrato BCIP/NBT per 1 ora. Dopo aver decantato il cromogeno, le piastre sono state lavate con acqua deionizzata e asciugate a temperatura ambiente. Le piastre sono state scansionate e contate su un analizzatore immunospot (Cellular Technologies Ltd). I valori delle cellule T secernenti IFN- γ /IL-2 reattive allo spike in ciascun topo sono stati divisi per la frazione di cellule T CD3+ i nella milza per stimarne la frequenza per milione di cellule T.

Test di neutralizzazione con pseudovirus spike SARS-CoV-2

Le cellule HEK-293T che esprimono stabilmente ACE2 umano (cellule 293T-ACE2) sono state coltivate in piastre a 96 pozzetti (6×10^4 cellule/pozzetto) a 37 °C con 5% di CO₂ per 24 ore. Diluizioni seriali doppie di sieri di topo sono state miscelate con lentivirus pseudotipizzati SARS-CoV-2 wild-type contenenti il gene luciferasi (4.000 unità di infezione relative), forniti da RNA Technology Platform and Gene Manipulation Core, Academia Sinica, in DMEM con 1% di siero fetale bovino (FBS) a 37 °C per 1 o 2 ore. Successivamente, le miscele di siero-pseudovirus sono state aggiunte a cellule 293T-ACE2, che sono state incubate a 37 °C con 5% di CO₂ per 24 ore e in DMEM con 10% di FBS per altre 24 ore. L'attività della luciferasi è stata determinata mediante il kit Bright-Glo Luciferase Assay (Promega, Madison, WI, USA) e il lettore di micropiastre Synergy 2 (BioTek, Winooski, VT, USA).⁽³⁹⁾ Il titolo di neutralizzazione è stato determinato dalla diluizione sierica più elevata che ha ridotto l'infettività virale di almeno il 50%, rispetto ai corrispondenti pozzetti di controllo senza aggiunta di sieri.

Esame istologico di mRNA-LNP e proteina spike mediante colorazione immunofluorescente

I feti sono stati fissati in paraformaldeide al 4% durante la notte e incorporati in paraffina. Le sezioni di tessuto sono state deparaffinizzate, reidratate e quindi sottoposte a recupero dell'antigene indotto dal calore. Dopo permeabilizzazione con Tween 20 e blocco con BSA all'1%, le sezioni sono state incubate con anticorpi primari contro PEG (1:100, PEG-B-47, ab51257, Abcam) e proteina spike (1:100, mAb chimerico, D001, MBS8119537) per 1,5 ore, seguiti da IgG anti-coniglio fluorescenza-coniugato (1:100, Poly4064, BioLegend) e IgG anti-umano di ratto Fc (1:100, M1310G05, BioLegend). La visualizzazione dei nuclei è stata ottenuta mediante colorazione con Hoechst 33342 (1:20.000, Invitrogen). Le sezioni sono state montate con mezzo di montaggio per fluorescenza Dako. Le immagini sono state acquisite utilizzando un microscopio confocale.

Analisi statistiche

Tutti i grafici con barre di errore sono stati riportati come intervalli di confidenza al 95% (aree racchiuse in riquadri) per le medie (linee trasversali che attraversano i riquadri) insieme ai punti dati sovrapposti dei singoli topi. L'uguaglianza delle medie è stata esaminata mediante il test t di Student tra due gruppi indipendenti o appaiati, oppure mediante analisi della varianza a una via (ANOVA)

tra tre o più gruppi con confronti multipli post hoc di Fisher (LSD). Le differenze sono state considerate significative in tutti i test con $p < 0,05$.

DISPONIBILITÀ DEI DATI E DEL CODICE

- I dati riportati in questo articolo saranno condivisi dall'autore corrispondente su richiesta.
- Qualsiasi informazione aggiuntiva necessaria per riallacciare i dati riportati in questo articolo è disponibile su richiesta all'autore corrispondente.

RINGRAZIAMENTI

Un ringraziamento speciale va a Shiang-Chi Chen per la realizzazione dell'abstract grafico. Shiang-Chi Chen sta attualmente studiando per conseguire un Master of Fine Arts (MFA) in Visual Development presso l'Academy of Art University di San Francisco, California, USA.

Questo progetto è stato finanziato da NSTC-112-2314-B-182-033 (J.-C.C.) e NSTC-113-2321-B-182-003 (C.-H.C.) del Consiglio Nazionale per la Scienza e la Tecnologia (NSTC) di Taiwan e CMRPG3N0931 (J.-C.C.) della Chang Gung Medical Foundation.

CONTRIBUTI DEGLI AUTORI

J.-C.C. ha ideato questo studio, ottenuto i finanziamenti, eseguito l'iniezione *in utero*, analizzato i dati, preparato le figure e scritto il manoscritto. M.-H.H. ha condotto tutti gli esperimenti di immunoanalisi e RT-PCR. R.-L.K. e L.-T.W. hanno eseguito il test di neutralizzazione del pseudovirus. M.-L.K. ha contribuito alla progettazione degli esperimenti sugli allotipi anti-spike IgG_{2a}. L.-Y.T. e H.-L.C. hanno eseguito l'immunoistochimica e hanno assistito negli esperimenti e nella chirurgia animale, nonché nella cura degli animali. C.-H.C. ha ideato questo studio, ha ottenuto i finanziamenti, ha assistito nell'analisi dei dati, ha supervisionato e coordinato la ricerca complessiva e ha curato la revisione del manoscritto.

DICHIARAZIONE DI INTERESSI

Gli autori dichiarano l'assenza di conflitti di interesse.

INFORMAZIONI AGGIUNTIVE

Ulteriori informazioni sono disponibili online all'indirizzo <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2025.102489>.

RIFERIMENTI

1. Baden, L.R., El Sahly, H.M., Essink, B., Kotloff, K., Frey, S., Novak, R., Diemert, D., Spector, S.A., Rouphael, N., Creech, C.B., et al. (2021). Efficacia e sicurezza del vaccino mRNA-1273 SARS-CoV-2. *N. Engl. J. Med.* **384**, 403–416.
2. Polack, F.P., Thomas, S.J., Kitchin, N., Absalon, J., Gurtman, A., Lockhart, S., Perez, J.L., Pérez Marc, G., Moreira, E.D., Zerbini, C., et al. (2020). Sicurezza ed efficacia del vaccino BNT162b2 mRNA Covid-19. *N. Engl. J. Med.* **383**, 2603–2615.
3. Qin, S., Tang, X., Chen, Y., Chen, K., Fan, N., Xiao, W., Zheng, Q., Li, G., Teng, Y., Wu, M., e Song, X. (2022). Terapie basate sull'mRNA: strumenti potenti e versatili per combattere le malattie. *Signal Transduct. Targeted Ther.* **7**, 166.
4. Gray, K.J., Bordt, E.A., Atyeo, C., Deriso, E., Akinwunmi, B., Young, N., Baez, A.M., Shook, L.L., Cvrk, D., James, K., et al. (2021). Risposta al vaccino contro la malattia da coronavirus 2019 nelle donne in gravidanza e in allattamento: uno studio di coorte. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **225**, 303.e1–303.e17.
5. Jamieson, D.J., e Rasmussen, S.A. (2022). Aggiornamento su COVID-19 e gravidanza. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **226**, 177–186.
6. Halasa, N.B., Olson, S.M., Staat, M.A., Newhams, M.M., Price, A.M., Pannaraj, P.S., Boom, J.A., Sahni, L.C., Chiotos, K., Cameron, M.A., et al. (2022). Vaccinazione materna e rischio di ospedalizzazione per Covid-19 tra i neonati. *N. Engl. J. Med.* **387**, 109–119.
7. Rasmussen, S.A., e Jamieson, D.J. (2022). Vaccinazione contro il Covid-19 durante la gravidanza: due al prezzo di uno. *N. Engl. J. Med.* **387**, 178–179.
8. Swingle, K.L., Safford, H.C., Geisler, H.C., Hamilton, A.G., Thatte, A.S., Billingsley, M.M., Joseph, R.A., Mrksich, K., Padilla, M.S., Ghalsasi, A.A., et al. (2023). Nanoparticelle lipidiche ionizzabili per il rilascio in vivo di mRNA alla placenta durante la gravidanza. *J. Am. Chem. Soc.* **145**, 4691–4706.
9. Santos, A., Sauer, M., Neil, A.J., Solomon, I.H., Hornick, J.L., Roberts, D.J., Quade, B.J., e Parra-Herran, C. (2022). Assenza dell'espressione della glicoproteina Spike SARS-CoV-2 nelle placente di individui dopo la vaccinazione con mRNA SARS-CoV-2. *Mod. Pathol.* **35**, 1175–1180.
10. Prah, M., Golan, Y., Cassidy, A.G., Matsui, Y., Li, L., Alvarenga, B., Chen, H., Jigmeddagva, U., Lin, C.Y., Gonzalez, V.J., et al. (2022). Valutazione del trasferimento transplacentare di prodotti vaccinali a mRNA e anticorpi funzionali durante la gravidanza e l'infanzia. *Nat. Commun.* **13**, 4422.
11. (CHMP), C.F.M.P.f.H.U. (2021). Spikevax (precedentemente COVID-19 Vaccine Moderna): EPAR - Relazione pubblica di valutazione (Agenzia europea per i medicinali). EMA/15689/2021.
12. Riley, R.S., Kashyap, M.V., Billingsley, M.M., White, B., Alameh, M.G., Bose, S.K., Zoltick, P.W., Li, H., Zhang, R., Cheng, A.Y., et al. (2021). Nanoparticelle lipidiche ionizzabili per la somministrazione di mRNA in utero. *Sci. Adv.* **7**, eaba1028.
13. Pardi, N., Tüysishime, S., Muramatsu, H., Kariko, K., Mui, B.L., Tam, Y.K., Madden, T.D., Hope, M.J., e Weissman, D. (2015). Cinetica di espressione dell'mRNA modificato con nucleosidi somministrato in nanoparticelle lipidiche a topi attraverso varie vie. *J. Contr. Release* **217**, 345–351.
14. Etti, M., Calvert, A., Galiza, E., Lim, S., Khalil, A., Le Doare, K. e Heath, P.T. (2022). Vaccinazione materna: una revisione delle prove attuali e delle raccomandazioni. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **226**, 459–474.
15. Snodgrass, H.R., Kisielow, P., Kiefer, M., Steinmetz, M. e von Boehmer, H. (1985). Ontogenesi del recettore dell'antigene delle cellule T nel timo. *Nature* **313**, 592–595.
16. Chen, J.C., Chan, C.C., Wu, C.J., Ou, L.S., Yu, H.Y., Chang, H.L., Tseng, L.Y. e Kuo, M.L. (2016). I fagociti fetali assorbono gli allergeni per avviare l'immunità delle cellule T helper di tipo 2 e facilitare le risposte allergiche delle vie aeree. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **194**, 934–947.
17. Chen, J.C., Ou, L.S., Kuo, M.L., Tseng, L.Y. e Chang, H.L. (2020). L'esposizione fetale all'oncoantigene ha indotto un'immunità adattativa antigene-specifica contro la tumorigenesi. *J. Immunother. Cancer* **8**, e000137.
18. Furukawa, S., Kuroda, Y. e Sugiyama, A. (2014). Confronto tra la struttura istologica dell' e della placenta in animali da laboratorio. *J. Toxicol. Pathol.* **27**, 11–18.
19. Malassine, A., Frendo, J.L., ed Evain-Brion, D. (2003). Confronto tra lo sviluppo placentare e le funzioni endocrine nel modello umano e murino. *Hum. Reprod. Update* **9**, 531–539.
20. Dilworth, M.R., e Sibley, C.P. (2013). Revisione: Trasporto attraverso la placenta di topi e donne. *Placenta* **34**, S34–S39.
21. Enders, A.C., e Carter, A.M. (2004). Cosa ci possono dire gli studi comparativi sulla struttura dell' e placentare? – Una revisione. *Placenta* **25**, S3–S9.
22. Shimabukuro, T.T., Kim, S.Y., Myers, T.R., Moro, P.L., Oduyibo, T., Panagiotakopoulos, L., Marquez, P.L., Olson, C.K., Liu, R., Chang, K.T., et al. (2021). Risultati preliminari sulla sicurezza del vaccino mRNA Covid-19 nelle donne in gravidanza. *N. Engl. J. Med.* **384**, 2273–2282.
23. Zauche, L.H., Wallace, B., Smoots, A.N., Olson, C.K., Oduyibo, T., Kim, S.Y., Petersen, E.E., Ju, J., Beauregard, J., Wilcox, A.J., et al. (2021). Somministrazione di vaccini a mRNA contro il Covid-19 e rischio di aborto spontaneo. *N. Engl. J. Med.* **385**, 1533–1535.
24. DeSilva, M., Haapala, J., Vazquez-Benitez, G., Vesco, K.K., Daley, M.F., Getahun, D., Zerbo, O., Naleway, A., Nelson, J.C., Williams, J.T.B., et al. (2022). Valutazione degli eventi avversi acuti dopo la vaccinazione contro il Covid-19 durante la gravidanza. *N. Engl. J. Med.* **387**, 187–189.
25. Banoun, H. (2023). mRNA: vaccino o terapia genica? Le questioni relative alla sicurezza normativa. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 10514.
26. Zhang, L., Richards, A., Barrasa, M.I., Hughes, S.H., Young, R.A. e Jaenisch, R. (2021). L'RNA SARS-CoV-2 sottoposto a trascrizione inversa può integrarsi nel genoma delle cellule umane in coltura ed essere espresso nei tessuti derivati dai pazienti. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **118**, e2105968118.
27. Guerriaud, M. e Kohli, E. (2022). Farmaci a base di RNA e regolamentazione: verso un' e evoluzione delle definizioni emanate dalla legislazione dell'Unione Europea. *Front. Med.* **9**, 1012497.
28. Roltgen, K., Nielsen, S.C.A., Silva, O., Younes, S.F., Zaslavsky, M., Costales, C., Yang, F., Wirz, O.F., Solis, D., Hoh, R.A., et al. (2022). Imprinting immunitario, ampiezza del

- riconoscimento delle varianti e risposta del centro germinativo nell'infezione da SARS-CoV-2 e nella vaccinazione nell'uomo. *Cell* 185, 1025–1040.e1014.
29. Fertig, T.E., Chitoiu, L., Marta, D.S., Ionescu, V.S., Cismasiu, V.B., Radu, E., Angheluta, G., Dobre, M., Serbanescu, A., Hinescu, M.E., e Gherghiceanu, M. (2022). Il mRNA del vaccino può essere rilevato nel sangue 15 giorni dopo la vaccinazione. *Biomedicine* 10, 1538.
 30. Ogata, A.F., Cheng, C.A., Desjardins, M., Senussi, Y., Sherman, A.C., Powell, M., Novack, L., Von, S., Li, X., Baden, L.R., e Walt, D.R. (2022). Antigene vaccinale del coronavirus 2 della sindrome respiratoria acuta grave (SARS-CoV-2) circolante rilevato nel plasma di soggetti vaccinati con mRNA-1273. *Clin. Infect. Dis.* 74, 715–718.
 31. Yonker, L.M., Swank, Z., Bartsch, Y.C., Burns, M.D., Kane, A., Boribong, B.P., Davis, J.P., Loiselle, M., Novak, T., Senussi, Y., et al. (2023). Proteina Spike circolante rilevata nella miocardite post-vaccino mRNA COVID-19. *Circulation* 147, 867–876.
 32. Munisha, M., e Schimenti, J.C. (2021). Mantenimento del genoma durante l'embriogenesi. *DNA Repair* 106, 103195.
 33. Comaills, V., Kabeche, L., Morris, R., Buisson, R., Yu, M., Madden, M.W., LiCausi, J.A., Boukhali, M., Tajima, K., Pan, S., et al. (2016). L'instabilità genomica è indotta dalla proliferazione persistente di cellule che subiscono una transizione epiteliale-mesenchimale. *Cell Rep.* 17, 2632–2647.
 34. Mohrenweiser, H., e Zingg, B. (1995). Mosaicismo: l'embrione come bersaglio per l'induzione di mutazioni che portano al cancro e alle malattie genetiche. *Environ. Mol. Mutagen.* 25 Suppl 26, 21–29.
 35. Bose, S.K., Menon, P. e Peranteau, W.H. (2021). Terapia genica in utero: progressi, sfide e prospettive. *Trends Mol. Med.* 27, 728–730.
 36. Trepotec, Z., Lichtenegger, E., Plank, C., Aneja, M.K. e Rudolph, C. (2019). Somministrazione di terapie a base di mRNA per il trattamento delle malattie epatiche. *Mol. Ther.* 27, 794–802.
 37. Munnik, T., e Wierchowicka, M. (2013). Analisi del legame dei lipidi mediante un test fat blot. *Methods Mol. Biol.* 1009, 253–259.
 38. Golan, Y., Prael, M., Cassidy, A., Lin, C.Y., Ahituv, N., Flaherman, V.J., e Gaw, S.L. (2021). Valutazione dell'RNA messaggero dei vaccini COVID-19 BTN162b2 e mRNA-1273 nel latte umano. *JAMA Pediatr.* 175, 1069–1071.
 39. Liu, K.T., Gong, Y.N., Huang, C.G., Huang, P.N., Yu, K.Y., Lee, H.C., Lee, S.C., Chiang, H.J., Kung, Y.A., Lin, Y.T., et al. (2022). Quantificazione degli anticorpi neutralizzanti in pazienti con COVID-19 mediante un modello additivo generalizzato a due variabili. *mSphere* 7, e0088321.

ALLEGATO 2 Circolare Ministero della Salute “indicazioni e raccomandazioni per la campagna di vaccinazione autunnale/invernale 2024/2025 anti COVID-19.”

Elenco gruppi di Persone a cui viene raccomandata la vaccinazione di richiamo con il nuovo vaccino aggiornato.

Ferma restante la possibilità per chiunque di accedervi gratuitamente, la vaccinazione anti COVID-19 è raccomandata ai seguenti gruppi di Persone:

- Persone di età pari o superiore a 60 anni;
- Ospiti delle strutture per lungodegenti;
- Donne che si trovano in qualsiasi trimestre della gravidanza o nel periodo “postpartum” comprese le donne in allattamento;
- Operatori sanitari e sociosanitari addetti all’assistenza negli ospedali, nel territorio e nelle strutture di lungodegenza; studenti di medicina, delle professioni sanitarie che effettuano tirocini in strutture assistenziali e tutto il personale sanitario e sociosanitario in formazione;
- Persone dai 6 mesi ai 59 anni di età compresi, con elevata fragilità, in quanto affette da patologie o con condizioni che aumentano il rischio di COVID-19 grave, quali:
 - Malattie croniche a carico dell'apparato respiratorio, inclusa l’asma grave, la displasia broncopolmonare, la fibrosi cistica, la broncopatia cronico ostruttiva-BPCO, la fibrosi polmonare idiopatica, l’ipertensione polmonare, l’embolia polmonare e le malattie respiratorie che necessitino di ossigenoterapia;
 - Malattie dell’apparato cardio-circolatorio (esclusa ipertensione arteriosa isolata), comprese le cardiopatie congenite e acquisite, le malattie coronariche, lo scompenso cardiaco e i pazienti post-shock cardiogeno;
 - Malattie cerebrovascolari;
 - Diabete/altre endocrinopatie severe quali diabete di tipo 1, diabete di tipo 2, morbo di Addison, panipopituitarismo;
 - Malattie neurologiche quali sclerosi laterale amiotrofica e altre malattie del motoneurone, sclerosi multipla, distrofia muscolare, paralisi cerebrali infantili, miastenia gravis, altre malattie neuromuscolari, patologie neurologiche disimmuni e malattie neurodegenerative;
 - Obesità (BMI >30);
 - Dialisi o insufficienza renale cronica;
 - Malattie degli organi emopoietici ed emoglobinopatie, quali talassemia major, anemia a cellule falciformi e altre anemie croniche gravi;
 - Patologia oncologica o onco-ematologica in trattamento con farmaci immunosoppressivi, mielosoppressivi, in attesa di trattamento o a meno di 6 mesi dalla sospensione delle cure;
 - Trapianto di organo solido in terapia immunosoppressiva;
 - Trapianto di cellule staminali ematopoietiche (entro 2 anni dal trapianto o in terapia immunosoppressiva per malattia del trapianto contro l’ospite cronica);
 - Attesa di trapianto d’organo
 - Terapie a base di cellule T esprimenti un Recettore Chimerico Antigenico (cellule CAR-T);
 - Immunodeficienze primitive (es. sindrome di DiGeorge, sindrome di Wiskott-Aldrich, immunodeficienza comune variabile etc.);
 - Immunodeficienze secondarie a trattamento farmacologico (es: terapia corticosteroidica ad alto dosaggio, farmaci immunosoppressori, farmaci biologici con rilevante impatto sulla funzionalità del sistema immunitario etc.);
 - Asplenia anatomica o funzionale Pregressa splenectomia o soggetti con indicazione alla splenectomia in elezione;

- Infezione da HIV con sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS), o con conta dei linfociti T CD4+ <200 cellule/μl o sulla base di giudizio clinico;
- Malattie infiammatorie croniche e sindromi da malassorbimento intestinali;
- Sindrome di Down;
- Cirrosi epatica o epatopatia cronica grave;
- Disabili gravi ai sensi della legge 104/1992 art. 3 comma 3.

L'elenco sopra riportato potrebbe non essere esaustivo e pertanto si chiede la collaborazione ai medici, nel valutare i casi nei quali possa sussistere l'indicazione alla vaccinazione. Si ribadisce l'importanza della valutazione del rapporto benefici/rischi al fine di stabilire l'eleggibilità alla vaccinazione.

La vaccinazione viene consigliata a familiari, conviventi e *caregiver* di persone con gravi fragilità.

In fase di avvio della campagna, la vaccinazione, pur rimanendo raccomandata per tutti i gruppi di Persone indicati e disponibile anche per coloro che non rientrano nelle suddette categorie, sarà prioritariamente somministrata alle persone di età pari o superiore a 80 anni, agli ospiti delle strutture per lungodegenti, alle persone con elevata fragilità, con particolare riferimento ai soggetti con marcata compromissione del sistema immunitario, agli operatori sanitari e sociosanitari.

Fonte: Circolare Ministero della Salute 0027825-17/09/2024-DGPRES-DGPRES-P "indicazioni e raccomandazioni per la campagna di vaccinazione autunnale/invernale 2024/2025 anti COVID-19".



Quantification of residual plasmid DNA and SV40 promoter-enhancer sequences in Pfizer/BioNTech and Moderna modRNA COVID-19 vaccines from Ontario, Canada

David J. Speicher, Jessica Rose & Kevin McKernan

To cite this article: David J. Speicher, Jessica Rose & Kevin McKernan (2025) Quantification of residual plasmid DNA and SV40 promoter-enhancer sequences in Pfizer/BioNTech and Moderna modRNA COVID-19 vaccines from Ontario, Canada, *Autoimmunity*, 58:1, 2551517, DOI: [10.1080/08916934.2025.2551517](https://doi.org/10.1080/08916934.2025.2551517)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/08916934.2025.2551517>



© 2025 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group



View supplementary material [↗](#)



Published online: 06 Sep 2025.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 7100



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

RESEARCH ARTICLE



Quantification of residual plasmid DNA and SV40 promoter-enhancer sequences in Pfizer/BioNTech and Moderna modRNA COVID-19 vaccines from Ontario, Canada

David J. Speicher^a , Jessica Rose^b  and Kevin McKernan^c 

^aDepartment of Pathobiology, University of Guelph, Guelph, ON, Canada; ^bIndependent Researcher, Ontario, Canada;

^cMedicinal Genomics, Beverly, MA, USA

ABSTRACT

For some of the COVID-19 vaccines, the drug substances released to market were manufactured differently than those used in clinical trials. Manufacturing nucleoside-modified mRNA (modRNA) for commercial COVID-19 vaccines relies on RNA polymerase transcription of a plasmid DNA template. Previous studies identified high levels of plasmid DNA in vials of modRNA vaccines, suggesting that the removal of residual DNA template is problematic. Therefore, we quantified the DNA load in a limited number of Pfizer-BioNTech and Moderna COVID-19 modRNA vaccine vials using two independent methods. Total DNA and specific DNA targets were quantified by Qubit fluorometry and quantitative polymerase chain reaction (qPCR), respectively on 32 vials representing 16 unique vaccine lots. RNase A treatment was used to assess the impact of RNA crosstalk in DNA fluorometry. A preliminary assessment of DNA fragment length and DNase I sensitivity were also performed. Total DNA ranged 371–1,548 ng/dose and 1,130–6,280 ng/dose in Pfizer and Moderna products, respectively. Specific DNA of multiple plasmid DNA targets ranged 0.22–7.28 ng/dose for Pfizer, and 0.01–0.78 ng/dose for Moderna. The SV40 promoter-enhancer-ori (0.25–23.72 ng/dose) was only detected in Pfizer vials. Oxford Nanopore sequencing of one vial found mean and maximum DNA fragment lengths of 214 bp and 3.5 kb, respectively. These data demonstrate the presence of 1.23×10^8 to 1.60×10^{11} plasmid DNA fragments per dose encapsulated in lipid nanoparticles. Using fluorometry, total DNA in all vials tested exceeded the regulatory limit for residual DNA set by the US Food & Drug Administration (FDA) and the World Health Organization (WHO) by 36–153-fold for Pfizer and 112–627-fold for Moderna after accounting for nonspecific binding to modRNA. When tested by qPCR, all Moderna vials were within the regulatory limit, but 2/6 Pfizer lots (3 vials) exceeded the regulatory limit for the SV40 promoter-enhancer-ori by 2-fold. The presence of the SV40 promoter-enhancer element in Pfizer vials raises significant safety concerns. This study emphasizes the importance of methodological considerations when quantifying residual plasmid DNA in modRNA products, considering increased LNP transfection efficiency, and cumulative dosing presents significant and unquantified risks to human health.

ARTICLE HISTORY

Received 16 April 2025

Revised 16 July 2025

Accepted 10 August 2025

KEYWORDS

COVID-19; vaccine; modRNA; mRNA; residual DNA; DNA contamination

Introduction

Chemical synthesis of large RNA (>200 bp) is expensive and error prone. Therefore, a T7 polymerase is used to generate long modified RNAs (modRNA) from DNA templates. DNA templates are easier to synthesize but need to be removed from the final drug product. Due to the limitations of chemical synthesis of DNA, fragments or oligos of DNA are first chemically synthesized, stitched together with enzymatic ligation and polymerization, and finally cloned into replication competent plasmids as their full-length products. Purifying plasmid DNA from *Escherichia coli* (*E. coli*) can be done through direct lysis of the *E. coli* and plasmid DNA purification or through purification *via* Polymerase Chain Reaction (PCR) of the targeted plasmid insert. These two different methods of purification can have

CONTACT David J. Speicher  speicher@uoguelph.ca, research@davidspeicher.com  Department of Pathobiology, University of Guelph, 50 Stone Rd E, Guelph, ON N1G 2W1, Canada.

 Supplemental data for this article can be accessed online at <https://doi.org/10.1080/08916934.2025.2551517>.

© 2025 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. The terms on which this article has been published allow the posting of the Accepted Manuscript in a repository by the author(s) or with their consent.

dramatic differences in the amount and type of residual DNA in the vaccines. These purification steps are emphasized in Moderna's patent US10898574B2 and rely on a PCR-free method that directly purifies plasmid DNA from *E. coli* cultured in a kanamycin broth. Moderna's patent states that a genetically engineered DNA (e.g. naked plasmid DNA) packaged in a lipid nanoparticle (LNP) is directly injected into a living host and could cause insertional mutagenesis and activation of oncogenes or the inhibition of tumor suppressor genes [1].

After the US Food & Drug Administration (FDA) approval and rollout of the COVID-19 vaccine, Pfizer changed its manufacturing process from PCR amplification of a DNA template (Process 1) for the randomized clinical trial (RCT) to a PCR-free purification process using DNA plasmids (Process 2) like that used by Moderna [2]. BioNTech patent US20230183769A1 provides a method for the large-scale production of pharmaceutical grade RNA using *in vitro* transcription reactions and reduces the process-related contaminant dsRNA at the same time [3]. However, as Process 2 used a 7.8Kb bacterial plasmid instead of the 4.2Kb PCR amplicon used in Process 1 for the in-vitro transcription it is probable that there was a large increase of the residual DNA in the final drug product [1].

Due to the different DNA backbones between Process 1 and Process 2, the single qPCR assay used by Pfizer to detect a specific portion of the DNA may not be sufficient for accurate quantification. The PCR based methods used in Pfizer's clinical trial contain very different background DNA compared to the vaccines given to the public as the PCR process only amplified the portion of the plasmid encoding the spike mRNA sequence. The Process 2 *E. coli* purification method contains the plasmid vector sequence with the spike sequence cloned insert. Therefore, residual DNA quantification methods that assess both the plasmid and the insert, unlike Pfizer's process that only performed PCR on the KAN gene (i.e. kanamycin resistance gene) from the plasmid vector, are required for complete quantitation. Pfizer disclosed to the regulators a qPCR assay for the spike region to confirm the presence of the spike insert but provided no quantification from this validated second assay. This is relevant as DNase I is known to fail to digest RNA:DNA hybrids. These hybrids will exist in the spike sequence after *in vitro* transcription (IVT) and may also exist in the form of residual RNA from the plasmid expression of the AmpR-SV40-KAN gene as it is propagated in *E.coli*. Thus, the DNase I activity may vary in different locations of the plasmid. Assays only measuring one location of the plasmid will fail to accurately quantify the residual DNA in the final drug product [4].

The Pfizer and Moderna plasmids share many features but most notably differ in that Pfizer's plasmid is a derivative of pcDNA3.1, which is a shuttle vector capable of both bacterial and mammalian replication *via* SV40 origins of replication, SV40 enhancers, SV40 promoters and SV40 polyA signals [5]. Plasmid DNA template used by Pfizer (7,824bp) and Moderna (6,777bp) both contain a *ColE1* bacterial origins of replication (generically termed *ori*) active in *E. coli*. Both plasmids also contain an aminoglycoside phosphotransferase gene (*Neo/Kan*) that allows for selection of bacteria carrying the plasmid in media containing kanamycin. The *E. coli* cells are then harvested and lysed. The plasmid DNA is extracted, purified, and then linearized with the restriction enzyme *Eam1104I*. This linear DNA then acts as the template for IVT using T7 RNA polymerase in the presence of N1-methyl-pseudouridine. It is the addition of N1-methyl-pseudouridine that makes these products bioengineered nucleoside-modified mRNA (i.e. modRNA) vaccines. After the IVT, DNA is enzymatically hydrolyzed with DNase I, reducing its prevalence in the final drug product. Documents supplied by Pfizer to the European Medicines Agency (EMA) [6] noted that residual DNA in modRNA products made by this process could vary significantly [7].

In 2023, McKernan et al. subjected COVID-19 modRNA vaccine vials to next-generation RNA sequencing and, found unexpected evidence of DNA derived from the template plasmids used during manufacturing [8]. This showed that both Pfizer and Moderna vaccines contained high copy plasmid components with different residual DNA sequences. Additionally, McKernan et al. found that all Pfizer vaccines contained SV40 promoter-enhancer-ori and SV40 polyA signal sequences being utilized as the promoter for the Kan/Neo selectable marker. These residual DNA components were absent from the required disclosures in EMA regulatory documents (pg 24 Rapporteur Rolling Review 3) [7].

Based on this information, McKernan et al. developed a qPCR method to quantify the level of residual plasmid DNA in the vaccine vials targeting multiple loci in the Moderna and Pfizer plasmids [8]. Therefore, the aim of this research was to verify the presence and quantity of residual plasmid

DNA and the SV40 promoter-enhancer-ori in the Pfizer and Moderna COVID-19 modRNA vaccine and compare the results to adverse events (AEs) reported to the Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS). To investigate this, we obtained 32 vials COVID-19 modRNA vaccines that had been distributed in Ontario, Canada. The quantity of specific DNA targets, i.e. spike, plasmid *ori*, and the SV40 promoter-enhancer-*ori*, were determined by qPCR and total DNA loads by Qubit® fluorometry. We also extended the observations of an earlier work (McKernan et al.) by studying the size distribution of DNA fragments as well as the DNase I sensitivity of the vaccine to determine whether the residual DNA is packaged in the LNPs. We then queried VAERS for any AEs, including serious AEs (SAEs), associated with these lots [9]. This study is an expanded version of a previous preprint [10].

Materials and methods

For this study, we used the terms “residual DNA,” “DNA mass,” or “impurities,” (or similar) rather than “contamination” in keeping with regulatory definitions of impurities which arise from the manufacturing process [11,12]. Based on the FDA and US Pharmacopeia (USP) guidelines “impurities” are unwanted substances that are inherent to the manufacturing process or raw materials used in vaccine production. Impurities are typically expected, predictable, and arise from the materials, reagents, or intermediates used during production. Impurities would include the dsRNA, RNA:DNA hybrids, short RNA fragments, and the residual plasmid DNA fragments. Whereas “contamination” refers to unintended, extraneous substances introduced into the vaccine product through external sources, such as environmental factors, equipment, or human error, that are not part of the intended manufacturing process. Contamination is typically unexpected and can include microbial contaminants (e.g. bacteria, fungi), adventitious agents (e.g. viruses), or foreign particulates.

COVID-19 vaccine batches

Vials of Pfizer-BioNTech BNT162b2 (10 vials; 6 lots) and Moderna Spikevax mRNA-1273 (22 vials, 10 lots) were obtained from various pharmacies in Ontario, Canada (Figure 1 and Table 1). An unopened sterile injectable vial of alprostadil 66 mcg/mL in combination with papaverine 21.7 mg/mL and phentolamine 1 mg/mL (TriMix) was used as the negative control. The unopened vials were untampered with as they had in-tact flip-off plastic caps with printed lot numbers and expiration dates. Vials had been stored in pharmacies in purpose-built vaccine storage units at +2–8 °C and were transported in insulated containers with frozen gel packs prior to being placed in the testing laboratory fridge within 5 h of receipt. One Moderna vial lacked a printed expiration date but had a QR code that required scanning by a pharmacist. The Moderna XBB.1.5 vials were similarly stored by the pharmacy. The remnants of recently used vials (within 30 min of administration) were placed in an insulated container with frozen gel packs and transported to the testing laboratory fridge within 12 h.

qPCR analysis of spike, *ori*, and the SV40 promoter-enhancer-*ori* DNA

qPCR assays targeted spike and plasmid *ori* sequences shared by the Moderna and Pfizer expression plasmids (Table 2). These primers were also used to test COVID-19 modRNA vaccine vials in Australia [15]. The uniplex SV40 Enhancer assay was designed to amplify the nuclear targeting sequence unique to the Pfizer plasmid [16]. All qPCR assays used 1 µL from each vial directly added to 17.8 µL of master mix. qPCR kits were sourced from Medicinal Genomics (Part# 420201, Beverly, USA) with the master mix containing 8.8 µL reaction consisting of 3.8 µL polymerase enzyme (Medicinal Genomics Part# 420201), 0.8 µL reaction buffer and 1.0 µL of Primer-Probe mix, and 12.2 µL of ddH₂O. A primer-probe mix was assembled using 12.5 µL 100 µM *ori* probe, 12.5 µL of 100 µM spike probe, 25 µL of 100 µM spike forward primer, 25 µL of 100 µM spike reverse primer, 25 µL of 100 µM *ori* forward primer, 25 µL 100 µM *ori* reverse primer, and 75 µL of ddH₂O. All

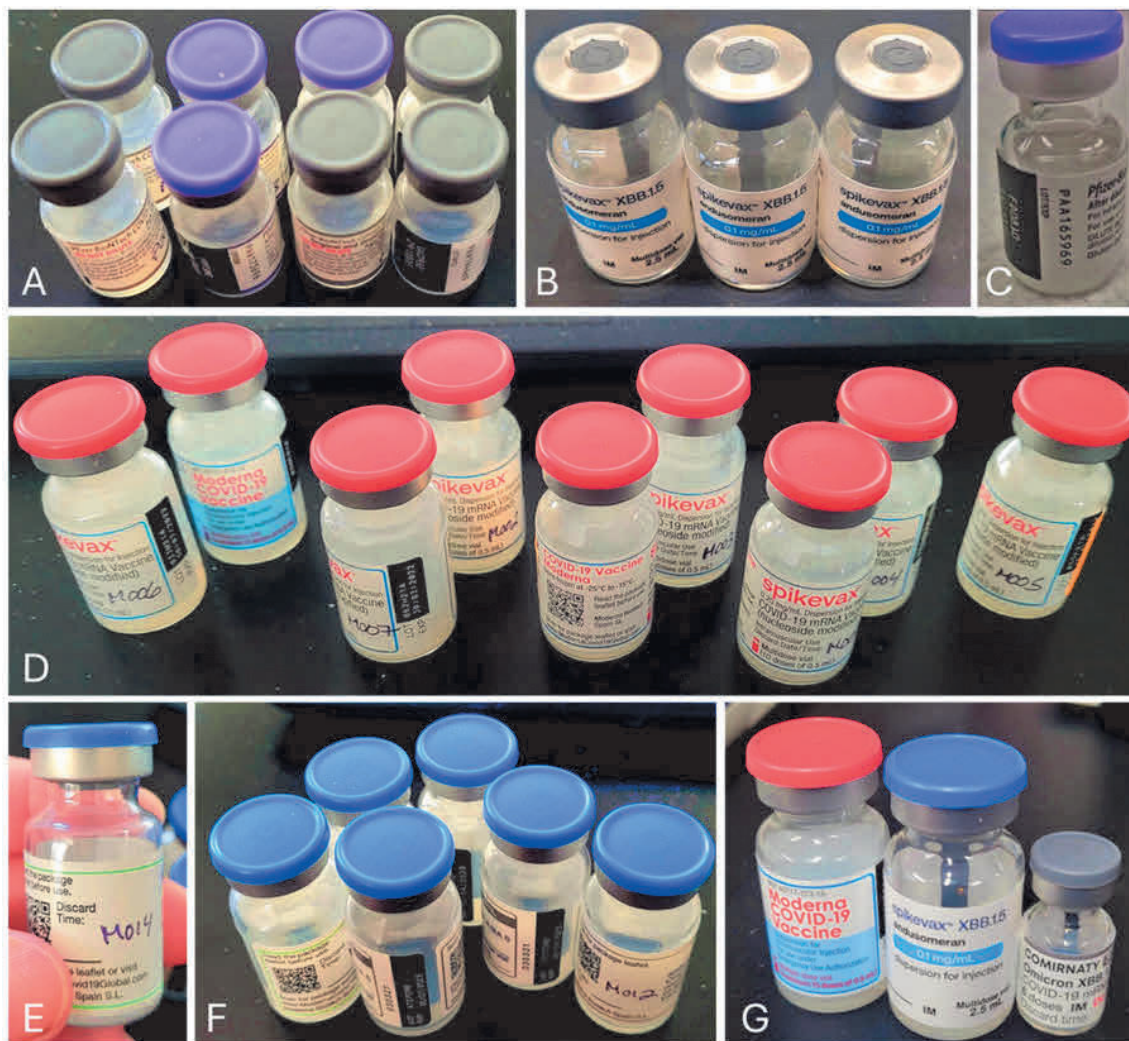


Figure 1. Vials of Pfizer/BioNTech BNT162b2 and Moderna Spikevax mRNA-1273 COVID-19 vaccine from Ontario, Canada: (A) Pfizer/BioNTech adult monovalent and bivalent; (B) Moderna adult monovalent XBB.1.5; (C) Pfizer-BioNTech adult monovalent; (D) Moderna child/adult monovalent; (E) child/adult bivalent Wuhan-BA.1; (F) child/adult bivalent Wuhan-BA.1 and adult Wuhan-bivalent BA.4/5; and (G) mix of Moderna child/adult monovalent and adult monovalent XBB.1.5, and Pfizer-BioNTech adult monovalent XBB.1.5. One vial of Moderna child/adult monovalent wasn't photographed.

qPCR assays used a synthetic gDNA control (gBlock, Integrated DNA Technologies (IDT), San Diego, USA) of known concentration (1 ng/ μ L) to generate a 10-fold serial dilution derived calibration curve.

Cycling was performed on a QuantStudio 3 (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) with an initial denaturation of 95°C for 3 min followed by 35 cycles of 95°C for 10 s and 65°C for 30 s. Cq conversion to ng/ μ L was calculated using the QuantStudio software v2.7.0 (ThermoFisher Scientific). Amplicon mass, as determined with the New England BioLabs DNA calculator [17] and length (105 bp for *ori*, 114 bp for spike, and 152 bp for the SV40 promoter-enhancer-*ori*), were used to estimate the total nanograms (ng) of DNA present by adjusting for the length of the plasmids (7,824 bp for Pfizer and 6,777 bp for Moderna). Copy number per dose was adjusted first for the dilutions (e.g. 1:5 dilution for the Pfizer Adult Monovalent) and then for the volume of each adult injection dose (300 μ L for Pfizer and 500 μ L for Moderna). Serial dilutions were performed on the three Pfizer lots that showed the highest residual DNA concentration to investigate PCR inhibition by the LNPs, since qPCR was performed directly without any treatment or extraction.

Table 1. Description of mRNA COVID-19 vaccine lots examined in this study.

Vaccine manufacturing information							VAERS data	
Manufacturer	Mono/bivalent	Lot #	Sealed	HC approval date	Expiry date	Expired	Total AES	Total SAEs
Pfizer-BioNTech	Adult Monovalent	FD0810	Sealed	2021-07-29	2022-05-31	Expired	941	154
Pfizer-BioNTech	Adult Monovalent	FM7380	Sealed	2022-01-05	2022-11-30	Expired	64	25
Pfizer-BioNTech	Adult Monovalent	FN7934a	Sealed	2022-01-11	2022-10-31	Expired	50	25
Pfizer-BioNTech	Adult Monovalent	FN7934b	Sealed					
Pfizer-BioNTech	Adult Monovalent	FX4343a	Sealed	2022-04-13	2023-07-31	Expired	4	1
Pfizer-BioNTech	Adult Monovalent	FX4343b	Sealed					
Pfizer-BioNTech	Adult Bivalent	GK0932a	Sealed	2022-10-19	2024-02-29	In code	20	2
Pfizer-BioNTech	Adult Bivalent	GK0932b	Sealed					
Pfizer-BioNTech	Adult Bivalent	GK0932c	Sealed					
Pfizer-BioNTech	Adult Monovalent XBB.1.5	HD9867	Sealed	2023-09-28	2024-10-31	In code	14	5
Moderna	Child/Adult Monovalent	092D21A	Sealed	2021-06-13	2022-02-13	Expired	49	41
Moderna	Child/Adult Monovalent	020E21Aa	Sealed	2021-07-08	2022-03-04	Expired	6	2
Moderna	Child/Adult Monovalent	020E21Ab	Sealed					
Moderna	Child/Adult Monovalent	062H21Aa	Sealed	2021-10-27	2022-05-31	Expired	10	3
Moderna	Child/Adult Monovalent	062H21Ab	Sealed					
Moderna	Child/Adult Monovalent	020J21A	Sealed	2021-11-18	2022-06-30	Expired	7	5
Moderna	Child/Adult Monovalent	055K21A	Sealed	2021-12-16	2022-07-31	Expired	2	2
Moderna	Child/Adult Monovalent	033M21Aa	Sealed	2022-02-11	2022-09-30	Expired	2	1
Moderna	Child/Adult Monovalent	033M21Ab	Sealed					
Moderna	Child/Adult Monovalent	033M21Ac	Sealed					
Moderna	Child/Adult Monovalent	033M21Ad	Sealed					
Moderna	Child/Adult Bivalent BA.1	AS0467Da	Sealed	2022-09-23	2023-04-02	Expired	0	0
Moderna	Child/Adult Bivalent BA.1	AS0467Db	Sealed					
Moderna	Child/Adult Bivalent BA.1	AS0467Dc	Sealed					
Moderna	Adult Bivalent BA4/5	AT0709Ba	Sealed	2022-11-28	2023-10-30	Expired	0	0
Moderna	Adult Bivalent BA4/5	AT0709Bb	Sealed					
Moderna	Adult Bivalent BA4/5	AT0709Bc	Sealed					
Moderna	Adult Bivalent BA4/5	AT0709Bd	Sealed					
Moderna	Adult Monovalent XBB.1.5	020G23Aa	Unsealed	2023-09-15	2024-07-29	In code	0	0
Moderna	Adult Monovalent XBB.1.5	020G23Ab	Unsealed					
Moderna	Adult Monovalent XBB.1.5	020G23Ac	Unsealed					
Moderna	Adult Monovalent XBB.1.5	025G23A	Unsealed	2023-09-15	2024-08-10	In code	0	0

Sorted by health Canada lot approval date as recorded in the Canadian national vaccine catalog [13]. adverse events (AEs) and serious AEs and SAEs sourced from Canada) were extracted from the VAERS database available for public download (<https://vaers.hhs.gov>) [14]. Lower case letters at the end of lot numbers indicate different vials of the same lot.

Table 2. Primer and probe sequences targeting spike, *ori*, and the SV40 promoter-enhancer-*ori*.

Primer/probe name	Sequence (5'-3') ^a	Amplicon Length
MedGen_Moderna_Pfizer_Janssen_Vax-Spike_Forward	AGATGGCCTACCGGTTCA	114 bp
MedGen_Moderna_Pfizer_Janssen_Vax-Spike_Reverse	TCAGGCTGCTCTGGATCTT	
MedGen_Moderna_Pfizer_Janssen_Vax-Spike_Probe	5'-6-FAM-CGAGAACCA-ZEN-GAAGCTGATGCCAA-3'IABkFQ ^b	
MedGen_Vax-Vector_Ori_Forward	CTACATACCTCGCTCTGCTAATC	105 bp
MedGen_Vax-Vector_Ori_Reverse	GCGCCTTATCCGGTAACTATC	
MedGen_Vax-Vector_Ori_Probe	5HEX-AAGACACGA-ZEN-CTTATCGCCACTGGC-3'IABkFQ ^c	
MedGen_SV40-promoter-enhancer-ori_Forward	GTCAGTTAGGGTGTGGAAGT	152 bp
MedGen_SV40-promoter-enhancer-ori_Reverse	GGTTGCTGACTAATTGAGATGC	
MedGen_SV40-promoter-enhancer-ori_Probe	5TEX615-CCAGCAGGCAGAAAGTATGCAAAGC-3'IAbRQSp ^d	

^aPfizer bivalent expression vector BNT162b2 (OR134577.1) and Modern mRNA1273 expression vector (OR134578.1) sequences were used for primer design.

^bProbe had 5' terminus labeled with a 6-FAM (6-carboxy-fluorescein) fluorophore, a ZEN™ internal quencher, and 3' terminus labeled with 3' Iowa Black® FQ.

^cProbe had 5' terminus labeled with a 5HEX (Hexachlorofluorescein) fluorophore, a ZEN™ internal quencher, and 3' terminus labeled with 3' Iowa Black® FQ.

^dProbe had 5' terminus labeled with a TEX 615 fluorophore and 3' terminus labeled with 3' Iowa Black® RQ.

Qubit® fluorometry quantitation

AccuGreen® HS fluorometric reagents (AccuGreen #99820 and DNA Quantification Buffer #99979) and standards were acquired from Biotium (San Francisco, USA) for Qubit® analysis (ThermoFisher Scientific). Fluorometry readings were initially performed directly on the vaccines in a 200 µL mixture containing fluorometric reagents (190 µL of a stock made from 995 µL HS Buffer and 5 µL 200X AccuGreen® dye) and 10 µL of vaccine. Samples were read following the manufacturer's instructions on a Qubit® 3.0 Fluorometer. These samples were then heated to 95 °C for 8 min and cooled to 4 °C for 5 min to disrupt the LNPs and enable fluorometric dyes to access the DNA. To assess potential

signal derived from AccuGreen® binding to modified RNA, 1 µL of 20 mg/mL RNase A (NEB# T3018L) was added to the samples after the heating/cooling step and incubated at 37°C, during which time a time series of fluorescent measurements was collected. Fluorometry measurements were collected before RNase A addition and 1, 2, 3, 5 and 10 min after RNase A addition.

Vaccine adverse event reporting system (VAERS) data

The VAERS database was analyzed using the Language and Environment for Statistical Computing package in R [18] and included data spanning December 17, 2020 through October 6, 2023. The U.S.-based VAERS data is available for download in three separate comma separated values (csv) data files representing: i) general data for each report; ii) the reported AEs or “symptoms,” and iii) vaccine data including vaccine manufacturer and lot number [9]. A non-U.S.-based (foreign) VAERS data set is also available for download and contains AE reports filed to regulatory authorities from non-U.S. countries worldwide. A VAERS ID number is assigned to preserve confidentiality when a report is filed. To assess the AEs related to a particular vaccine, it is necessary to merge the three data files using the VAERS IDs as a linking variable. For this study, only COVID-19 VAX_TYPE (COVID19-1 (monovalent) and COVID19-2 (bivalent)) were included. Other relevant variables included VAERS ID*, vaccine lot (VAX_LOT), vaccine manufacturer (VAX_MANU), hospitalizations (HOSPITAL), disability (DISABLE), emergency room visits (ER_ED_VISIT), birth defects (BIRTH_DEFECT), life-threatening occurrences (L_THREAT) and deaths (DIED). Data were grouped by VAX_LOT and the total number of AE and SAE reports were counted. SAE reports included deaths, hospitalizations, emergency room visits, disability reports, birth defects and life-threatening reports. The US- and non-U.S.-based data were queried and for the purposes of this study, only Canadian lot counts are reported in the primary results. Canadian reports were distinguished from non-U.S.-based (foreign) reports using the SPLTTYTYPE variable which provides the country code - in the case of Canada “CA” - as the first 2-character place holders. Correlations between VAERS data and DNA levels for spike, *ori* and SV40 were plotted and calculated using the Pearson correlation coefficient.

Oxford nanopore sequencing

DNA fragment size distributions were estimated using a previously sequenced vaccine lot (Pfizer children’s monovalent Lot# FL8095) [8] as a standard using an Oxford Nanopore Flongle (R.10.4.1, Oxford Nanopore Technologies (ONT), New York, USA) and the Oxford Nanopore Ligation sequencing kit (SQK-LSK114) according to the manufacturer’s instructions. Reads were mapped to NCBI OR134577.1 with the Burrow-Wheeler Aligner with maximum exact matches (BWA-MEM) [19]. ONT sequencing read length is unlimited, but DNA isolation procedures required to run ONT sequencing can bias the length of the molecules captured in the ONT ligation reaction. Shorter fragments may be lost with the SPRI based DNA capture used in these methods. Single molecule reads were counted and binned according to their mapped read length with BWA-MEM.

Assessment of nuclease sensitivity

Pfizer Lot# FL8095 was also used as a standard to assess DNase I sensitivity of vaccine material. Packaged DNA in LNP should be inaccessible and thus resistant to DNase I, while DNA outside of the LNP should be DNase I labile.

Nuclease protected DNA was estimated by treating 20 µL of the vaccine with 2.5 µL of DNase I-XT (2 units/µL, NEB#M0570S, New England BioLabs Inc, Ipswich, USA) in Grim Reefer 10X buffer (Medicinal Genomics #420123-125) and incubating at 37°C for 30 min. For the control, 2.5 µL of ddH₂O was used instead of the DNase I-XT. The DNase I-XT reaction was terminated using 2.5 µL of MGC lysis buffer (Medicinal Genomics #420001). After the DNase I kill step, a qPCR-amplifiable internal control DNA was spiked-in to verify that the DNase I-XT had been fully inactivated (Medicinal Genomics #420123-125). Subsequently, 54 µL of SenSATIVax magnetic beads (Medicinal Genomics) were used to

purify DNA from the DNase I-XT assay and the DNase I-XT negative control samples. The magnetic beads were pipette-mixed 10 times with the sample, incubated at room temperature for 5 min, separated magnetically and washed twice with 70% v/v ethanol. The ethanol was removed, and the beads dried for 2 min at room temperature. Samples were eluted in 30 μ L of ddH₂O and 1 μ L of eluate was examined by qPCR for spike and *ori* in an 18.8 μ L reaction. An additional DNase I inactivation control primer and probe (0.5 μ L CY5 labeled probe) were added to the assay for a total of 19.3 μ L reaction.

Results

qPCR testing of residual DNA

We validated the accuracy of the qPCR quantification method using an 8-log serial dilution standard curve that was used to calibrate sample C_q values and generated R² values of 0.998, 0.999, 0.906 and efficiencies of 99.8%, 94.7%, and 93.6% for spike, *ori*, and SV40 promoter-enhancer-*ori* amplicons, respectively. On all plates, negative controls and no template (ddH₂O) controls (NTC) were tested in triplicate and found to be negative.

Initial testing, performed on undiluted vaccine samples showed that all Pfizer vials were positive for spike, *ori*, and SV40 promoter-enhancer-*ori*. For individual vials, qPCR for Pfizer amplified at similar times for spike, *ori*, and SV40 enhancer-promoter-*ori* (average Δ C_q 0.89 $\pm$ 0.28). Despite Pfizer lot FX4343 amplifying slightly later than the other vials, the inter-vial difference was small (spike Δ C_q 17.86 $\pm$ 1.58; *ori* Δ C_q 17.91 $\pm$ 2.05; SV40 promoter-enhancer-*ori* Δ C_q 15.46 $\pm$ 2.02). The inter-vial difference of each of the targets was also small for Moderna (spike C_q 20.65 $\pm$ 0.88; *ori* C_q 25.48 $\pm$ 1.32). However, for all Moderna vials, except lot AS0467D (Bivalent BA.1), *ori* consistently amplified 2.95 $\pm$ 0.30 cycles later than spike. The SV40 promoter-enhancer-*ori* was detected in all Pfizer vials but in none of the Moderna vials.

To assess LNP inhibition on the qPCR reaction efficiency, vials of lots FM7380 and FN7934 were subject to 10-fold serial dilution. The expected $\sim$ 3.3 quantification cycle (C_q) response was observed only after the 1:10 dilution suggesting that there is some LNP inhibition that could impact the quantitation of DNA at these dilutions. Therefore, the data from the 1:10 dilutions were used for further analysis. This dilution, as well as the fact that some of the doses were designed to be diluted before use, was accounted for in our calculations.

Amount of specific residual DNA fragments determined by qPCR

qPCR testing of the vials diluted 1:10 produced C_q values for *ori* and spike of 18.44–24.87, and 18.03–23.83 for Pfizer, and 25.24–30.10 and 22.35–24.53 for Moderna, respectively (Table 3). The SV40 promoter-enhancer-*ori* assay produced C_q values of 17.46–24.65 in the Pfizer vials and did not amplify in the Moderna vials. The reproducibility of the spike, *ori* and SV40 assays was 0.72 $\pm$ 0.14, 0.74 $\pm$ 0.23, and 0.65 $\pm$ 0.16 for Pfizer, and 0.83 $\pm$ 0.14, 0.89 $\pm$ 0.18, and negative for Moderna, respectively. After calculations, the amount of residual DNA varied substantially between the Pfizer lots analyzed [0.22–2.43 ng/dose for spike, 0.28–7.28 ng/dose for *ori*, and 0.25 to 23.72 ng/dose for SV40 promoter-enhancer-*ori*] but was more consistent in the Moderna lots [0.25–0.78 ng/dose for spike and 0.01–0.34 ng/dose]. While Pfizer had a substantially higher amount of residual DNA than Moderna, only the SV40 promoter-enhancer-*ori* DNA from lots FM7380 and FN7934 were over the FDA 10 ng DNA/dose guidance (Figure 2). Lots FM7380 and FN7934 were Pfizer monovalent purple top vials with a PBS formulation.

Total DNA determined by fluorometry

Fluorometer-based measurements (e.g. Qubit®) of the vaccines showed that the Moderna vials consistently had a much greater amount of total DNA than the Pfizer vials (Figure 3). The total DNA detected in the neat vaccine (i.e. directly from the vials) was 621 $\pm$ 282 ng/dose (range: 262 to

Table 3. qPCR Testing on all Pfizer-BioNTech and moderna vials diluted 1:10 with results for SARS-CoV-2 spike, *ori*, and the SV40 promoter-enhancer-*ori* on.

Manufacturer	Lot #	Spike			Plasmid Origin of Replication (<i>ori</i>)			SV40 promoter-enhancer- <i>ori</i>		
		Cq	Total ng/dose	Total Copies/dose	Cq	Total ng/dose	Total Copies/dose	Cq	Total ng/dose	Total Copies/dose
Pfizer-BioNTech	FD0810	20.17	0.43	3.69E+09	19.90	2.80	2.60E+10	20.76	0.43	2.92E+09
Pfizer-BioNTech	FM7380	18.03	2.43	2.07E+10	18.57	3.92	3.64E+10	18.18	16.06	1.09E+11
Pfizer-BioNTech	FN7934a	18.47	1.79	1.53E+10	18.77	3.43	3.18E+10	17.46	23.72	1.60E+11
Pfizer-BioNTech	FN7934b	18.19	2.18	1.86E+10	18.44	4.27	3.96E+10	17.96	18.10	1.22E+11
Pfizer-BioNTech	FX4343a	23.53	0.27	2.30E+09	24.71	0.32	2.94E+09	24.59	0.26	1.73E+09
Pfizer-BioNTech	FX4343b	23.83	0.22	1.86E+09	24.87	0.28	2.64E+09	24.65	0.25	1.68E+09
Pfizer-BioNTech	GK0932a	20.46	2.25	1.92E+10	21.01	3.81	3.54E+10	20.27	2.61	1.77E+10
Pfizer-BioNTech	GK0932b	20.60	2.05	1.75E+10	21.22	3.32	3.08E+10	20.49	2.35	1.59E+10
Pfizer-BioNTech	GK0932c	20.66	1.97	1.68E+10	21.21	3.33	3.09E+10	20.29	2.58	1.74E+10
Pfizer-BioNTech	HD9867	21.24	0.99	8.46E+09	20.81	7.28	6.75E+10	20.12	2.84	1.92E+10
Moderna	092D21A	22.35	0.66	5.64E+09	27.88	0.04	4.16E+08	Negative		
Moderna	020E21Aa	23.66	0.35	3.02E+09	29.47	0.02	1.87E+08	Negative		
Moderna	020E21Ab	24.52	0.50	4.24E+09	29.99	0.09	8.26E+08	Negative		
Moderna	062H21Aa	22.52	0.78	6.69E+09	29.21	0.02	2.23E+08	Negative		
Moderna	062H21Ab	22.76	0.66	5.64E+09	29.37	0.02	2.00E+08	Negative		
Moderna	020J21A	23.21	0.48	4.12E+09	30.10	0.01	1.23E+08	Negative		
Moderna	055K21A	22.94	0.58	4.98E+09	29.58	0.02	1.74E+08	Negative		
Moderna	033M21Aa	23.04	0.54	4.65E+09	29.46	0.02	1.88E+08	Negative		
Moderna	033M21Ab	22.81	0.64	5.44E+09	29.38	0.02	1.99E+08	Negative		
Moderna	033M21Ac	23.59	0.37	3.18E+09	29.87	0.02	1.43E+08	Negative		
Moderna	033M21Ad	23.26	0.47	3.98E+09	29.39	0.02	1.97E+08	Negative		
Moderna	AS0467Da	23.20	0.49	4.17E+09	25.24	0.34	3.20E+09	Negative		
Moderna	AS0467Db	24.16	0.25	2.14E+09	26.08	0.20	1.82E+09	Negative		
Moderna	AS0467Dc	23.75	0.33	2.85E+09	25.74	0.25	2.28E+09	Negative		
Moderna	AT0709Ba	23.68	0.35	2.99E+09	29.30	0.02	2.09E+08	Negative		
Moderna	AT0709Bb	23.56	0.38	3.24E+09	29.25	0.02	2.16E+08	Negative		
Moderna	AT0709Bc	23.63	0.36	3.09E+09	29.34	0.02	2.04E+08	Negative		
Moderna	AT0709Bd	23.80	0.32	2.74E+09	29.44	0.02	1.91E+08	Negative		
Moderna	020G23Aa	24.42	0.73	6.26E+09	29.42	0.23	2.13E+09	Negative		
Moderna	020G23Ab	24.46	0.71	6.11E+09	29.87	0.03	2.33E+08	Negative		
Moderna	020G23Ac	24.53	0.68	5.84E+09	29.74	0.03	2.55E+08	Negative		
Moderna	025G23A	24.38	0.54	4.62E+09	29.30	0.13	1.20E+09	Negative		

Calculations for Pfizer and moderna were based on adult doses of 0.30 mL and 0.50 mL, respectively. Moderna is also indicated to be given to children aged 6–12 years of age with a dose 0.25 mL making the resultant total ng/dose half of that given to adults. Total ng/dose was adjusted for the length of the amplicon (105 bp *ori*, 114 bp spike) only representing a fraction of the 7,824 bp Pfizer and 6,777 bp moderna plasmid. Lower case letters at the end of lot numbers indicate different vials of the same lot. [¶]SV40 promoter-enhancer-*ori*.

1,116 ng/dose) for Pfizer and $1,661 \pm 793$ ng/dose (range: 379 to 3,430 ng/dose) for Moderna. Boiling of the fluorometric solution containing the vaccine caused the lysis of the lipid nanoparticles, releasing both residual DNA and modRNA, and greatly increasing the amount of total DNA detected to $1,696 \pm 987$ ng/dose (range: 590 to 3,180 ng/dose) for Pfizer and $5,210 \pm 2,095$ ng/dose (range: 2,980 to 9,700 ng/dose) for Moderna. This increase in fluorometry was also due to crosstalk between the modRNA and the fluorometric dyes [21]. The addition of RNase A quickly degraded the modRNA and reduced the fluorometry, which stabilized after 1 min. After 10 min of RNase A the total DNA detected in the vaccine vials was 775 ± 448 ng/dose (range: 371 to 1,548 ng/dose) for Pfizer and $2,821 \pm 1,244$ ng/dose (range: 1,130 to 6,280 ng/dose) for Moderna. This high amount of total DNA in both the vaccines suggests that a high fraction of the DNA is under the size range of the qPCR amplicons (i.e. is heavily degraded), and that Moderna used had a substantially higher amount of plasmid DNA.

Due to method development and acquiring of the vaccines at various times the vaccines were tested several times by fluorometry (Figure 4). The average variance directly from the vial (pre-boil) was 317 ± 278 ng/dose (range: 43–727 ng/dose) and 456 ± 121 ng/dose (range: 199–675 ng/dose), after boiling was $1,145 \pm 533$ ng/dose (range: 519–1,949 ng/dose) and $1,554 \pm 1,023$ ng/dose (range: 176–3,169 ng/dose), and after RNase A treatment was 297 ± 217 ng/dose (range: 100–765 ng/dose) and $1,065 \pm 624$ ng/dose (range: 113–2,365 ng/dose) for Pfizer and Moderna, respectively.

We plotted residual DNA values obtained by Qubit fluorometry against those obtained by qPCR (Figure 5). For the Pfizer product, the trend lines for *ori* and spike estimates both had a positive slope. The graph for the Moderna product differs from that of the Pfizer product with little overlap

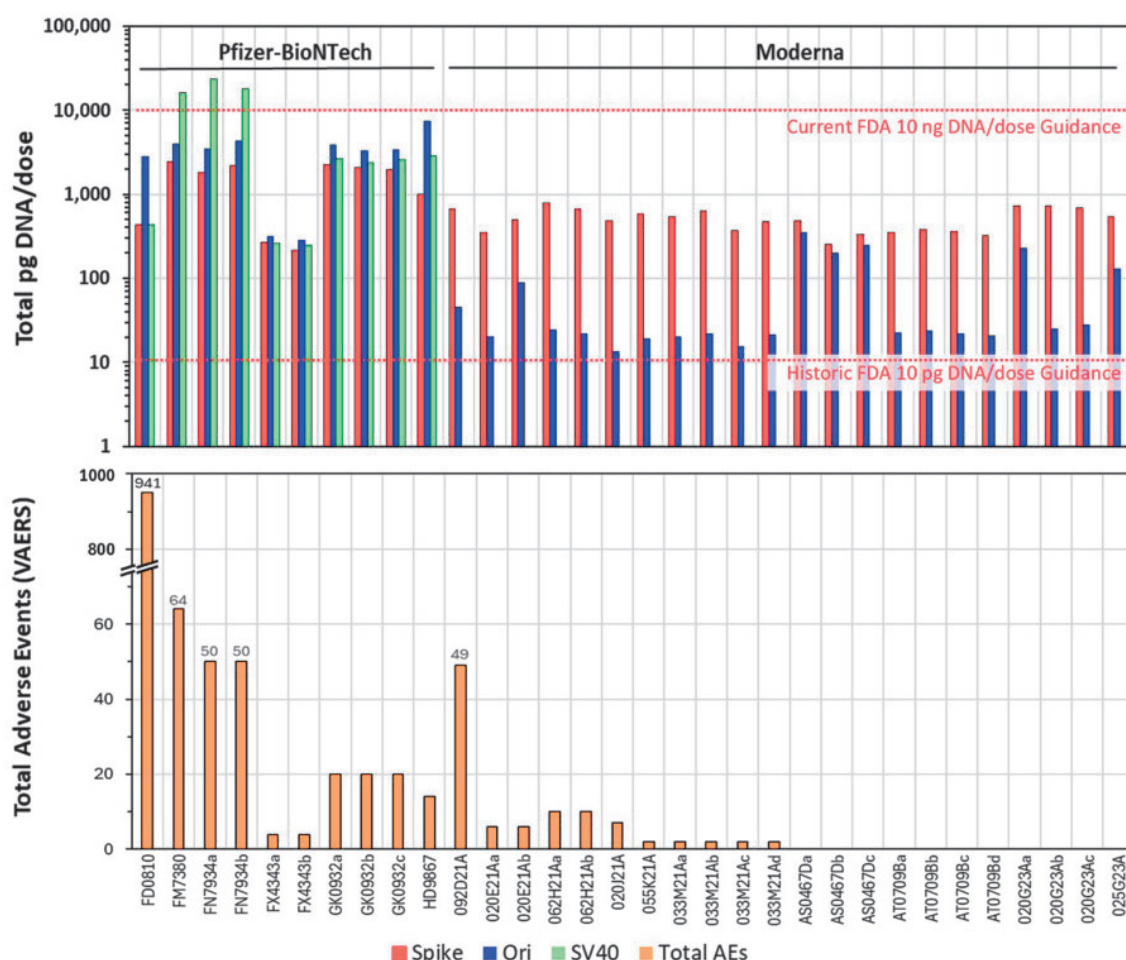


Figure 2. Comparison of residual DNA content of spike (red) *ori* (blue), SV40 promoter-enhancer-*ori* (green) as measured by qPCR, and the total number of adverse events (orange) reported to VAERS. The historic (10pg/dose) and current (10ng/dose) FDA and WHO regulatory guideline [12,20] for residual DNA is shown by a red dotted line. Vials are sorted by health Canada lot approval date as recorded in the Canadian national vaccine catalog [13]. Lower case letters at the end of lot numbers indicate different vials of the same lot. The total number of AEs was determined per lot and reproduced for each vial in the same lot.

of values in either axis, with much shallower slopes. Although a detailed view of the Moderna plots suggests a negative slope for the *ori* values, this trendline may be influenced by three outlying values. These values were obtained from vials of the Moderna BA.1-Wuhan bivalent vaccines.

Other than Moderna lots AS0709D, AS0467D and 020G23A, VAERS reports were filed for all lots examined in this study (Table 2 and Figure 2). Of the 16 lots examined, the lots with the highest numbers of reports filed to VAERS worldwide were FD0810, FM7380, FN7934 and 092D21A with 944, 64, 50 and 49 reports, respectively. In the case of these lots, 157 (17%), 25 (39%), 25 (50%) and 42 (86%) of individuals reported an SAE. These percentages far exceed the upper limit for the expected percentage of SAEs in any given VAERS data set as per the VAERS data use guide [22]. Also of note, 1/6 (17%) reports of SAEs involved death for Moderna lot 020E21A.

Regarding Canadian VAERS reports, the same trend was seen where FD0810, FM7380, FN7934 and 092D21A had 134, 27, 48 and 40 reports, respectively. In the case of these lots, 77 (57%), 16 (59%), 23 (48%) and 38 (95%) of individuals reported an SAE. These percentages far exceed the upper limit for the expected percentage of SAEs in any given VAERS data set as per the VAERS data use guide[22]. In the case of Moderna lot 092D21A almost all reports were SAEs. The percentage of SAEs for all lots combined originating from Canada is very high at 58%.

Lot FD0180 is the only lot in this study that was primarily distributed and administered in the United States. Of the total reports for lot FD0810 ($n=944$), 682 (72%) were reported in various states

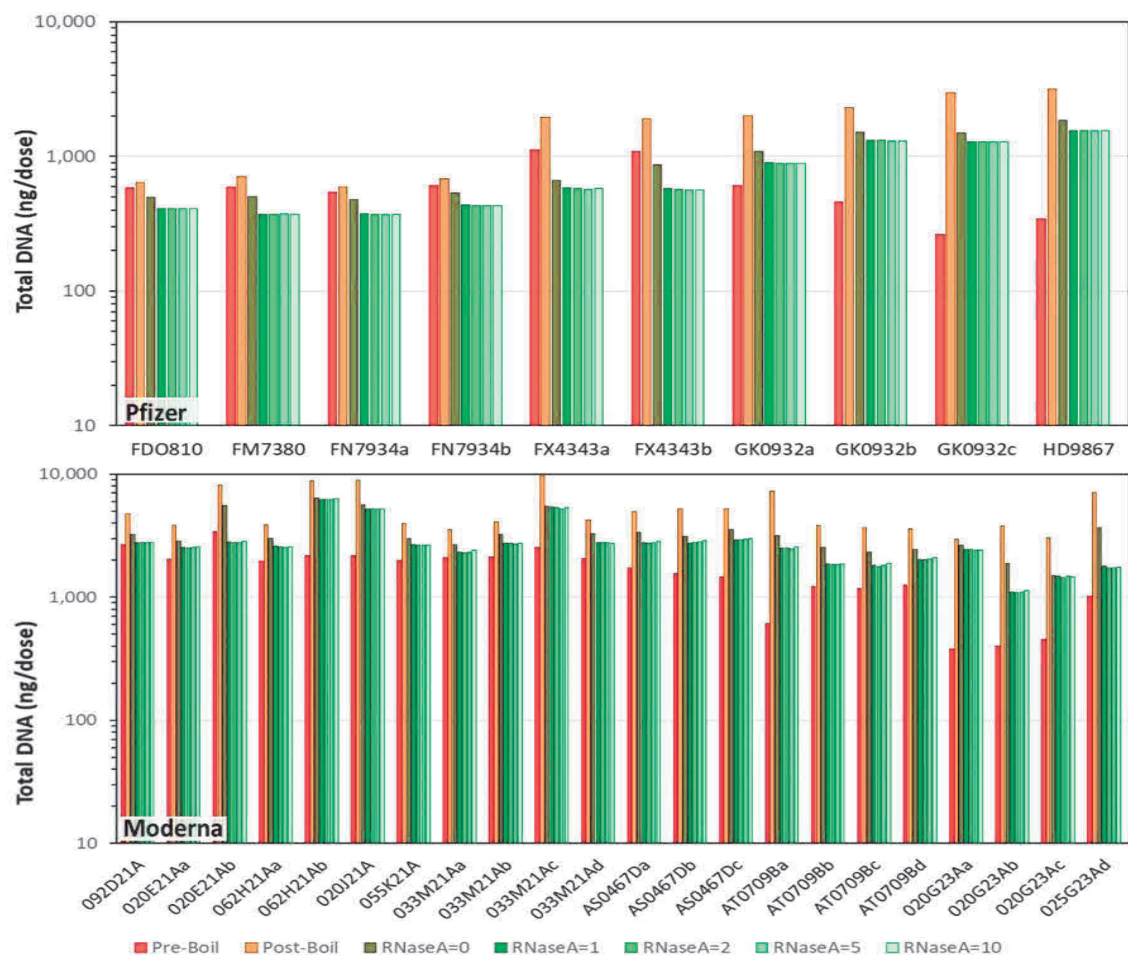


Figure 3. Total DNA was measured by Qubit® fluorometry directly from the vial (pre-boil), after a 95°C boil step (post-boil) and at 5 different time points with RNase A digestion.

in the USA and more specifically, 546 (58%) were reported in Colorado alone (Supplementary Table 3). Of the non-USA-based (foreign) lots reported to VAERS for this lot, 83% were reported in Canada. 84% of all foreign reports (non-USA-based) were reported in Canada indicating that these vials were primarily distributed and administered in Canada.

Fragment length analysis

The Pfizer children's monovalent (Lot FL8095) described by McKernan et al. [8] was sequenced with Oxford Nanopore (ONT) to assess the read length distributions after mapping the reads to the reference sequence of the plasmid in NCBI (Figure 6). The longest read detected in 865 reads was 3.5kb with read mapping to most of the plasmid backbone (Figure 7).

Nuclease sensitivity of the Pfizer vaccine was assessed using DNase I-XT. This DNA nuclease is optimized for IVT reactions rich in RNA-DNA hybrids. This treatment showed ≤ 1 Cq offset while a naked DNA control spiked into LNPs was reduced from a Cq of 15 to undetectable under the same conditions. This indicates that the DNA present in the vaccines is protected by encapsulation in the LNPs (Figures 8 and 9).

Discussion

Residual DNA was detected in all 32 vaccine vials surveyed. Multiple vials from the same lots produced very similar loads for all targets showing assay reliability, reproducibility, and consistency within

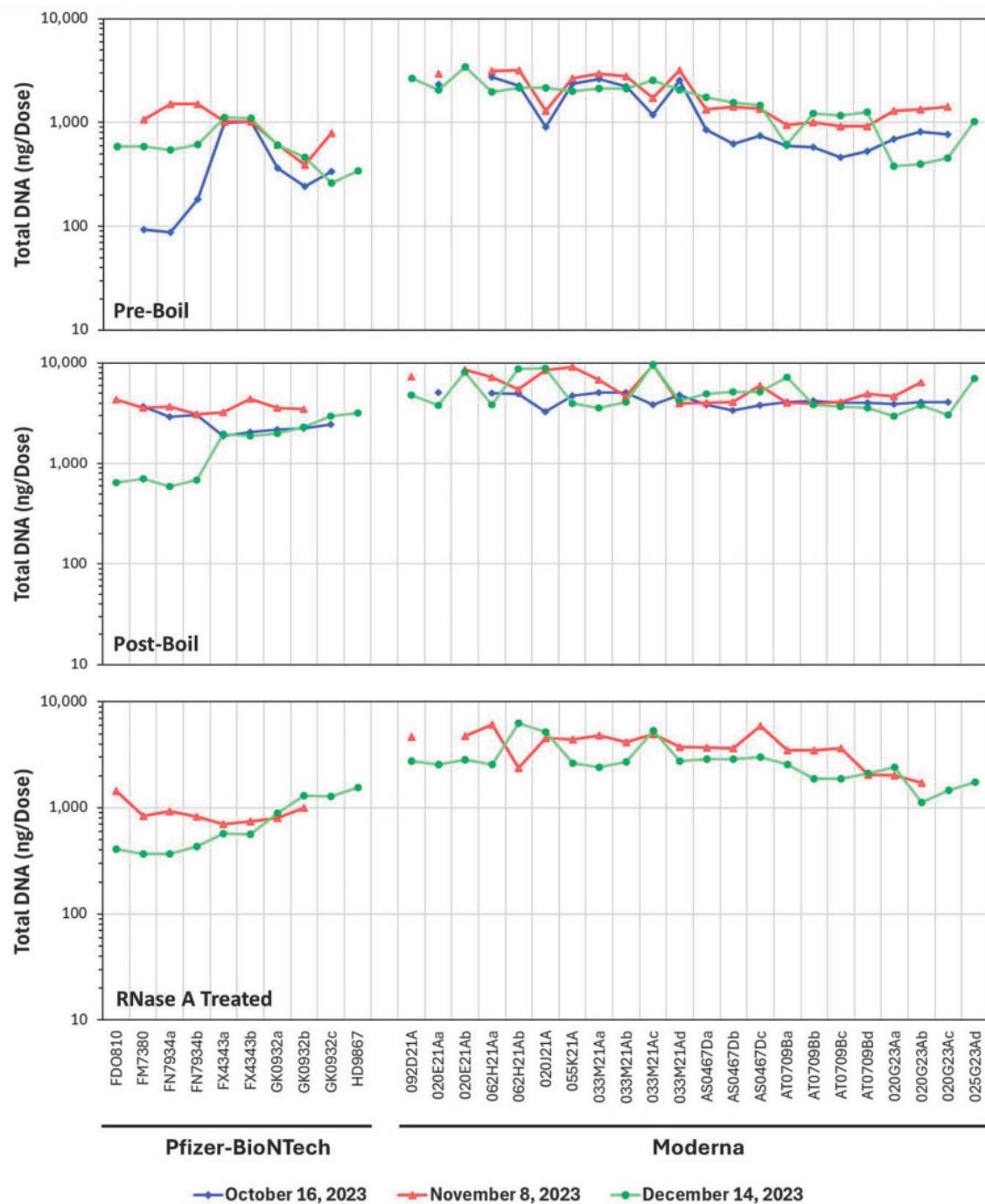


Figure 4. Qubit measurements were repeated after a freeze-thaw cycle to understand the variance one may observe shipping frozen vials lab to lab. Qubit® measurements were taken at three different time points (October, November and December 2023) directly from the vial (pre-boil), after a 95°C boil step (post-boil) and at three time points after RNase A digestion.

the lots. These data involving vaccine vials distributed in Canada are consistent with several non-peer reviewed and peer reviewed reports of DNA contamination in modRNA vaccines (McKernan, Buckhaults, Konig, Raoult, Kämmerer, Wang) [8,23–26].

Moderna had the lowest DNA concentration by qPCR but the highest concentration with Qubit. The Moderna vials had the most consistent levels of DNA between vials suggesting a more robust and standardized manufacturing process. In each vial of the Moderna product, except for lot AS0467D, *ori* displayed lower loads (Ct > 6) than spike suggesting a more effective removal of the vector DNA.

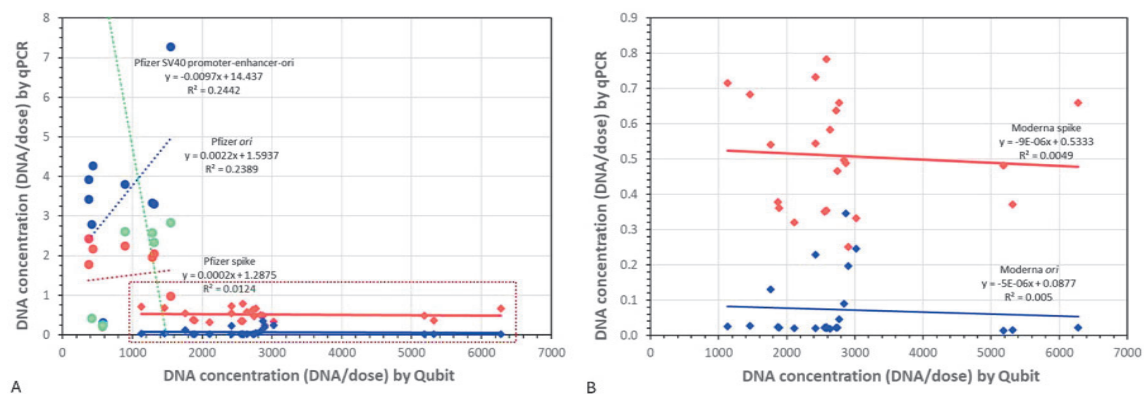


Figure 5. Graphical comparison of residual DNA concentration for spike (red), *ori* (blue), and SV40 promoter-enhancer-*ori* (green) determined by qPCR and total residual DNA concentration in individual vials as determined by qubit®. In panel a both Pfizer and Moderna data are plotted on the same scale. The Y-axis was adjusted to see all samples, except the three SV40 promoter-enhancer-*ori* results. The Moderna data are enclosed in a red box and displayed separately with an enlarged scale in panel B, to display detail.

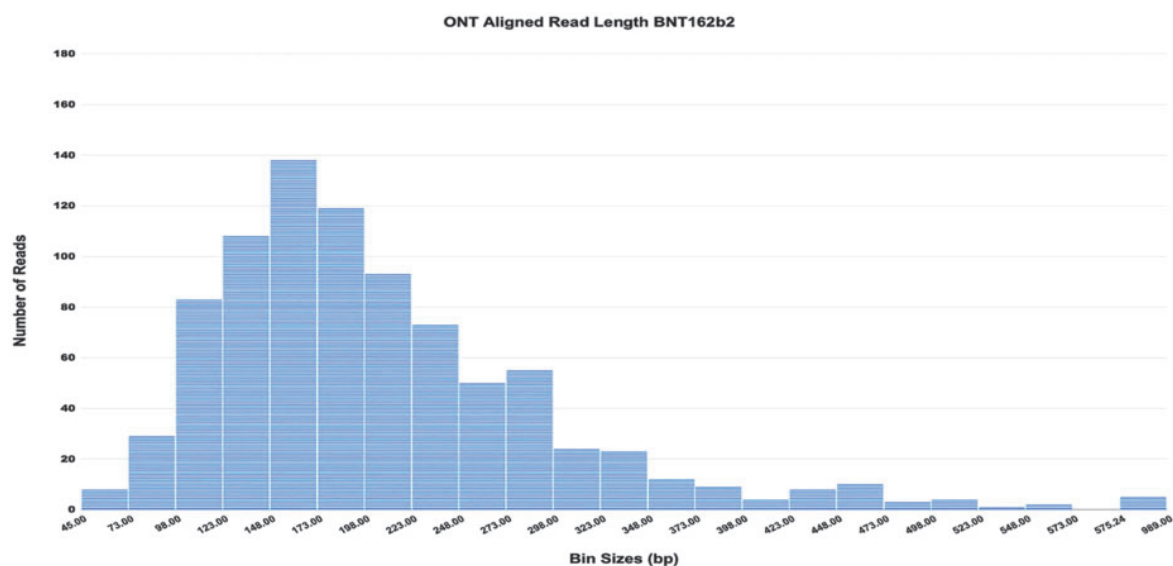


Figure 6. Oxford nanopore (ONT) read length distributions from 865 reads mapped to the vector sequence (NCBI OR134577.1). Mean = 214bp. Max = 3.5kb.

Possibly, homologous modified RNA may prevent digestion of template DNA by hybridization [4]. Of note, AS0467D represents bivalent BA.1 vaccine, which was noted to consist of two separate LNPs containing different purities of mRNA that were mixed together in the final product [27]. As DNase I is inhibited by RNA-DNA hybrids, the different modRNA constructs may present different secondary structure or hybridization potential with DNA and alter DNase I activity compared to other Moderna vaccines. This extreme difference in the spike and *ori* genetic targets points to a manufacturing variance that should not exist and highlights the importance that the regulators should not rely on a single PCR assay to determine the load of the residual plasmid DNA in the final drug product.

The vials with the highest DNA concentration were from two lots of Pfizer monovalent purple top vials with a PBS formulation and require dilution before administration. On October 29, 2021, the US FDA authorized a change of formulation to a Tris/sucrose buffer; the grey topped monovalent adult vaccine, and an orange topped vaccine for children aged 6–11 years. This change was made to increase stability, to simplify storage requirements and to provide a ready-to-use formulation [28,29]. These purple-topped Pfizer lots were also associated with some of the highest number of AEs and SAEs reported in VAERS among all the lots tested. The reason for this difference is not known, but

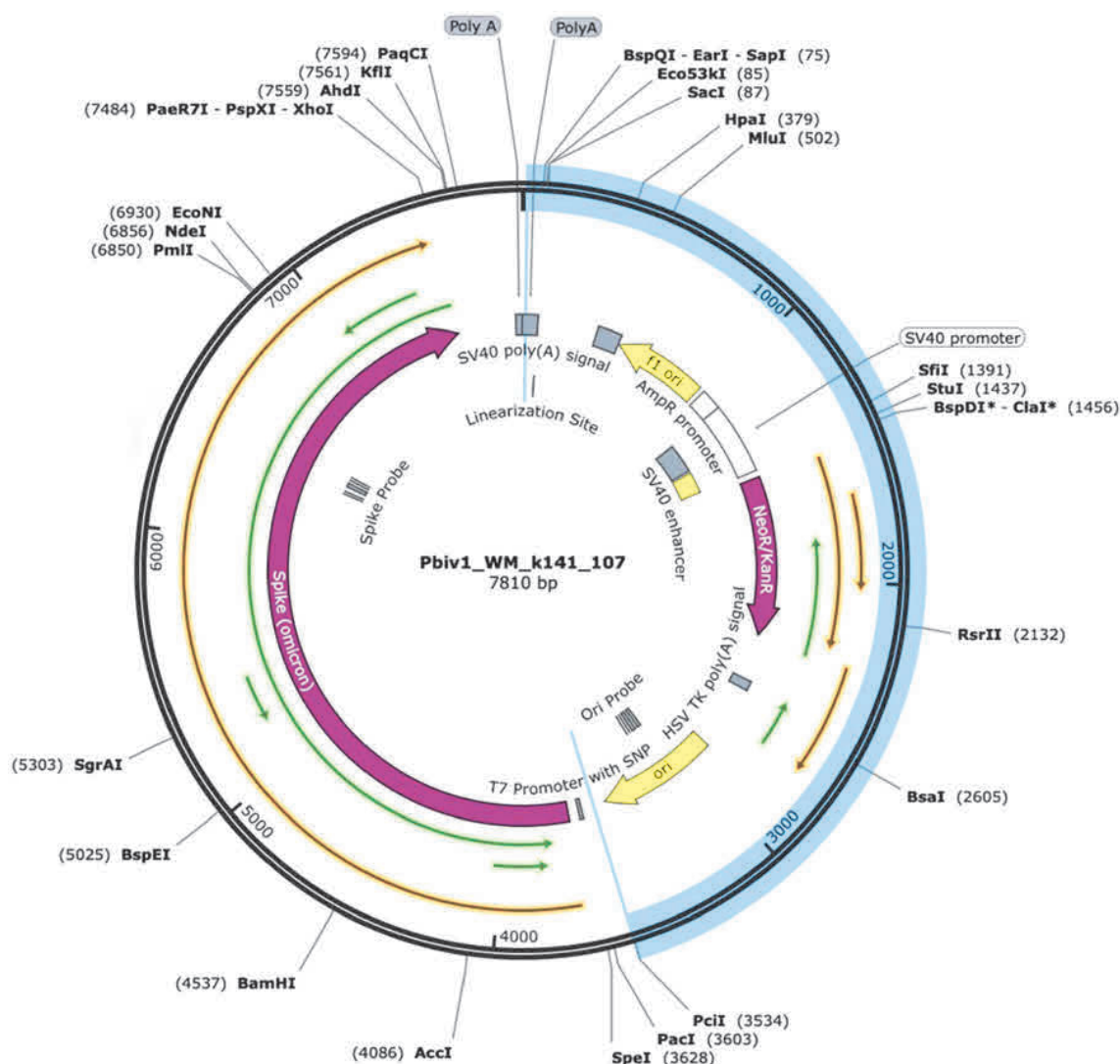


Figure 7. The longest oxford nanopore (ONT) read aligns to the vector region shown in blue. *ori* and spike primer locations are annotated on the innermost circle. Open reading frames (ORFs) are annotated in gold and green arrows. Kanamycin resistance genes were detected in a very shallow sequencing survey of the vaccine.

the use of PBS buffer resulted in visible particles in the final drug product which may be associated with toxicities including microemboli and inflammatory reactions [30]. Furthermore, lipid impurities due to lipid hydrolysis and aldehyde formation were observed resulting in lipid adducts which may have toxicological implications. The use of a Tris buffer acts as an “aldehyde sink” reducing LNP impurities as detected by Moderna scientists [31]. Adducts result in the loss of modRNA function and may affect the higher order structure of mRNA and changes to mRNA kinetics or other unknown factors may be responsible [32].

The inter and intra-lot variability in residual DNA continues to be demonstrated even after 3 years of manufacturing experience. This continued variability, especially in the Pfizer vials, is perhaps more fundamental than achieving a low level of impurities since it demonstrates an inconsistent manufacturing process and likely occurs with other process and product-related impurities. DNase purity and robustness may differ between vendors or lots of the DNase enzyme [33]. Small differences in the IVT process or other factors may also play a role in the variability of residual DNA. The DNase digestion step of the Pfizer/BioNTech vaccine was subject to a recommendation by the EMA to enhance the robustness of the method at the time of approval [34]. However, a FOIA obtained in Germany showed ongoing issues with the consistency of residual DNA levels within and among Pfizer/BioNTech manufacturing sites, the use of in-house “standards,” and a lack of

Significant fractions of the LNPs are DNaseI protected

This implies 10-30% of the nucleic acid isn't packaged in an LNP

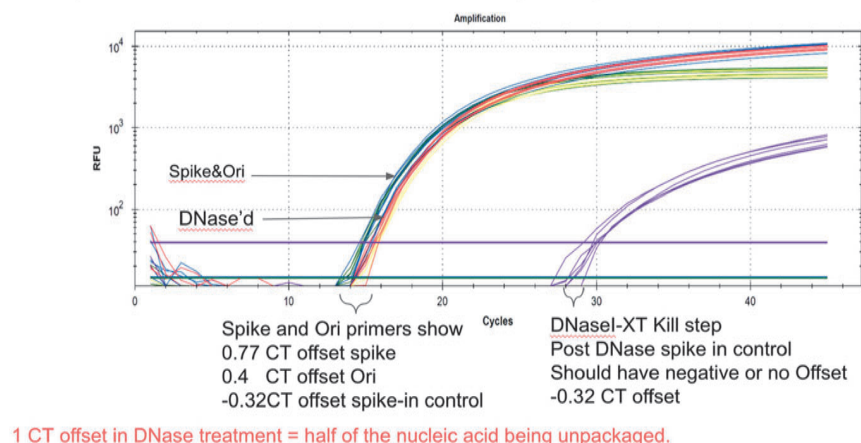


Figure 8. DNase I-XT treatment of Pfizer vaccine demonstrates nuclease resistance of the DNA in the vaccines.

Grim Reefer method eliminates all DNA at 37°C in 30 minutes.
2ul in qPCR of a 1:10 dilution of GR control = 15CT
LNPs protect against this activity.

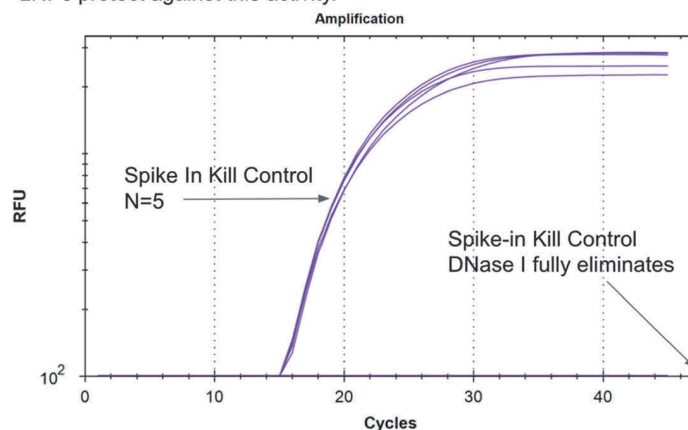


Figure 9. DNase I-XT positive control demonstrates the digestion assay eliminates all spiked in DNA under the same conditions used to assess the vaccine nuclease sensitivity.

correlation between the activity of the DNase enzyme and residual DNA a full 15 months after authorization [35]. This demonstrates ongoing efforts to remove DNA fragments were met with limited success.

Our exploratory analysis of the relationship between the residual DNA content and SAEs reported to VAERS is preliminary and limited in sample size but warrants confirmation by examining many more lots and vials. This preliminary analysis appears to show a correlation between the adverse events reported for each lot and the levels of DNA, especially in the context of the *ori*. More testing of vials from other independent laboratories, including prospective long-term monitoring, is required to confirm our results and confirm whether a correlation exists. When tested by qPCR, Pfizer lot FD0810, the oldest Pfizer lot examined, exhibited lower levels of spike and SV40 promoter-enhancer-ori with comparable *ori* DNA levels to other adult monovalent (purple-topped) vials, yet it was associated with the highest reported total AEs in VAERS. We only tested a single vial, which may not represent the entire lot. Without knowing the lot sizes or how many people received doses from each lot, correlating SAEs to specific lots is challenging with data from just 16 lots. If a lot associated with high SAEs was administered to significantly more people it could skew the SAEs-per-person ratio, further complicating efforts to establish a clear correlation. However, our findings suggests that beyond

plasmid DNA levels, issues related to the LNPs, toxicity, autoimmunity and/or aberrant immune responses due to ribosomal frameshifting may attribute to AEs, including Complement Activation-Related Pseudoallergy (CARPA), may contribute to AEs shortly after vaccination [36–41]. The random composition of DNA fragments in these vials complicates direct correlation between plasmid DNA levels and specific adverse reactions because the genotoxic effects of each fragment vary unpredictably depending on their sequence and interaction with the host genome. This variability makes it impossible to precisely estimate adverse effects based solely on DNA quantity. Higher DNA loads might also contribute to long-term health risks, such as cancer from genomic integration events. VAERS primarily captures short-term AEs and may underreport long-term effects. Further vial testing is needed to establish a dose-response curve using VAERS data. Long-term prospective monitoring is essential to assess the impact of genetic vaccines, especially since the spike protein has been detected up to 704 days post-vaccination [42].

Different relationships were observed for Moderna lots for qPCR data as well as for plots based on residual DNA estimated by fluorometry for both Pfizer and Moderna lots. These observations may reflect differences between the two products such as dose volume, quantity of DNA, the size distribution of DNA fragments, the composition and sequence of the plasmid vector and composition of lipid nanoparticles. Other differences, both between the two products and between different lots of each product, may also contribute to our observations. These differences include variations in levels of contaminants or impurities. One major source of impurity is fragmented mRNA for which several toxicological mechanisms have been proposed, such as its effects on miRNA processes [43]. dsRNA is another type of impurity that occurs secondarily to the T7 RNA polymerase promoter. dsRNA can induce pro-inflammatory cytokines [44] and has been hypothesized to contribute to immune-inflammatory reactions such as myocarditis [45]. Lipopolysaccharides in cells from endotoxin can bind both the S1 and S2 subunits of the spike protein which may result in enhanced inflammatory responses [46].

Wider sampling will likely reveal greater detail in terms of event types, such as death, as well as comparisons with other works, such as that reported by Schmeling et al. who reported a correlation of AEs to various vaccine lot numbers [47]. None of the presently studied vaccine lots were included in the Schmeling study and more work is needed to understand if and how this DNA contamination is related to AEs.

While the SV40 enhancer facilitates nuclear targeting [16,48], genomic integration of DNA fragments has yet to be demonstrated for the COVID-19 modRNA products [49]. However, it is known that DNA contamination could trigger an unwarranted innate immune response and may be pro-thrombotic, particularly for fragments with high GC content [50]. dsDNA may also be a significant factor in ischemic diseases including stroke [51]. Cytosolic DNA is also known to trigger cGAS-STING and chronic stimulation of this pathway is believed to be pro-oncogenic [52]. Moderna US patent #10,898,574 also emphasizes the insertional mutagenesis risk of residual DNA in their vaccines. While there appears to be a correlation between high DNA contamination and SAEs more research is needed to expand the sample size and elucidate any potential mechanism at work.

It is important to emphasize that as qPCR cannot quantitate molecules smaller than the size of the amplicon (105–114bp), qPCR underestimates the total DNA in each vaccine. The failure for qPCR to fully quantitate residual DNA in mRNA vaccines is described in Moderna patent #US 10,077,439. It is important to emphasize that the use of a single amplicon for qPCR can lead to 100-fold different estimates in some vaccines. The Spike DNA in some Moderna vaccines is ~100 fold more prevalent (~6CTs) than the non-spike DNA suggestive of DNase I inhibition with complementary RNA [4].

This explains the large differences we have observed in residual DNA levels estimated by qPCR compared with Qubit® fluorometry particularly between the Pfizer and Moderna products. The much larger values obtained for the Moderna product could partially be due to the larger dose volume but also suggests that there is a higher fraction of small fragmented residual DNA than in the Pfizer product. This is consistent with a more thorough nuclease digestion step. This illustrates the residual DNA guidelines recommended by the FDA are highly dependent on the methods used to quantitate the DNA. Furthermore, PCR assay robustness and reliability needs to be established given the actions of N-1-methylpseudouridine, the presence of RNA-DNA hybrids.

König et al. also found high DNA contamination using Qubit® fluorometry [24]. However, this study lacked an RNase A treatment and is likely over-estimating the amount of the DNA present due to the cross talk of DNA specific dyes intercalating with RNA. While the specificity of these DNA specific fluorometric dyes is well published, little is known about the impact on their specificity when in use with samples that have high concentrations of N1-methyl-pseudouridine modRNA or GC rich RNA prone to secondary structure and minor groove formation. Our Qubit® data showed that variance between sampling and freeze-thaw cycles do occur. This variance could be due to crude nature of the fluorometric assays, freeze-thaw cycles, or due to sampling error especially as sample vortexing and multiple pipetting can introduce air bubble that will alter the LNP size and settling [53]. However, our RNase A data demonstrate that Qubit® fluorometry must be coupled with the removal of the vaccine modRNA to properly quantitate the residual DNA when high concentrations of RNA are co-present.

This fluorometry assessment is of particular interest as fluorometry and UV spectrophotometry were used to quantitate RNA in the Pfizer COVID-19 vaccines, as described in EMA documents [7], while qPCR was used to quantitate DNA. This selective use of different methods to quantitate RNA/DNA ratios can lead to vastly different results for the ratio-metric guidelines in place at the EMA.

This elevated fluorometry quantitation compared to qPCR quantitation is consistent with the ONT read length distributions that also suggest a portion of the DNA may be smaller than the amplicon size. While the ONT sequencer detects molecules shorter than 100 bp, the methods for library construction for ONT use a 0.7X Ampure DNA purification step which drastically selects against purifying molecules <150 bp in size. As a result, the read length distributions for ONT reads are biased toward fragments >150 bp and are not a perfect reflection of the smaller fragments that may be present and undercounted by both ONT and qPCR.

Similarly, Georgiou et al. demonstrate that Fluorometric dyes produce 70% lower signal after DNase I treatment as the dyes provide non-linear signal for longer molecules of the same mass of DNA [54]. These data have not been compensated for this effect and likely reflect an underestimate of the actual quantity in the fluorometric assay. These smaller DNA molecules are also frequently lost during commonly used DNA isolation procedures such as Phenol/Chloroform purification or Ethanol precipitation. Kaiser et al. measured much lower amounts of DNA in their vaccines, but their methods did not ascertain the loss of short DNA fragments after multiple ethanol precipitations [55]. As DNA fragments <100 bp can be lost during purification methods, including ethanol precipitation, it is best to quantify the total DNA directly on the final drug product without any purification steps.

Currently, the US FDA recommends manufacturers of viral vaccines to limit the amount of residual DNA in the final product to below 10 ng/dose for parenteral inoculations and the size of the DNA to below the size of a functional gene, or ~200 base pairs [12]. This is also in keeping with recommendations from the World Health Organization (WHO) [20,56], and is for “naked” DNA, i.e. DNA that is not associated with proteins, lipids, or other molecules for protection or packaging. Previous residual DNA levels were set by the FDA at 10 pg/dose in 1985. A 1986 WHO study group concluded that the risk is negligible up to 100 pg/dose and in 1996 the WHO further increased levels up to 10 ng per dose [20]. However, as the residual DNA is encapsulated in the LNPs and is transfected efficiently directly into cells the DNA guidelines for modRNA vaccines need to be re-evaluated.

The FDA and WHO guidelines for allowable DNA in vaccines are influenced by work published by FDA scientists Sheng-Fowler et al. [57]. This work focused on host cell genomic DNA contamination and made note of the increased number of molecules present when small viral vectors are the contaminating species. For these high copy per nanogram contaminants, femtograms to attograms of DNA are considered the equivalent of nanograms of cell substrate genomic DNA. Given the short fragment size in the modRNA vaccines, the number of molecules in each dose can reach over 100 billion molecules. The residual DNA in these vaccines is high in copy number and rich in promoters, SV40 mammalian origins of replication, ORFs and nuclear targeting sequences. The FDA and WHO guidelines did not consider packaging of DNA in lipid nanoparticles, likely resulting in longer DNA persistence as well as increased transfection efficiency. Furthermore, the guidelines did not consider

cumulative dosing with LNP-based modRNA. Data have shown that LNPs are capable of increasing RNA or DNA cell entry by 10–100-fold [58–60].

In Japan, 13% of the population received seven doses of COVID-19 vaccines with a booster dose interval sometimes as short as 2 months [61]. Moreover, the risks of cumulative dosing by vaccines targeting other infections but using the same plasmid and LNP-based modRNA platform has not been considered in setting the residual DNA guidelines.

The FDA guidelines are also written to only quantitate DNA fragments of 200 bp or greater, in part because fragments smaller than this were not considered to be able to produce a functional gene. However, Klinman et al. suggests that fragments as small as 7 bp can pose integration risks [62]. Furthermore, the guidelines may also have considered that fragments of naked DNA shorter than 200 bp would be more rapidly hydrolyzed by host nuclease activity than larger molecules [63]. This accelerated destruction cannot be assumed of the vaccines due to the DNA being encapsulated and protected by the LNPs.

Klinman et al. also observe that *“in evaluating the potential harm of plasmid integration, it should be noted that the risk of introducing plasmids with strong regulatory regions into the host genome far exceeds that associated with random point mutations.”*

Finally, the guidelines do not consider if the residual DNA contains nuclear targeting sequences, mammalian origins of replication and mammalian promoters that exist in the Pfizer vaccine [49]. Vacik et al. demonstrated that the SV40 enhancer present in the Pfizer vector is a potent nuclear targeting sequence showing promise for gene therapy [48]. Senigl et al. demonstrate the SV40 enhancer is a somatic hypermutability element with tumorigenic potential [64]. Finally, Drayman et al. demonstrate the SV40 Enhancer in the Pfizer vaccine binds to P53, reminding us that the simple nanogram limits of residual DNA need to be reconsidered based on the functionality and replicative capacity of that DNA [65].

Conclusion

These data demonstrate the presence of billions to hundreds of billions of DNA molecules per dose in the modRNA COVID-19 products tested. Using fluorometry coupled with RNase A digestion, all products tested exceeded the guidelines for residual DNA set by the FDA and WHO of 10 ng/dose by 36–627-fold. qPCR testing showed that all Moderna vials were within the regulatory limit and that 3 Pfizer vials exceeded the regulatory limit for the SV40 promoter-enhancer-ori and showed much greater intra- and inter-lot variability. qPCR underestimates the total DNA with results varying greatly by genomic target emphasizing the importance of using more than one assay to accurately determine the DNA load. It is important that regulators produce clear and consistent guidelines on how to quantify mRNA and plasmid DNA in modRNA vaccines. The PCR results for the most recent XBB.1.5 Moderna and Pfizer vaccines suggest that DNA residues have not been reduced from previous vaccine versions.

Our findings extend existing concerns about vaccine safety and call into question the relevance of guidelines conceived before the introduction of efficient transfection using LNPs. With several obvious limitations, we urge that our work is replicated under forensic conditions and that guidelines be revised to account for highly efficient DNA transfection and cumulative dosing.

This work highlights the need for regulators and industry to adhere to the precautionary principle and provide sufficient and transparent evidence that products are safe and effective, and disclose the details of their composition and method of manufacture.

Author contributions

CRedit: **David J. Speicher**: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Project administration, Writing – original draft, Writing – review & editing; **Jessica Rose**: Formal analysis, Methodology, Software, Writing – review & editing; **Kevin McKernan**: Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Methodology, Resources, Writing – original draft, Writing – review & editing.

Disclosure statement

Kevin McKernan is employed by Medicinal Genomics and provided qPCR and Qubit® reagents free of charge. No potential conflict of interest was reported by the author(s).

Funding

This project was self-funded with reagents supplied by Kevin McKernan.

ORCID

David J. Speicher  <http://orcid.org/0000-0002-1745-3263>

Jessica Rose  <http://orcid.org/0000-0002-9091-4425>

Kevin McKernan  <http://orcid.org/0000-0002-3908-1122>

Data availability statement

FASTQ file for the mapped ONT sequencing data: <https://mega.nz/file/UZhkiTBQ#8vjDK5JV5N5Dj2On34B6zdRObEKGBY3ZC7w8q2t9UVc>

References

- [1] de Fougères A, Elbashir SM. Delivery and formulation of engineered nucleic acids. United States Patent and Trademark Office, Modernatx, Inc; 2021. <https://patents.google.com/patent/US10898574B2/en>, <https://patentimages.storage.googleapis.com/29/f1/5c/fda42b8d8dd5ca/US10898574.pdf>
- [2] Guetzkow JA, Levi R. Effect of mRNA vaccine manufacturing processes on efficacy and safety still an open question. *BMJ*. 2023;378:o1731.
- [3] Rabe I, Buff M, Ziegenhals N. In vitro transcription technologies. United States Patent and Trademark Office; 2023. <https://patentimages.storage.googleapis.com/03/aa/75/b6d7d2995c9653/US20230183769A1.pdf>
- [4] Sutton DH, Conn GL, Brown T, et al. The dependence of DNase I activity on the conformation of oligodeoxynucleotides. *Biochem J*. 1997;321(Pt 2):481–486. doi: [10.1042/bj3210481](https://doi.org/10.1042/bj3210481)
- [5] Thorn CR, Sharma D, Combs R, et al. The journey of a lifetime - development of Pfizer's COVID-19 vaccine. *Curr Opin Biotechnol*. 2022;78:102803. doi: [10.1016/j.copbio.2022.102803](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102803)
- [6] Tinari S. The EMA covid-19 data leak, and what it tells us about mRNA instability. *BMJ*. 2021;372:n627. doi: [10.1136/bmj.n627](https://doi.org/10.1136/bmj.n627)
- [7] EMEA/H/C/005735/RR. Rapporteur rolling review critical assessment report: quality aspects. European Medicines Agency; 2020. <https://covidvaccinereactions.com/ema-pfizer-leak/>
- [8] McKernan K, Helbert Y, Kane LT, et al. Sequencing of bivalent Moderna and Pfizer mRNA vaccines reveals nanogram to microgram quantities of expression vector dsDNA per dose. *OSFio*. 2023. doi: [10.31219/osf.io/b9t7m](https://doi.org/10.31219/osf.io/b9t7m). https://osf.io/preprints/osf/b9t7m_v1
- [9] Shimabukuro TT, Nguyen M, Martin D, et al. Safety monitoring in the vaccine adverse event reporting system (VAERS). *Vaccine*. 2015;33(36):4398–4405. doi: [10.1016/j.vaccine.2015.07.035](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.07.035)
- [10] Speicher DJ, Rose J, Gutschi LM, et al. DNA fragments detected in monovalent and bivalent Pfizer/BioNTech and Moderna modRNA COVID-19 vaccines from Ontario, Canada: exploratory dose response relationship with serious adverse events. *OSF Preprints*; 2023. doi: [10.31219/osf.io/mjc97](https://doi.org/10.31219/osf.io/mjc97). https://osf.io/preprints/osf/mjc97_v1
- [11] International Council for Harmonisation (ICH). Q6B: specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products; 1999. Retrieved from <https://database.ich.org/sites/default/files/Q6B%20Guideline.pdf>
- [12] Food and Drug Administration. Chemistry, manufacturing, and control (CMC) information for human gene therapy investigational new drug applications (INDs). U.S. Department of Health and Human Services; 2020. from <https://www.fda.gov/media/113760/download>.
- [13] Public Health Agency of Canada. National Vaccine Catalogue: Vaccine lot. 2024. Retrieved from <https://nvc-cnvc.canada.ca/en/vaccine-lots>
- [14] VAERS Team. Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS) Standard Operating Procedures for COVID-19 (as of 29 January 2021) Retrieved from <https://www.cdc.gov/vaccinesafety/pdf/VAERS-v2-SOP.pdf>
- [15] Port Hedland. Australia - special council meeting agenda - 11 October 2024 attachments. Council of the Town of Port Hedland; 2024. Retrieved from <https://www.porthedland.wa.gov.au/council-meetings/>

- special-council-meetings/special-council-meeting-11-october-2024/247/documents/attachments_scm_11102024.pdf
- [16] Dean DA, Dean BS, Muller S, et al. Sequence requirements for plasmid nuclear import. *Exp Cell Res.* 1999;253(2):713–722. doi: [10.1006/excr.1999.4716](https://doi.org/10.1006/excr.1999.4716)
 - [17] New England Biolabs. NEBioCalculator; 2023.
 - [18] R Development Core Team. R: The R project for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing; 2010. Retrieved from <http://www.R-project.org>
 - [19] Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009;25(14):1754–1760. doi: [10.1093/bioinformatics/btp324](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324)
 - [20] Shin J, Wood D, Robertson J, et al. WHO informal consultation on the application of molecular methods to assure the quality, safety and efficacy of vaccines, Geneva, Switzerland, 7-8 April 2005. *Biologicals.* 2007;35(1):63–71. doi: [10.1016/j.biologicals.2005.12.005](https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2005.12.005)
 - [21] Ban E, Kim A. PicoGreen assay for nucleic acid quantification - Applications, challenges, and solutions. *Anal Biochem.* 2024;692:115577. doi: [10.1016/j.ab.2024.115577](https://doi.org/10.1016/j.ab.2024.115577)
 - [22] VAERS Team. VAERS data users guide; 2020. Retrieved from https://vaers.hhs.gov/docs/VAERSDataUseGuide_November2020.pdf
 - [23] South Carolina Senate. SC Senate Hearing - USC Professor Dr. Phillip Buckhaults; 2023.
 - [24] König B, Kirchner, J.O. Methodological Considerations Regarding the Quantification of DNA Impurities in the COVID-19 mRNA Vaccine Comirnaty*. *Methods Protoc.* 2024, 7(41):1-8. doi: [10.3390/mps7030041](https://doi.org/10.3390/mps7030041)
 - [25] Kämmerer U, Schulz V, Steger K. BioNTech RNA-Based COVID-19 Injections Contain Large Amounts Of Residual DNA Including An SV40 Promoter/Enhancer Sequence. *Science, Public Health Policy and the Law*, 5:1-22. Retrieved from <https://publichealthpolicyjournal.com/biontech-rna-based-covid-19-injections-contain-large-amounts-of-residual-dna-including-an-sv40-promoter-enhancer-sequence/>
 - [26] Wang TJ, Kim A, Kim K. A rapid detection method of replication-competent plasmid DNA from COVID-19 mRNA vaccines for quality control. *J High School Sci.* 2024;8(4):427–439. doi: [10.64336/001c.127890](https://doi.org/10.64336/001c.127890)
 - [27] European Medicines Agency. EMA/896245/2022: Assessment report for Spikevax. 2022 Retrieved from https://www.ema.europa.eu/en/documents/variation-report/spikevax-previously-covid-19-vaccine-moderna-h-c-005791-ii-0075-g-epar-assessment-report-variation_en.pdf
 - [28] U.S. Food and Drug Administration. Emergency use authorization (EUA) for an unapproved product review memorandum. 2021. Retrieved from <https://www.fda.gov/media/153947/download>
 - [29] Food and Drug Administration. Letter of authorization; 2023. Retrieved from <https://www.fda.gov/media/150386/download>
 - [30] U.S. Department of Health and Human Services. Inspection of Injectable Products for Visible Particulates Guidance for Industry, 2021. Retrieved from <https://www.fda.gov/media/154868/download>
 - [31] Packer M, Gyawali D, Yerabolu R, et al. A novel mechanism for the loss of mRNA activity in lipid nanoparticle delivery systems. *Nat Commun.* 2021;12(1):6777. doi: [10.1038/s41467-021-26926-0](https://doi.org/10.1038/s41467-021-26926-0)
 - [32] Hashiba K, Taguchi M, Sakamoto S, et al. Overcoming thermostability challenges in mRNA-lipid nanoparticle systems with piperidine-based ionizable lipids. *Commun Biol.* 2024;7(1):556. doi: [10.1038/s42003-024-06235-0](https://doi.org/10.1038/s42003-024-06235-0)
 - [33] Bushon RN, Kephart CM, Koltun GF, 3rd, et al. Statistical assessment of DNA extraction reagent lot variability in real-time quantitative PCR. *Lett Appl Microbiol.* 2010;50(3):276–282. doi: [10.1111/j.1472-765X.2009.02788.x](https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02788.x)
 - [34] EMEA/H/C/005735/0000. Comirnaty European Public Assessment Report (EPAR). 2021. Retrieved from https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/comirnaty-epar-public-assessment-report_en.pdf
 - [35] European Medicines Agency. EMA/CHMP/50784/2022: type IB variation report; 2022. Retrieved from <https://postvac.org/wp-content/uploads/wpforo/attachments/3025/1252-Type-IB-variation-report.pdf>
 - [36] Oldfield PR, Gutschi LM, McCullough PA, et al. Pfizer/BioNTech's COVID-19 modRNA vaccines: dangerous genetic mechanism of action released before sufficient preclinical testing. *J Am Phys Surgeons.* 2024;29:118–126.
 - [37] Greenhawt M, Abrams EM, Shaker M, et al. The risk of allergic reaction to SARS-CoV-2 vaccines and recommended evaluation and management: a systematic review, meta-analysis, GRADE assessment, and international consensus approach. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2021;9(10):3546–3567. doi: [10.1016/j.jaip.2021.06.006](https://doi.org/10.1016/j.jaip.2021.06.006)
 - [38] Song J, Su D, Wu H, et al. Implications of anaphylaxis following mRNA-LNP vaccines: it is urgent to eliminate PEG and find alternatives. *Pharmaceutics.* 2025;17(6):798. doi: [10.3390/pharmaceutics17060798](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17060798)
 - [39] Wiseman DM, Gutschi LM, Speicher DJ, et al. Ribosomal frameshifting and misreading of mRNA in COVID-19 vaccines produces “off-target” proteins and immune responses eliciting safety concerns: comment on UK study by Mulrone et al. *OSF Preprints*; 2023. Retrieved from [10.31219/osf.io/nt8jh](https://doi.org/10.31219/osf.io/nt8jh)
 - [40] Mulrone TE, Pöyry T, Yam-Puc JC, et al. N1-methylpseudouridylation of mRNA causes +1 ribosomal frameshifting. *Nature.* 2024;625(7993):189–194. doi: [10.1038/s41586-023-06800-3](https://doi.org/10.1038/s41586-023-06800-3)
 - [41] Rubio-Casillas A, Cowley D, Raszek M, et al. Review: n 1-methyl-pseudouridine (m1Ψ): friend or foe of cancer? *Int J Biol Macromol.* 2024;267(Pt 1):131427. doi: [10.1016/j.ijbiomac.2024.131427](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131427)

- [42] Bhattacharjee B, Lu P, Monteiro VS, et al. Immunological and antigenic signatures associated with chronic illnesses after COVID-19 vaccination. medRxiv. 2025. 2025.02.18.25322379; doi: [10.1101/2025.02.18.25322379](https://doi.org/10.1101/2025.02.18.25322379)
- [43] Stati G, Amerio P, Nubile M, et al. Concern about the effectiveness of mRNA vaccination technology and its long-term safety: potential interference on miRNA machinery. *Int J Mol Sci.* 2023;24(2):1404. doi: [10.3390/ijms24021404](https://doi.org/10.3390/ijms24021404)
- [44] Nelson J, Sorensen EW, Mintri S, et al. Impact of mRNA chemistry and manufacturing process on innate immune activation. *Sci Adv.* 2020;6(26):eaaz6893. doi: [10.1126/sciadv.aaz6893](https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz6893)
- [45] Milano G, Gal J, Creisson A, et al. Myocarditis and COVID-19 mRNA vaccines: a mechanistic hypothesis involving dsRNA. *Future Virol.* 2022, 17:191–196 doi: [10.2217/fvl-2021-0280](https://doi.org/10.2217/fvl-2021-0280)
- [46] Samsudin F, Raghuvamsi P, Petruk G, et al. SARS-CoV-2 spike protein as a bacterial lipopolysaccharide delivery system in an overzealous inflammatory cascade. *J Mol Cell Biol.* 2023;14: 1–14.
- [47] Schmeling M, Manniche V, Hansen PR. Batch-dependent safety of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine. *Eur J Clin Invest.* 2023;53(8):e13998. doi: [10.1111/eci.13998](https://doi.org/10.1111/eci.13998)
- [48] Vacik J, Dean BS, Zimmer WE, et al. Cell-specific nuclear import of plasmid DNA. *Gene Ther.* 1999;6(6):1006–1014. doi: [10.1038/sj.gt.3300924](https://doi.org/10.1038/sj.gt.3300924)
- [49] Lim S, Yocum RR, Silver PA, et al. High spontaneous integration rates of end-modified linear DNAs upon mammalian cell transfection. *Sci Rep.* 2023;13(1):6835. doi: [10.1038/s41598-023-33862-0](https://doi.org/10.1038/s41598-023-33862-0)
- [50] Gaitzsch E, Czermak T, Ribeiro A, et al. Double-stranded DNA induces a prothrombotic phenotype in the vascular endothelium. *Sci Rep.* 2017;7(1):1112. doi: [10.1038/s41598-017-01148-x](https://doi.org/10.1038/s41598-017-01148-x)
- [51] Ma X, Xin D, She R, et al. Novel insight into cGAS-STING pathway in ischemic stroke: from pre- to post-disease. *Front Immunol.* 2023;14:1275408. doi: [10.3389/fimmu.2023.1275408](https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1275408)
- [52] Kwon J, Bakhoun SF. The cytosolic DNA-sensing cGAS-STING pathway in cancer. *Cancer Discov.* 2020;10(1):26–39. doi: [10.1158/2159-8290.CD-19-0761](https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0761)
- [53] Matthessen R, Van Pottelberge R, Goffin B, et al. Impact of mixing and shaking on mRNA-LNP drug product quality characteristics. *Sci Rep.* 2024;14(1):19590. doi: [10.1038/s41598-024-70680-4](https://doi.org/10.1038/s41598-024-70680-4)
- [54] Georgiou CD, Papapostolou I, Grintzalis K. Protocol for the quantitative assessment of DNA concentration and damage (fragmentation and nicks). *Nat Protoc.* 2009;4(2):125–131. doi: [10.1038/nprot.2008.222](https://doi.org/10.1038/nprot.2008.222)
- [55] Kaiser S, Kaiser S, Reis J, et al. Quantification of objective concentrations of DNA impurities in mRNA vaccines. *Vaccine.* 2025;55:127022. doi: [10.1016/j.vaccine.2025.127022](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2025.127022)
- [56] World Health Organization. Annex 3: requirements for the use of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biologic medicinal products and the characterization of cell banks. Replacement of Annex 1 of WHO Technical Report Series No. 878; 2013. Retrieved from https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/documents/trs_978_annex_3.pdf
- [57] Sheng-Fowler L, Lewis AM, Jr., Peden K. Issues associated with residual cell-substrate DNA in viral vaccines. *Biologicals.* 2009;37(3):190–195. doi: [10.1016/j.biologicals.2009.02.015](https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.02.015)
- [58] Di J, Du Z, Wu K, et al. Biodistribution and non-linear gene expression of mRNA LNPs affected by delivery route and particle size. *Pharm Res.* 2022;39(1):105–114. doi: [10.1007/s11095-022-03166-5](https://doi.org/10.1007/s11095-022-03166-5)
- [59] Phua KK, Leong KW, Nair SK. Transfection efficiency and transgene expression kinetics of mRNA delivered in naked and nanoparticle format. *J Control Release.* 2013;166(3):227–233. doi: [10.1016/j.jconrel.2012.12.029](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.12.029)
- [60] Turnbull IC, Eltoukhy AA, Fish KM, et al. Myocardial delivery of lipidoid nanoparticle carrying modRNA induces rapid and transient expression. *Mol Ther.* 2016;24(1):66–75. doi: [10.1038/mt.2015.193](https://doi.org/10.1038/mt.2015.193)
- [61] Prime Minister's Office of Japan. COVID-19 vaccines; 2024. <https://japan.kantei.go.jp/ongoingtopics/vaccine.htm>
- [62] Klinman DM, Klaschik S, Tross D, et al. FDA guidance on prophylactic DNA vaccines: analysis and recommendations. *Vaccine.* 2010;28(16):2801–2805. doi: [10.1016/j.vaccine.2009.11.025](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.11.025)
- [63] André M, Reghin S, Boussard E, et al. Universal real-time PCR assay for quantitation and size evaluation of residual cell DNA in human viral vaccines. *Biologicals.* 2016;44(3):139–149. doi: [10.1016/j.biologicals.2016.03.002](https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2016.03.002)
- [64] Šenigl F, Soikkeli AI, Prost S, et al. The SV40 virus enhancer functions as a somatic hypermutation-targeting element with potential tumorigenic activity. *Tumour Virus Res.* 2024;18:200293. doi: [10.1016/j.tvr.2024.200293](https://doi.org/10.1016/j.tvr.2024.200293)
- [65] Drayman N, Ben-Nun-Shaul O, Butin-Israeli V, et al. p53 elevation in human cells halt SV40 infection by inhibiting T-ag expression. *Oncotarget.* 2016;7(33):52643–52660. doi: [10.18632/oncotarget.10769](https://doi.org/10.18632/oncotarget.10769)



Quantificazione del DNA plasmidico residuo e delle sequenze promotrici-potenziatrici SV40 nei vaccini modRNA COVID-19 Pfizer/BioNTech e Moderna dell'Ontario, Canada

David J. Speicher, Jessica Rose e Kevin McKernan

Per citare questo articolo: David j. Speicher, Jessica Rose & Kevin McKernan (2025) Quantificazione del DNA plasmidico residuo e delle sequenze promotrici-potenziatrici SV40 nei vaccini modRNA COVID-19 Pfizer/BioNTech e Moderna provenienti dall'Ontario, Canada, Autoimmunity, 58:1, 2551517, DOI: [10.1080/08916934.2025.2551517](https://doi.org/10.1080/08916934.2025.2551517)

Per collegarsi a questo articolo: <https://doi.org/10.1080/08916934.2025.2551517>



2025 Gli autori. Pubblicato da Informa UK Limited, che opera con il nome commerciale Taylor & Francis Group

Visualizza materiale supplementare 1*

Pubblicato online: 06 settembre 2025.

Invia il tuo articolo a questa rivista 1*

Visualizzazioni dell'articolo: 71 00

Visualizza articoli correlati 1*

Visualizza i dati Crossmark 1*



Quantificazione del DNA plasmidico residuo e delle sequenze promotrici-potenziatrici SV40 nei vaccini modRNA COVID-19 di Pfizer/BioNTech e Moderna provenienti dall'Ontario, Canada

David 1. Speicher^a, Jessica Rose^b e Kevin McKernan^c

^aDipartimento di Patobiologia, Università di Guelph, Guelph, ON, Canada; ^bRicercatore indipendente, Ontario, Canada;

^cMedicinal Genomics, Beverly, MA, USA

ABSTRACT

Per alcuni dei vaccini contro il COVID-19, i principi attivi immessi sul mercato sono stati prodotti in modo diverso rispetto a quelli utilizzati negli studi clinici. La produzione di mRNA modificato con nucleosidi (modRNA) per i vaccini commerciali contro il COVID-19 si basa sulla trascrizione dell'RNA polimerasi di un modello di DNA plasmidico. Studi precedenti hanno identificato livelli elevati di DNA plasmidico nelle fiale dei vaccini modRNA, suggerendo che la rimozione del modello di DNA residuo è problematica. Pertanto, abbiamo quantificato il carico di DNA in un numero limitato di fiale di vaccini modRNA Pfizer-BioNTech e Moderna COVID-19 utilizzando due metodi indipendenti. Il DNA totale e specifici target di DNA sono stati quantificati mediante fluorimetria Qubit e reazione a catena della polimerasi quantitativa (qPCR), rispettivamente su 32 fiale rappresentative di 16 lotti di vaccini unici. Il trattamento con RNasi A è stato utilizzato per valutare l'impatto dell'interferenza dell'RNA nella fluorimetria del DNA. È stata inoltre effettuata una valutazione preliminare della lunghezza dei frammenti di DNA e della sensibilità alla DNasi I. Il DNA totale variava da 371 a 1.548 ng/dose e da 1.130 a 6.280 ng/dose nei prodotti Pfizer e Moderna, rispettivamente. Il DNA specifico di più target di DNA plasmidico variava da 0,22 a 7,28 ng/dose per Pfizer e da 0,01 a 0,78 ng/dose per Moderna. Il promotore-potenziatore-ori SV40 (0,25-23,72 ng/dose) è stato rilevato solo nelle fiale Pfizer. Il sequenziamento Oxford Nanopore di una fiala ha rilevato una lunghezza media e massima dei frammenti di DNA rispettivamente di 214 bp e 3,5 kb. Questi dati dimostrano la presenza di frammenti di DNA plasmidico da $1,23 \times 10^3$ a $1,60 \times 10^3$ per dose incapsulati in nanoparticelle lipidiche. Utilizzando la fluorimetria, il DNA totale in tutte le fiale testate ha superato il limite normativo per il DNA residuo fissato dalla Food & Drug Administration (FDA) statunitense e dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) di 36-153 volte per Pfizer e di 112-627 volte per Moderna, dopo aver tenuto conto del legame non specifico con il modRNA. Quando testate con qPCR, tutte le fiale Moderna rientravano nel limite normativo, ma 2/6 lotti Pfizer (3 fiale) superavano di 2 volte il limite normativo per il promotore-potenziatore-ori SV40. La presenza dell'elemento promotore-potenziatore SV40 nelle fiale Pfizer solleva significative preoccupazioni in materia di sicurezza. Questo studio sottolinea l'importanza delle considerazioni metodologiche nella quantificazione del DNA plasmidico residuo nei prodotti modRNA, considerando che l'aumento dell'efficienza di trasfezione LNP e il dosaggio cumulativo presentano rischi significativi e non quantificati per la salute umana.

STORIA DELL'ARTICOLO

Ricevuto il 16 aprile 2025

Rivisto il 16 luglio 2025

Accettato il 10 agosto 2025

PAROLE CHIAVE

COVID-19; vaccino; modRNA; mRNA; DNA residuo; contaminazione da DNA

Introduzione

La sintesi chimica di RNA di grandi dimensioni (>200 bp) è costosa e soggetta a errori. Pertanto, viene utilizzata una polimerasi T7 per generare RNA modificati lunghi (modRNA) da modelli di DNA. I modelli di DNA sono più facili da sintetizzare, ma devono essere rimossi dal prodotto farmaceutico finale. A causa dei limiti della sintesi chimica del DNA, i frammenti o gli oligonucleotidi di DNA vengono prima sintetizzati chimicamente, uniti tramite ligazione enzimatica e polimerizzazione e infine clonati in plasmidi competenti per la replicazione come prodotti a lunghezza intera. La purificazione del DNA plasmidico da *Escherichia coli* (*E. coli*) può essere effettuata attraverso la lisi diretta dell'*E. coli* e la purificazione del DNA plasmidico o attraverso la purificazione tramite reazione a catena della polimerasi (PCR) dell'inserito plasmidico mirato. Questi due diversi metodi di purificazione possono avere

CONTATTI David J. Speicher speicher@uoguelph.ca, research@davidspeicher.com Dipartimento di Patobiologia, Università di Guelph, 50 Stone Rd E, Guelph, ON N1G 2W1, Canada.

I dati supplementari relativi a questo articolo sono disponibili online all'indirizzo <https://doi.org/10.1080/08916934.2025.2551517>.

© 2025 Gli autori. Pubblicato da Informa UK Limited, che opera con il nome commerciale Taylor & Francis Group.

Questo è un articolo ad accesso libero distribuito secondo i termini della licenza Creative Commons Attribution-NonCommercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), che consente l'uso, la distribuzione e la riproduzione senza restrizioni in qualsiasi mezzo, purché l'opera originale sia correttamente citata. I termini in base ai quali questo articolo è stato pubblicato consentono la pubblicazione del manoscritto accettato in un archivio da parte dell'autore o degli autori o con il loro consenso.

differenze significative nella quantità e nel tipo di DNA residuo nei vaccini. Queste fasi di purificazione sono sottolineate nel brevetto US10898574B2 di Moderna e si basano su un metodo senza PCR che purifica direttamente il DNA plasmidico da *E. coli* coltivato in un brodo di kanamicina. Il brevetto di Moderna afferma che un DNA geneticamente modificato (ad esempio DNA plasmidico nudo) confezionato in una nanoparticella lipidica (LNP) viene iniettato direttamente in un ospite vivente e potrebbe causare mutagenesi inserzionale e attivazione di oncogeni o l'inibizione di geni oncosoppressori [1].

Dopo l'approvazione da parte della Food & Drug Administration (FDA) statunitense e l'introduzione del vaccino contro il COVID-19, Pfizer ha modificato il proprio processo di produzione passando dall'amplificazione PCR di un modello di DNA (Processo 1) per la sperimentazione clinica randomizzata (RCT) a un processo di purificazione senza PCR che utilizza plasmidi di DNA (Processo 2) simile a quello utilizzato da Moderna [2]. Il brevetto BioNTech US20230183769A1 fornisce un metodo per la produzione su larga scala di RNA di grado farmaceutico utilizzando reazioni di trascrizione *in vitro* e riduce allo stesso tempo il dsRNA contaminante correlato al processo [3]. Tuttavia, poiché il Processo 2 utilizzava un plasmide batterico da 7,8 Kb invece dell'amplicone PCR da 4,2 Kb utilizzato nel Processo 1 per la trascrizione *in vitro*, è probabile che vi sia stato un forte aumento del DNA residuo nel prodotto farmaceutico finale [1].

A causa delle differenze nella struttura del DNA tra il Processo 1 e il Processo 2, il singolo test qPCR utilizzato da Pfizer per rilevare una porzione specifica del DNA potrebbe non essere sufficiente per una quantificazione accurata. I metodi basati sulla PCR utilizzati nella sperimentazione clinica di Pfizer contengono un DNA di fondo molto diverso rispetto ai vaccini somministrati al pubblico, poiché il processo PCR ha amplificato solo la porzione del plasmide che codifica la sequenza dell'mRNA spike. Il metodo di purificazione *E. coli* del Processo 2 contiene la sequenza del vettore plasmidico con l'inserito clonato della sequenza spike. Pertanto, per una quantificazione completa sono necessari metodi di quantificazione del DNA residuo che valutino sia il plasmide che l'inserito, a differenza del processo di Pfizer che ha eseguito la PCR solo sul gene KAN (cioè il gene di resistenza alla kanamicina) dal vettore plasmidico. Pfizer ha comunicato alle autorità di regolamentazione un test qPCR per la regione spike per confermare la presenza dell'inserito spike, ma non ha fornito alcuna quantificazione da questo secondo test convalidato. Ciò è rilevante in quanto è noto che la DNasi I non riesce a digerire gli ibridi RNA:DNA. Questi ibridi saranno presenti nella sequenza spike dopo la trascrizione *in vitro* (IVT) e potrebbero anche essere presenti sotto forma di RNA residuo dall'espressione plasmidica del gene AmpR-SV40-KAN, poiché si propaga in *E. coli*. Pertanto, l'attività della DNasi I può variare in diverse posizioni del plasmide. I test che misurano solo una posizione del plasmide non riusciranno a quantificare con precisione il DNA residuo nel prodotto farmaceutico finale [4].

I plasmidi Pfizer e Moderna condividono molte caratteristiche, ma differiscono in particolare per il fatto che il plasmide Pfizer è un derivato del pcDNA3.1, un vettore shuttle in grado di replicarsi sia nei batteri che nei mammiferi *tramite* origini di replicazione SV40, potenziatori SV40, promotori SV40 e segnali polyA SV40 [5]. Il modello di DNA plasmidico utilizzato da Pfizer (7.824 bp) e Moderna (6.777 bp) contiene entrambi un'origine di replicazione batterica *ColE1* (genericamente denominata *ori*) attiva in *E. coli*. Entrambi i plasmidi contengono anche un gene aminoglicoside fosfotransferasi (*Neo/Kan*) che consente la selezione dei batteri portatori del plasmide in terreni contenenti kanamicina. Le cellule di *E. coli* vengono quindi raccolte e lisate. Il DNA plasmidico viene estratto, purificato e poi linearizzato con l'enzima di restrizione λ am11041. Questo DNA lineare funge quindi da modello per l'IVT utilizzando la RNA polimerasi T7 in presenza di NI-metil-pseudouridina. È l'aggiunta di NI-metil-pseudouridina che rende questi prodotti vaccini a mRNA modificato con nucleosidi bioingegnerizzati (cioè modRNA). Dopo l'IVT, il DNA viene idrolizzato enzimaticamente con DNasi I, riducendone la prevalenza nel prodotto farmaceutico finale. I documenti forniti da Pfizer all'Agenzia europea per i medicinali (EMA) [6] hanno osservato che il DNA residuo nei prodotti modRNA realizzati con questo processo potrebbe variare in modo significativo [7].

Nel 2023, McKernan et al. hanno sottoposto le fiale del vaccino modRNA contro il COVID-19 a RNA di nuova generazione.

sequenziamento e hanno trovato prove inaspettate di DNA derivato dai plasmidi modello usati durante la produzione [8]. Questo ha mostrato che sia il vaccino Pfizer che quello Moderna contenevano componenti plasmidici ad alto numero di copie con diverse sequenze di DNA residue. Inoltre, McKernan et al. hanno scoperto che tutti i vaccini Pfizer contenevano sequenze promotrici-potenziatrici-ori SV40 e sequenze di segnale polyA SV40 utilizzate come promotori per il marcatore selezionabile Kan/Neo. Questi componenti di DNA residuo non erano menzionati nelle informazioni richieste nei documenti normativi dell'EMA (pag. 24 Rapporteur Rolling Review 3) [7]. Sulla base di queste informazioni, McKernan et al. hanno sviluppato un metodo qPCR per quantificare il livello di DNA plasmidico residuo nelle fiale di vaccino, prendendo di mira più loci nei plasmidi Moderna e Pfizer [8]. Pertanto, lo scopo di questa ricerca era verificare la presenza e la quantità di plasmide residuo.

DNA e promotore-potenziatore-ori SV40 nei vaccini modRNA COVID-19 di Pfizer e Moderna e confrontare i risultati con gli eventi avversi (AE) segnalati al Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS). A tal fine, abbiamo ottenuto 32 fiale di vaccini modRNA COVID-19 che erano state distribuite in Ontario, Canada. La quantità di specifici target di DNA, ovvero spike, plasmide ori e promotore-potenziatore-ori SV40, è stata determinata mediante qPCR e il carico totale di DNA mediante fluorimetria Qubit. Abbiamo anche esteso le osservazioni di un lavoro precedente (McKernan et al.) studiando la distribuzione dimensionale dei frammenti di DNA e la sensibilità del vaccino alla DNasi 1 per determinare se il DNA residuo fosse confezionato nelle LNP. Abbiamo quindi consultato il VAERS per verificare la presenza di eventuali AE, compresi gli AE gravi (SAE), associati a questi lotti [9]. Questo studio è una versione ampliata di una precedente pre-pubblicazione [10].

Materiali e metodi

Per questo studio, abbiamo utilizzato i termini "DNA residuo", "massa di DNA" o "impurità" (o simili) anziché "contaminazione", in linea con le definizioni normative delle impurità che derivano dal processo di produzione [11,12]. In base alle linee guida della FDA e della Farmacopea degli Stati Uniti (USP), le "impurità" sono sostanze indesiderate inerenti al processo di produzione o alle materie prime utilizzate nella produzione dei vaccini. Le impurità sono tipicamente prevedibili e derivano dai materiali, dai reagenti o dagli intermedi utilizzati durante la produzione. Le impurità includono il dsRNA, gli ibridi RNA:DNA, i frammenti di RNA corti e i frammenti di DNA plasmidico residuo. Il termine "contaminazione" si riferisce invece a sostanze estranee e indesiderate introdotte nel vaccino attraverso fonti esterne, quali fattori ambientali, attrezzature o errori umani, che non fanno parte del processo di produzione previsto. La contaminazione è tipicamente inaspettata e può includere contaminanti microbici (ad esempio batteri, funghi), agenti avventizi (ad esempio virus) o particelle estranee.

Lotti di vaccini contro il COVID-19

Le fiale di Pfizer-BioNTech BNT162b2 (10 fiale; 6 lotti) e Moderna Spikevax mRNA-1273 (22 fiale, 10 lotti) sono state acquistate da varie farmacie dell'Ontario, in Canada (Figura 1 e Tabella 1). Come controllo negativo è stata utilizzata una fiala sterile non aperta di alprostadil 66 mcg/mL in combinazione con papaverina 21,7 mg/mL e fentolamina 1 mg/mL (TriMix). Le fiale non aperte non sono state manomesse in quanto avevano tappi di plastica flip-off intatti con numeri di lotto e date di scadenza stampati. Le fiale erano state conservate nelle farmacie in appositi contenitori per la conservazione dei vaccini a +2-8 °C e sono state trasportate in contenitori isolati con sacchetti di gel congelato prima di essere collocate nel frigorifero del laboratorio di analisi entro 5 ore dal ricevimento. Una fiala Moderna non riportava la data di scadenza stampata, ma era provvista di un codice QR che doveva essere scansionato da un farmacista. Le fiale Moderna XBB.1.5 sono state conservate in modo simile dalla farmacia. I residui delle fiale utilizzate di recente (entro 30 minuti dalla somministrazione) sono stati collocati in un contenitore isolato con sacchetti di gel congelato e trasportati nel frigorifero del laboratorio di analisi entro 12 ore.

Analisi qPCR del DNA spike, ori e promotore-potenziatore-ori SV'40

I test qPCR hanno preso di mira le sequenze spike e plasmid *ori* condivise dai plasmidi di espressione Moderna e Pfizer (Tabella 2). Questi primer sono stati utilizzati anche per testare le fiale del vaccino modRNA COVID-19 in Australia [15]. Il test uniplex SV40 Enhancer è stato progettato per amplificare la sequenza di targeting nucleare unica del plasmide Pfizer [16]. Tutti i test qPCR hanno utilizzato 1 pL da ciascuna fiala aggiunto direttamente a 17,8 JiL di master mix. I kit qPCR sono stati forniti da Medicinal Genomics (codice 420201, Beverly, USA) con il master mix contenente 8,8 JiL di reazione composta da 3,8 JiL di enzima polimerasi (Medicinal Genomics Partf 420201), 0,8 pL di tampone di reazione e 1,0 JiL di miscela Primer-Probe, e 12,2 JiL di ddH₂O. Una miscela primer-sonda è stata assemblata utilizzando 12,5 JiL 100 qM sonda *ori*, 12,5 pL di 100 pM sonda spike, 25 qL di 100 iM primer forward spike, 25 pL di 100 qM primer reverse spike, 25 qL di 100 JiM primer forward *ori*, 25 JiL di primer *ori* reverse 100 pM e 75 JiL di ddH₂O. Tutti



Figura 1. Fiale dei vaccini Pfizer/BioNTech BNT162b2 e Moderna Spikevax mRNA-1273 contro il COVID-19 provenienti dall'Ontario, Canada: (A) Pfizer/BioNTech monovalente e bivalente per adulti; (B) Moderna monovalente XBB.1.5 per adulti; (C) Pfizer-BioNTech monovalente per adulti; (D) Moderna monovalente per bambini/adulti; (E) bivalente Wuhan-BA.1 per bambini/adulti; (F) bivalente per bambini/adulti Wuhan-BA.1 e bivalente per adulti Wuhan BA.4/5; e (G) mix di monovalente per bambini/adulti Moderna e monovalente per adulti XBB.1.5, e monovalente per adulti Pfizer-BioNTech XBB.1.5. Una fiala di monovalente per bambini/adulti Moderna non è stata fotografata.

I test qPCR hanno utilizzato un controllo gDNA sintetico (gBlock, Integrated DNA Technologies (IDT), San Diego, USA) di concentrazione nota (1 ng/pL) per generare una curva di calibrazione derivata da una diluizione seriale di 10 volte.

Il ciclo è stato eseguito su un QuantStudio 3 (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) con una denaturazione iniziale a 95 °C per 3 minuti seguita da 35 cicli a 95 °C per 10 secondi e 65 °C per 30 secondi. La conversione da Cq a ng/pL è stata calcolata utilizzando il software QuantStudio v2.7.0 (ThermoFisher Scientific). La massa dell'amplicone, determinata con il calcolatore di DNA New England BioLabs [17] e la lunghezza (105 bp per *ori*, 114 bp per spike e 152 bp per il promotore-potenziatore-ori SV40), sono stati utilizzati per stimare il totale di nanogrammi (ng) di DNA presente, adeguando la lunghezza dei plasmidi (7.824 bp per Pfizer e 6.777 bp per Moderna). Il numero di copie per dose è stato prima adeguato alle diluizioni (ad esempio, diluizione 1:5 per il monovalente Pfizer per adulti) e poi al volume di ciascuna dose di iniezione per adulti (300 pL per Pfizer e 500 pL per Moderna). Sono state eseguite diluizioni seriali sui tre lotti Pfizer che hanno mostrato la più alta concentrazione di DNA residuo per studiare l'inibizione della PCR da parte delle LNP, poiché la qPCR è stata eseguita direttamente senza alcun trattamento o estrazione.

Tabella 1. Descrizione dei lotti di vaccino mRNA COVID-19 esaminati in questo studio.

Informazioni sulla produzione del vaccino							Dati VAERS	
Produttore	Mono/bivalente	Numero di lotto	Sigillato	Data di approvazione HC	Data di scadenza	Scaduto	Totale AES	Totale SAES
Pfizer-BioNTech	Adulti Monovalente	FD0810	Sigillato	29/07/2021	31/05/2022	Scaduto	941	154
Pfizer-BioNTech	Adulti Monovalente	FM7380	Sigillato	05/01/2022	30/11/2022	Scaduto	64	25
Pfizer-BioNTech	Adulti Monovalente	FN7934a	Sigillato	11/01/2022	31/10/2022	Scaduto	50	25
Pfizer-BioNTech	Adulti Monovalente	FN7934b	Sigillato					
Pfizer-BioNTech	Adulti Monovalente	FX4343a	Sigillato	13/04/2022	31/07/2023	Scaduto	4	
Pfizer-BioNTech	Adulti Monovalente	FX4343b	Sigillato					
Pfizer-BioNTech	Adulti Bivalente	GK0932a	Sigillato	19/10/2022	29/02/2024	In codice	20	2
Pfizer-BioNTech	Adulti Bivalente	GK0932b	Sigillato					
Pfizer-BioNTech	Adulti Bivalente	GK0932c	Sigillato					
Pfizer-BioNTech	Adulti Bivalente	HD9867	Sigillato	28/09/2023	31-10-2024	In codice	14	5
Moderna	Bambini/Adulti Monovalente	092D21 A	Sigillato	13/06/2021	13/02/2022	Scaduto	49	41
Moderna	Bambini/Adulti Monovalente	020E21 Aa	Sigillato	08/07/2021	04/03/2022	Scaduto	6	2
Moderna	Bambini/Adulti Monovalente	020E21 Ab	Sigillato					
Moderna	Bambini/Adulti Monovalente	062H21 Aa	Sigillato	27/10/2021	31/05/2022	Scaduto	10	3
Moderna	Bambini/Adulti Monovalente	062H21 Ab	Sigillato					
Moderna	Bambini/Adulti Monovalente	020J21 A	Sigillato	2021-1 1-18	30-06-2022	Scaduto	7	5
Moderna	Bambini/Adulti Monovalente	055K21 A	Sigillato	16/12/2021	31/07/2022	Scaduto	2	2
Moderna	Bambini/Adulti Monovalente	033M21 Aa	Sigillato	2022-02-1 1	30/09/2022	Scaduto	2	1
Moderna	Bambini/Adulti Monovalente	033M21 Ab	Sigillato					
Moderna	Bambini/Adulti Monovalente	033M21 Ac	Sigillato					
Moderna	Bambini/Adulti Monovalente	033M21 Ad	Sigillato					
Moderna	Bambini/Adulti Bivalente BA.1	AS0467Da	Sigillato	23/09/2022	2023-04-02	Scaduto	0	0
Moderna	Bambini/Adulti Bivalente BA.1	AS0467Db	Sigillato					
Moderna	Bivalente BA.1 per bambini/adulti	AS0467Dc	Sigillato					
Moderna	Adulti Bivalente BA4/5	AT0709Ba	Sigillato	2022-1 1-28	30-10-2023	Scaduto	0	0
Moderna	Adulti Bivalente BA4/5	AT0709Bb	Sigillato					
Moderna	Adulti Bivalente BA4/5	AT0709Bc	Sigillato					
Moderna	Adulti Bivalente BA4/5	AT0709Bd	Sigillato					
Moderna	Adulti Monovalente XBB.1.5	020G23Aa	Non sigillato	15/09/2023	2024-07-29	In codice	0	0
Moderna	Adulti Monovalente XBB.1.5	020G23Ab	Non sigillato					
Moderna	Adulti Monovalente XBB.1.5	020G23Ac	Non sigillato					
Moderna	Adulti Monovalente XBB.1.5	025G23A	Non sigillato	15/09/2023	10/08/2024	In codice	0	0

Ordinati in base alla data di approvazione del lotto da parte di Health Canada, come riportato nel catalogo nazionale canadese dei vaccini[13]. Gli eventi avversi (EA) e gli EA gravi e gli SAE provenienti dal Canada sono stati estratti dal database VAERS disponibile per il download pubblico(<https://vaers.hhs.gov>) [14]. Le lettere minuscole alla fine dei numeri di lotto indicano fiale diverse dello stesso lotto.

Tabella 2. Sequenze di primer e sonde mirate a spike, ori e al promotore-potenziatore-ori SV40.

Nome primer/sonda	Sequenza (5' -3') ^a	Lunghezza dell'amplicone
MedGen Moderna Pfizer Janssen Vax-Spike Forward	AGATGGCCTACCGGTTCA	114 bp
MedGen_Moderna_Pfizer_Janssen_Vax-Spike_Reverse	TCAGGCTGTCTGGATCTT	
MedGen_Moderna_Pfizer_Janssen_Vax-Spike_Probe	5'6-FAM-CGAGAACCA-ZEN-GAAGCTGATCGCCAA-3'IABkFQ [^]	
MedGen_Vax-Vector_Ori_Forward	CTACATACCTCGCTCTGCTAATC	105 bp
MedGen_Vax-Vector_Ori_Reverse	GCGCCTTATCCGGTA ACTATC	
MedGen_Vax-Vector_Ori_Probe	5HEX-AAGACACGA-ZEN-CTTATCGCCACTGGC-3'IABkFQ [^]	
MedGen_SV40-promotore-potenziatore-ori_Forward	GTCAGTTAGGGTGTGGAAAGT GGTGCTGACTAATTGAGATGC	152 bp
MedGen_SV40-promotore-potenziatore-ori_Reverse	5TEX615-CCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGC-3'IABRQSp [^]	
MedGen_SV40-promotore-potenziatore-ori_Probe		

^aPer la progettazione dei primer sono state utilizzate le sequenze del vettore di espressione bivalente Pfizer BNT162b2 (OR134577.1) e del vettore di espressione Moderna mRNA1273 (OR134578.1).

[^]La sonda aveva il terminale 5' marcato con un fluoroforo 6-FAM (6-carbossifluoresceina), un quencher interno ZEN[™], e il terminale 3' marcato con 3' Iowa Black[®] FQ.

La sonda aveva il terminale 5' marcato con un fluoroforo SHEx (esaclorofluoresceina), un quencher interno ZEN[™] e il terminale 3' marcato con 3' Iowa Black[®] FQ.

[^]La sonda aveva l'estremità 5' marcata con un fluoroforo TEX 615 e l'estremità 3' marcata con 3' Iowa Black[®] RQ.

Quod" quantificazione fluorometrica

I reagenti fluorometrici AccuGreen[™] HS (AccuGreen #99820 e tampone di quantificazione del DNA #99979) e gli standard sono stati acquistati da Biotium (San Francisco, USA) per l'analisi Qubit[™] (ThermoFisher Scientific). Le letture fluorometriche sono state inizialmente eseguite direttamente sui vaccini in una miscela da 200 μ L contenente reagenti fluorometrici (190 μ L di una soluzione madre preparata con 995 μ L di tampone HS e 5 μ L di colorante AccuGreen[™] 200X) e 10 μ L di vaccino. I campioni sono stati letti seguendo le istruzioni del produttore su un fluorimetro Qubit[™] 3.0. Questi campioni sono stati poi riscaldati a 95 $^{\circ}$ C per 8 minuti e raffreddati a 4 $^{\circ}$ C per 5 minuti per rompere le LNP e consentire ai coloranti fluorometrici di accedere al DNA. Per valutare il potenziale

segnale derivato dal legame di AccuGreen" all'RNA modificato, 1 JiL di 20 mg/mL RNasi A (NEB# T3018L) è stato aggiunto ai campioni dopo la fase di riscaldamento/raffreddamento e incubato a 37 °C, durante il quale è stata raccolta una serie temporale di misurazioni fluorescenti. Le misurazioni fluorometriche sono state raccolte prima dell'aggiunta di RNasi A e 1, 2, 3, 5 e 10 minuti dopo l'aggiunta di RNasi A.

Dati del sistema di segnalazione degli eventi avversi da vaccino (VAERS)

Il database VAERS è stato analizzato utilizzando il pacchetto Language and Environment for Statistical Computing in R [18] e includeva dati relativi al periodo compreso tra il 17 dicembre 2020 e il 6 ottobre 2023. I dati VAERS relativi agli Stati Uniti sono disponibili per il download in tre file separati in formato CSV (comma separated values) che rappresentano: i) dati generali per ciascuna segnalazione; ii) gli eventi avversi segnalati o "sintomi" e iii) i dati relativi al vaccino, compresi il produttore e il numero di lotto [9]. È inoltre disponibile per il download un set di dati VAERS non statunitense (estero) che contiene le segnalazioni di eventi avversi presentate alle autorità di regolamentazione di paesi non statunitensi in tutto il mondo. Quando viene presentata una segnalazione, viene assegnato un numero ID VAERS per preservarne la riservatezza. Per valutare gli eventi avversi relativi a un particolare vaccino, è necessario unire i tre file di dati utilizzando gli ID VAERS come variabile di collegamento. Per questo studio sono stati inclusi solo i TIPI DI VACCINO COVID-19 (COVID19-1 (monovalente) e COVID19-2 (bivalente)). Altre variabili rilevanti includevano l'ID VAERS*, il lotto del vaccino (VAX LOT), il produttore del vaccino (VAX MANU), i ricoveri ospedalieri (HOSPITAL), la disabilità (DISABLE), le visite al pronto soccorso (ER_ED_VISIT), i difetti alla nascita (BIRTH_DEFECT), gli eventi potenzialmente letali (L THREAT) e i decessi (DIED). I dati sono stati raggruppati per VAX LOT e sono stati conteggiati il numero totale di segnalazioni di AE e SAE. Le segnalazioni di SAE includevano decessi, ricoveri ospedalieri, visite al pronto soccorso, segnalazioni di disabilità, difetti alla nascita e segnalazioni di eventi potenzialmente letali. Sono stati interrogati i dati relativi agli Stati Uniti e ai paesi non statunitensi e, ai fini del presente studio, nei risultati primari sono riportati solo i conteggi dei lotti canadesi. Le segnalazioni canadesi sono state distinte da quelle non statunitensi (straniere) utilizzando la variabile SPLTTYPE che fornisce il codice del paese - nel caso del Canada "CA" - come primi 2 caratteri segnaposto. Le correlazioni tra i dati VAERS e i livelli di DNA per spike, ori e SV40 sono state tracciate e calcolate utilizzando il coefficiente di correlazione di Pearson.

sequenziamento nanopore

La distribuzione delle dimensioni dei frammenti di DNA è stata stimata utilizzando un lotto di vaccino precedentemente sequenziato (Pfizer monovalente per bambini, lotto n. FL8095) [8] come standard utilizzando un Oxford Nanopore Flongle (R.10.4.1, Oxford Nanopore Technologies (ONT), New York, USA) e il kit di sequenziamento Oxford Nanopore Ligation (SQK-LSK114) secondo le istruzioni del produttore. Le letture sono state mappate su NCBI OR134577.1 con il Burrow-Wheeler Aligner con corrispondenze esatte massime (BWA-MEM) [19]. La lunghezza di lettura del sequenziamento ONT è illimitata, ma le procedure di isolamento del DNA necessarie per eseguire il sequenziamento ONT possono influenzare la lunghezza delle molecole catturate nella reazione di ligazione ONT. I frammenti più corti possono andare persi con la cattura del DNA basata su SPRI utilizzata in questi metodi. Le letture di singole molecole sono state contate e raggruppate in base alla loro lunghezza di lettura mappata con BWA-MEM.

Valutazione della sensibilità alla nucleasi

Pfizer Lotf FL8095 è stato utilizzato anche come standard per valutare la sensibilità alla DNasi I del materiale vaccinale. Il DNA confezionato in LNP dovrebbe essere inaccessibile e quindi resistente alla DNasi I, mentre il DNA al di fuori dell'LNP dovrebbe essere labile alla DNasi I.

Il DNA protetto dalla nucleasi è stato stimato trattando 20 pL del vaccino con 2,5 JiL di DNasi I-XT (2 unità/pL, NEB#M0570S, New England BioLabs Inc, Ipswich, USA) in tampone Grim Reefer 10X (Medicinal Genomics #420123-125) e incubando a 37 °C per 30 minuti. Per il controllo, è stato utilizzato 2,5 JiL di ddH₂O al posto della DNasi I-XT. La reazione della DNasi I-XT è stata interrotta utilizzando 2,5 qL di tampone di lisi MGC (Medicinal Genomics f420001). Dopo la fase di inattivazione della DNasi I, è stato aggiunto un DNA di controllo interno amplificabile con qPCR per verificare che la DNasi I-XT fosse stata completamente inattivata (Medicinal Genomics f420123-125). Successivamente, sono stati utilizzati 54 pL di microsfere magnetiche SenSATIVAx (Medicinal Genomics) per

Purificare il DNA dal test DNase I-XT e dai campioni di controllo negativo DNase I-XT. Le sfere magnetiche sono state miscelate con il campione mediante pipetta per 10 volte, incubate a temperatura ambiente per 5 minuti, separate magneticamente e lavate due volte con etanolo al 70% v/v. L'etanolo è stato rimosso e le sfere sono state asciugate per 2 minuti a temperatura ambiente. I campioni sono stati eluiti in 30 pL di ddH₂O e 1 qL di eluato è stato esaminato mediante qPCR per spike e *ori* in una reazione da 18,8 J₁L. Un primer e una sonda di controllo aggiuntivi per l'inattivazione della DNasi I (0,5 pL di sonda marcata con CY5) sono stati aggiunti al test per una reazione totale di 19,3 pL.

Risultati

Test qPCR/t del DNA residuo

Abbiamo convalidato l'accuratezza del metodo di quantificazione qPCR utilizzando una curva standard di diluizione seriale a 8 log utilizzata per calibrare i valori C_q del campione e generato valori R² di 0,998, 0,999, 0,906 ed efficienze del 99,8%, 94,7% e 93,6% rispettivamente per gli ampliconi spike, *ori* e SV40 promotore-potenziatore-ori. Su tutte le piastre, i controlli negativi e i controlli senza modello (ddH₂O) (NTC) sono stati testati in triplicato e sono risultati negativi.

I test iniziali, eseguiti su campioni di vaccino non diluiti, hanno mostrato che tutte le fiale Pfizer erano positive per spike, *ori* e SV40 promoter-enhancer-ori. Per le singole fiale, il qPCR per Pfizer ha amplificato in tempi simili per spike, *ori* e SV40 enhancer-promoter-ori (qC_q medio 0,89+ 0,2f). Nonostante il lotto FX4343 di Pfizer si sia amplificato leggermente più tardi rispetto alle altre fiale, la differenza tra le fiale era minima (spike qC_q 17,86+ 1,58; *ori* qC_q 17,91+ 2,05; promotore-potenziatore-ori SV40 qC_q 15,46+ 2,02). Anche la differenza tra le fiale di ciascuno dei target era minima per Moderna (spike C_q 20,65+ 0,88; *ori* C_q 25,48+ 1,32). Tuttavia, per tutte le fiale Moderna, ad eccezione del lotto AS0467D (Bivalent BA.1), *ori* ha amplificato in modo coerente.

2,95+ 0,30 cicli dopo il picco. Il promotore-potenziatore-ori SV40 è stato rilevato in tutte le fiale Pfizer ma in nessuna delle fiale Moderna.

Per valutare l'inibizione dell'LNP sull'efficienza della reazione qPCR, le fiale dei lotti FM7380 e FN7934 sono state sottoposte a una diluizione seriale di 10 volte. La risposta prevista di -3,3 del ciclo di quantificazione (C_q) è stata osservata solo dopo la diluizione 1:10, suggerendo che esiste una certa inibizione dell'LNP che potrebbe influire sulla quantificazione del DNA a queste diluizioni. Pertanto, i dati delle diluizioni 1:10 sono stati utilizzati per ulteriori analisi. Questa diluizione, così come il fatto che alcune delle dosi erano state progettate per essere diluite prima dell'uso, è stata presa in considerazione nei nostri calcoli.

Quantità di frammenti di DNA residuo specifici determinata mediante qPCR

Il test qPCR delle fiale diluite 1:10 ha prodotto valori C_q per *ori* e spike compresi tra 18,44 e 24,87 e tra 18,03 e 23,83 per Pfizer e 25,24-30,10 e 22,35-24,53 per Moderna, rispettivamente (Tabella 3). Il test SV40 promotore-potenziatore-ori ha prodotto valori C_q compresi tra 17,46 e 24,65 nelle fiale Pfizer e non ha amplificato nelle fiale Moderna. La riproducibilità dei test spike, *ori* e SV40 è stata rispettivamente di 0,72+ 0,14, 0,74+ 0,23 e 0,65+ 0,16 per Pfizer e di 0,83+ 0,14, 0,89+ 0,18 e negativa per Moderna. Dopo i calcoli, la quantità di DNA residuo variava in modo sostanziale tra i lotti Pfizer analizzati [0,22-2,43 ng/dose per spike, 0,28-7,28 ng/dose per *ori* e 0,25-23,72 ng/dose per SV40 promotore-potenziatore-ori], ma era più consistente nei lotti Moderna [0,25-0,78 ng/dose per spike e 0,01-0,34 ng/dose]. Sebbene Pfizer presentasse una quantità di DNA residuo sostanzialmente superiore rispetto a Moderna, solo il DNA promotore-potenziatore-ori SV40 dei lotti FM7380 e FN7934 superava la guida della FDA di 10 ng di DNA/dose (Figura 2). I lotti FM7380 e FN7934 erano fiale monovalenti Pfizer con tappo viola e formulazione PBS.

DNA totale determinato mediante fluorimetria

Le misurazioni basate sul fluorimetro (ad esempio Qubit®) dei vaccini hanno mostrato che le fiale Moderna contenevano costantemente una quantità di DNA totale molto maggiore rispetto alle fiale Pfizer (Figura 3). Il DNA totale rilevato nel vaccino puro (cioè direttamente dalle fiale) era 621+ 282 ng/dose (intervallo: da 262 a

Tabella 3. Test qPCR su tutte le fiale Pfizer-BioNTech e Moderna diluite 1:10 con risultati per SARS-CoV-2 spike, ori e SV40 promoter-enhancer-ori on.

Produttore	Lotto	Spike			Plasmide Origine della replicazione (uno)			promotore-potenziatore-ori SV40		
		Cq	Totale ng/dose	Copie totali/dose	Cq	Totale ng/dose	Totale copie/dose	Cq	Totale ng/dose	Copie totali/dose
Pfizer-BioNTech	FD0810	20,17	0,43	3,69E+ 09	19,90	2,80	2,60E+ 10	20,76	0,43	2,92E+ 09
Pfizer-BioNTech	FM7380	18,03	2,43	2,07E+ 10	18,57	3,92	3,64E+ 10	18,18	16,06	1,09E+ 11
Pfizer-BioNTech	FN7934a	18,47	1,79	1,53E+ 10	18,77	3,43	3,18E+ 10	17,46	23,72	1,60E+ 11
Pfizer-BioNTech	FN7934b	18,19	2,18	1,86E+ 10	18,44	4,27	3,96E+ 10	17,96	18,10	1,22E+ 11
Pfizer-BioNTech	FX4343a	23,53	0,27	2,30E+ 09	24,71	0,32	2,94E+ 09	24,59	0,26	1,73E+ 09
Pfizer-BioNTech	FX4343b	23,83	0,22	1,86E+ 09	24,87	0,28	2,64E+ 09	24,65	0,25	1,68E+ 09
Pfizer-BioNTech	GK0932a	20,46	2,25	1,92E+ 10	21,01	3,81	3,54E+ 10	20,27	2,61	1,77E+ 10
Pfizer-BioNTech	GK0932b	20,60	2,05	1,75E+ 10	21,22	3,32	3,08E+ 10	20,49	2,35	1,59E+ 10
Pfizer-BioNTech	GK0932c	20,66	1,97	1,68E+ 10	21,21	3,33	3,09E+ 10	20,29	2,58	1,74E+ 10
Pfizer-BioNTech	HD9867	21,24	0,99	8,46E+ 09	20,81	7,28	6,75E+ 10	20,12	2,84	1,92E+ 10
Moderna	092D21A	22,35	0,66	5,64E+ 09	27,88	0,04	4,16E+ 08	Negativo		
Moderna	020E21Aa	23,66	0,35	3,02E+ 09	29,47	0	1,87E+ 08	Negativo		
Moderna	020E21Ab	24,52	0,50	4,24E+ 09	29,99	0,09	8,26E+ 08	Negativo		
Moderna	062H21Aa	22,52	0,78	6,69E+ 09	29,21	0,02	2,23E+ 08	Negativo		
Moderna	062H21Ab	22,76	0,66	5,64E+ 09	29,37	0,02	2,00E+ 08	Negativo		
Moderna	020J21A	23,21	0,48	4,12E+ 09	30,10	0,01	1,23E+ 08	Negativo		
Moderna	055K21A	22,94	0,58	4,98E+ 09	29,58	0,02	1,74E+ 08	Negativo		
Moderna	033M21Aa	23,04	0,54	4,65E+ 09	29,46	0,02	1,88E+ 08	Negativo		
Moderna	033M21Ab	22,81	0,64	5,44E+ 09	29,38	0,02	1,99E+ 08	Negativo		
Moderna	033M21Ac	23,59	0,37	3,18E+ 09	29,87	0,02	1,43E+ 08	Negativo		
Moderna	033M21Ad	23,26	0,47	3,98E+ 09	29,39	0,02	1,97E+ 08	Negativo		
Moderna	AS0467Da	23,20	0,49	4,17E+ 09	25,24	0,34	3,20E+ 09	Negativo		
Moderna	AS0467Db	24,16	0,25	2,14E+ 09	26,08	0,20	1,82E+ 09	Negativo		
Moderna	AS0467Dc	23,75	0,33	2,85E+ 09	25,74	0,25	2,28E+ 09	Negativo		
Moderna	AT0709Ba	23,68	0,35	2,99E+ 09	29,30	0,02	2,09E+ 08	Negativo		
Moderna	AT0709Bb	23,56	0,38	3,24E+ 09	29,25	0,02	2,16E+ 08	Negativo		
Moderna	AT0709Bc	23,63	0,36	3,09E+ 09	29,34	0,02	2,04E+ 08	Negativo		
Moderna	AT0709Bd	23,80	0,32	2,74E+ 09	29,44	0,02	1,91E+ 08	Negativo		
Moderna	020G23Aa	24,42	0,73	6,26E+ 09	29,42	0,23	2,13E+ 09	Negativo		
Moderna	020G23Ab	24,46	0,71	6,11E+ 09	29,87	0,03	2,33E+ 08	Negativo		
Moderna	020G23Ac	24,53	0,68	5,84E+ 09	29,74	0,03	2,55E+ 08	Negativo		
Moderna	025G23A	24,38	0,54	4,62E+ 09	29,30	0,13	1,20E+ 09	Negativo		

I calcoli per Pfizer e Moderna si basavano su dosi per adulti rispettivamente di 0,30 ml e 0,50 ml. Moderna è indicata anche per i bambini di età compresa tra 6 e 12 anni con una dose di 0,25 ml, il che rende il totale risultante in ng/dose pari alla metà di quello somministrato agli adulti. Il totale ng/dose è stato adeguato in base alla lunghezza dell'amplicone (105 bp ori, 114 bp spike), che rappresenta solo una frazione del plasmide Pfizer da 7.824 bp e del plasmide Moderna da 6.777 bp. Le lettere minuscole alla fine dei numeri di lotto indicano fiale diverse dello stesso lotto. Promotore-potenziatore-ori 88SV40.

1.116 ng/dose) per Pfizer e 1.661+ 793 ng/dose (intervallo: da 379 a 3.430 ng/dose) per Moderna. L'ebollizione della soluzione fluorometrica contenente il vaccino ha causato la lisi delle nanoparticelle lipidiche, rilasciando sia il DNA residuo che il modRNA e aumentando notevolmente la quantità di DNA totale rilevata a 1.696+ 987 ng/dose (intervallo: da 590 a 3.180 ng/dose) per Pfizer e 5.210+ 2.095 ng/dose (intervallo: da 2.980 a 9.700 ng/dose) per Moderna. Questo aumento della fluorometria era dovuto anche all'interferenza tra il modRNA e i coloranti fluorometrici [21]. L'aggiunta di RNasi A ha rapidamente degradato il modRNA e ridotto la fluorometria, che si è stabilizzata dopo 1 minuto. Dopo 10 minuti di RNasi A, il DNA totale rilevato nelle fiale del vaccino era 775+ 448 ng/dose (intervallo: da 371 a 1.548 ng/dose) per Pfizer e 2.821+ 1.244 ng/dose (intervallo: da 1.130 a 6.280 ng/dose) per Moderna. Questa elevata quantità di DNA totale in entrambi i vaccini suggerisce che un'alta percentuale del DNA è al di sotto della gamma di dimensioni degli ampliconi qPCR (cioè è fortemente degradata) e che Moderna ha utilizzato una quantità sostanzialmente maggiore di DNA plasmidico.

A causa dello sviluppo del metodo e dell'acquisizione dei vaccini in momenti diversi, i vaccini sono stati testati più volte mediante fluorometria (Figura 4). La varianza media direttamente dalla fiala (pre-ebollizione) era di 317+ 278 ng/dose (intervallo: 43-727 ng/dose) e 456+ 121 ng/dose (intervallo: 199-675 ng/dose), dopo la bollitura era pari a 1.145+ 533 ng/dose (intervallo: 519-1.949 ng/dose) e 1.554+ 1.023 ng/dose (intervallo: 176-3.169 ng/dose), mentre dopo il trattamento con RNasi A era pari a 297+ 217 ng/dose (intervallo: 100-765 ng/dose) e 1.065+ 624 ng/dose (intervallo: 113-2.365 ng/dose) rispettivamente per Pfizer e Moderna.

Abbiamo tracciato i valori residui del DNA ottenuti mediante fluorimetria Qubit rispetto a quelli ottenuti mediante qPCR (Figura 5). Per il prodotto Pfizer, le linee di tendenza per le stime ori e spike avevano entrambe una pendenza positiva. Il grafico per il prodotto Moderna differisce da quello del prodotto Pfizer con una sovrapposizione minima.

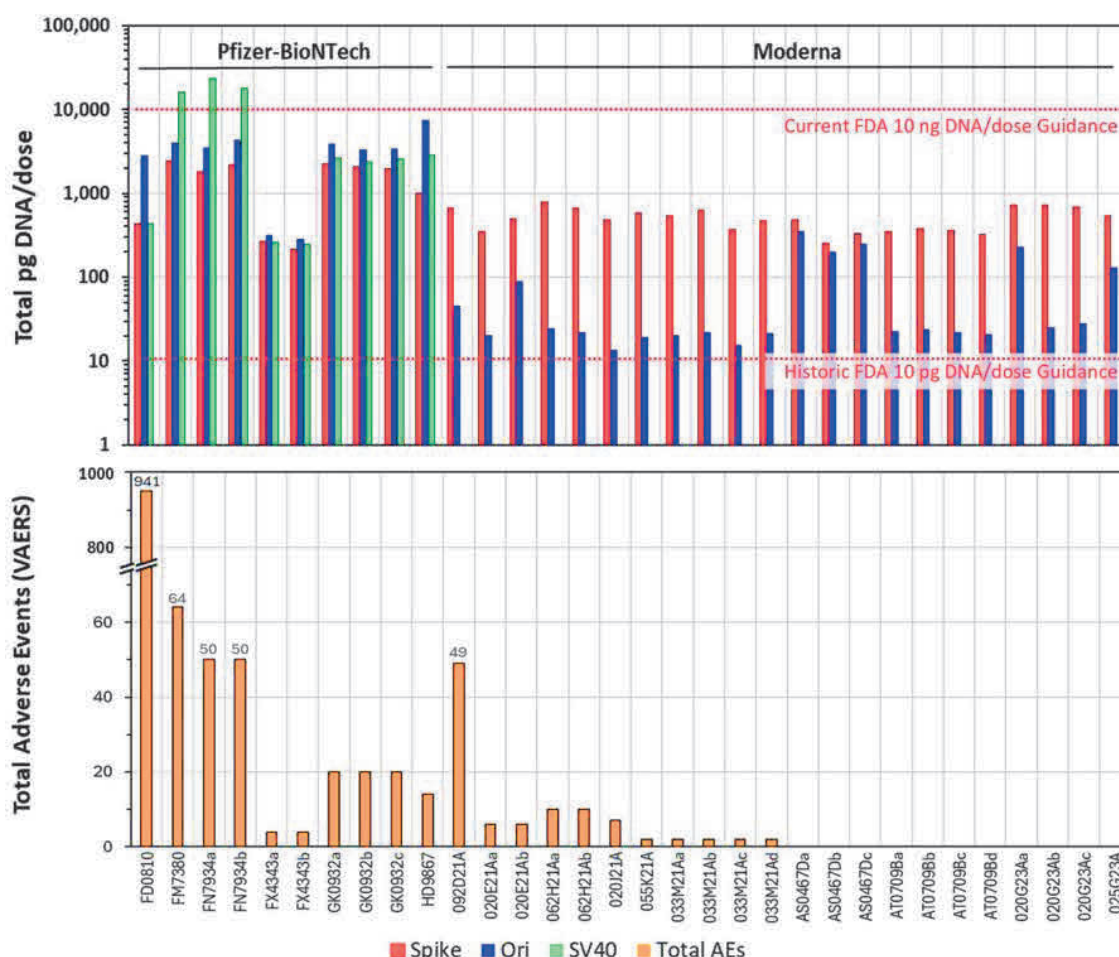


Figura 2. Confronto tra il contenuto di DNA residuo di spike (rosso) *ori* (blu), SV40 promotore-potenziatore-ori (verde) misurato mediante qPCR e il numero totale di eventi avversi (arancione) segnalati al VAERS. La linea guida storica (10 pg/dose) e attuale (10 ng/dose) della FDA e dell'OMS [12,20] per il DNA residuo sono indicate da una linea tratteggiata rossa. Le fiale sono ordinate in base alla data di approvazione del lotto da parte di Health Canada, come registrato nel catalogo nazionale canadese dei vaccini [13]. Le lettere minuscole alla fine dei numeri di lotto indicano fiale diverse dello stesso lotto. Il numero totale di eventi avversi è stato determinato per lotto e riprodotto per ciascuna fiala dello stesso lotto.

dei valori in entrambi gli assi, con pendenze molto più lievi. Sebbene una visione dettagliata dei grafici Moderna suggerisca una pendenza negativa per i valori *ori*, questa linea di tendenza potrebbe essere influenzata da tre valori anomali. Questi valori sono stati ottenuti da fiale dei vaccini bivalenti Moderna BA.1-Wuhan.

Ad eccezione dei lotti Moderna AS0709D, AS0467D e 020G23A, sono state presentate segnalazioni VAERS per tutti i lotti esaminati in questo studio (Ta ella 2 e Figura 2). Dei 16 lotti esaminati, quelli con il maggior numero di segnalazioni presentate al VAERS in tutto il mondo sono stati FD0810, FM7380, FN7934 e 092D21A con rispettivamente 944, 64, 50 e 49 segnalazioni. Nel caso di questi lotti, 157 (17%), 25 (39%), 25 (50%) e 42 (86%) individui hanno segnalato un SAE. Queste percentuali superano di gran lunga il limite massimo della percentuale prevista di SAE in qualsiasi set di dati VAERS, secondo la guida all'uso dei dati VAERS [22]. Da notare inoltre che 1/6 (17%) delle segnalazioni di SAE riguardava decessi relativi al lotto Moderna 020E21A.

Per quanto riguarda le segnalazioni VAERS canadesi, si è osservata la stessa tendenza, con FD0810, FM7380, FN7934 e 092D21A che hanno registrato rispettivamente 134, 27, 48 e 40 segnalazioni. Nel caso di questi lotti, 77 (57%), 16

Il 59% (59), il 48% (23) e il 95% (38) degli individui hanno segnalato un evento avverso grave (SAE). Queste percentuali superano di gran lunga il limite massimo previsto per la percentuale di SAE in qualsiasi set di dati VAERS, secondo la guida all'uso dei dati VAERS[22]. Nel caso del lotto Moderna 092D21A, quasi tutte le segnalazioni erano SAE. La percentuale di SAE per tutti i lotti combinati provenienti dal Canada è molto alta, pari al 58%.

Il lotto FD0180 è l'unico lotto in questo studio che è stato distribuito e somministrato principalmente negli Stati Uniti. Del totale delle segnalazioni relative al lotto FD0810 ($n = 944$), 682 (72%) sono state segnalate in vari stati

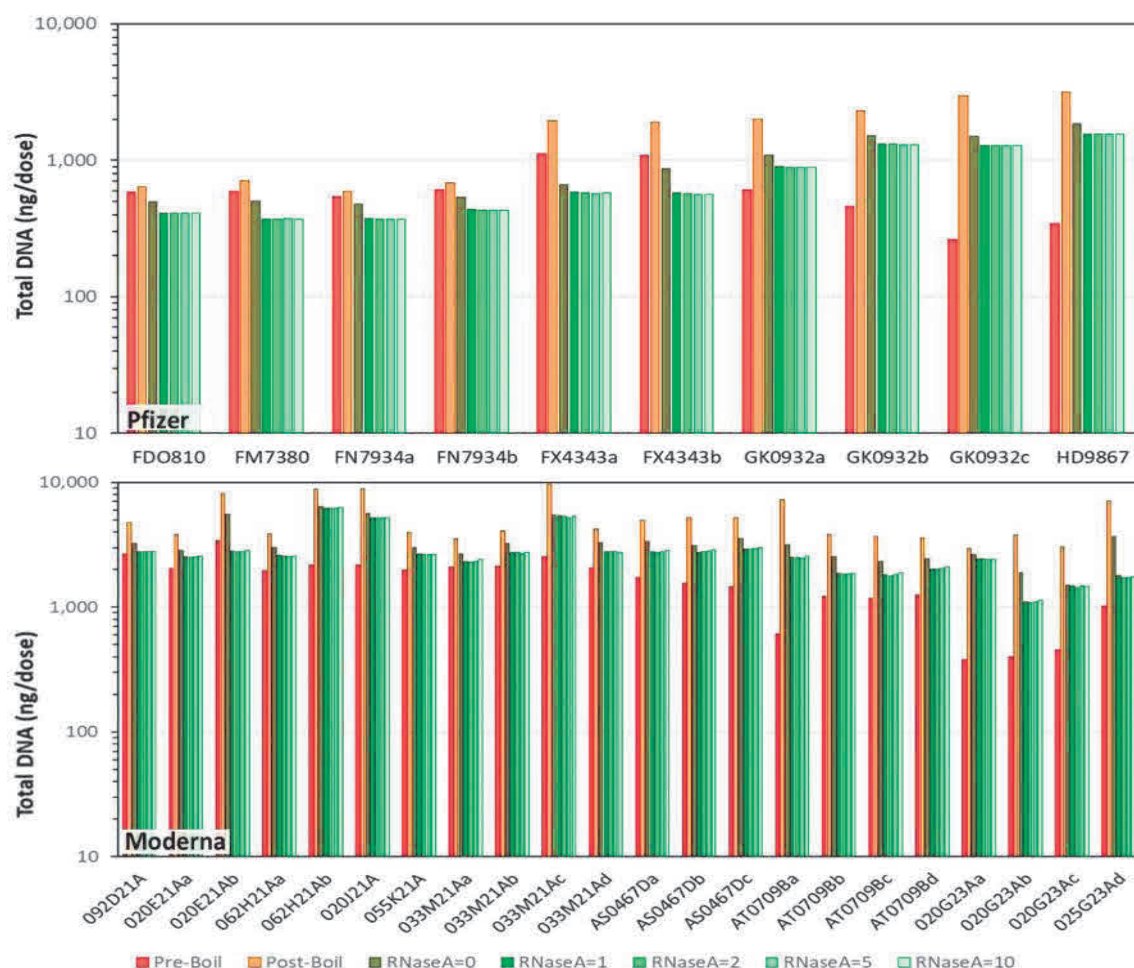


Figura 3. Il DNA totale è stato misurato mediante fluorimetria Qubit direttamente dalla fiala (pre-ebollizione), dopo una fase di ebollizione a 95 °C (post-ebollizione) e in 5 diversi momenti con digestione con RNasi A.

negli Stati Uniti e, più specificamente, 546 (58%) sono state segnalate nel solo Colorado (Tabella supplementare 3). Dei lotti non statunitensi (esteri) segnalati al VAERS per questo lotto, l'83% è stato segnalato in Canada. L'84% di tutte le segnalazioni estere (non statunitensi) è stato segnalato in Canada, indicando che queste fiale sono state distribuite e somministrate principalmente in Canada.

Analisi della lunghezza dei frammenti

Il vaccino monovalente Pfizer per bambini (Lotto FL8095) descritto da McKernan et al. [8] è stato sequenziato con Oxford Nanopore (ONT) per valutare la distribuzione della lunghezza delle letture dopo il mapping delle letture alla sequenza di riferimento del plasmide nell'NCBI (Figura 6). La lettura più lunga rilevata in 865 letture era di

3,5 kb con mappatura della lettura alla maggior parte della struttura del plasmide (Figura 7)

La sensibilità alla nucleasi del vaccino Pfizer è stata valutata utilizzando DNasi I-XT. Questa nucleasi del DNA è ottimizzata per reazioni IVT ricche di ibridi RNA-DNA. Questo trattamento ha mostrato uno scostamento Al Cq, mentre un controllo di DNA nudo aggiunto alle LNP è stato ridotto da un Cq di 15 a un valore non rilevabile nelle stesse condizioni. Ciò indica che il DNA presente nei vaccini è protetto dall'incapsulamento nelle LNP (Figure S e 9)

Discussione

Il DNA residuo è stato rilevato in tutte le 32 fiale di vaccino esaminate. Fiale multiple provenienti dagli stessi lotti hanno prodotto carichi molto simili per tutti i target, dimostrando l'affidabilità, la riproducibilità e la coerenza del test all'interno di

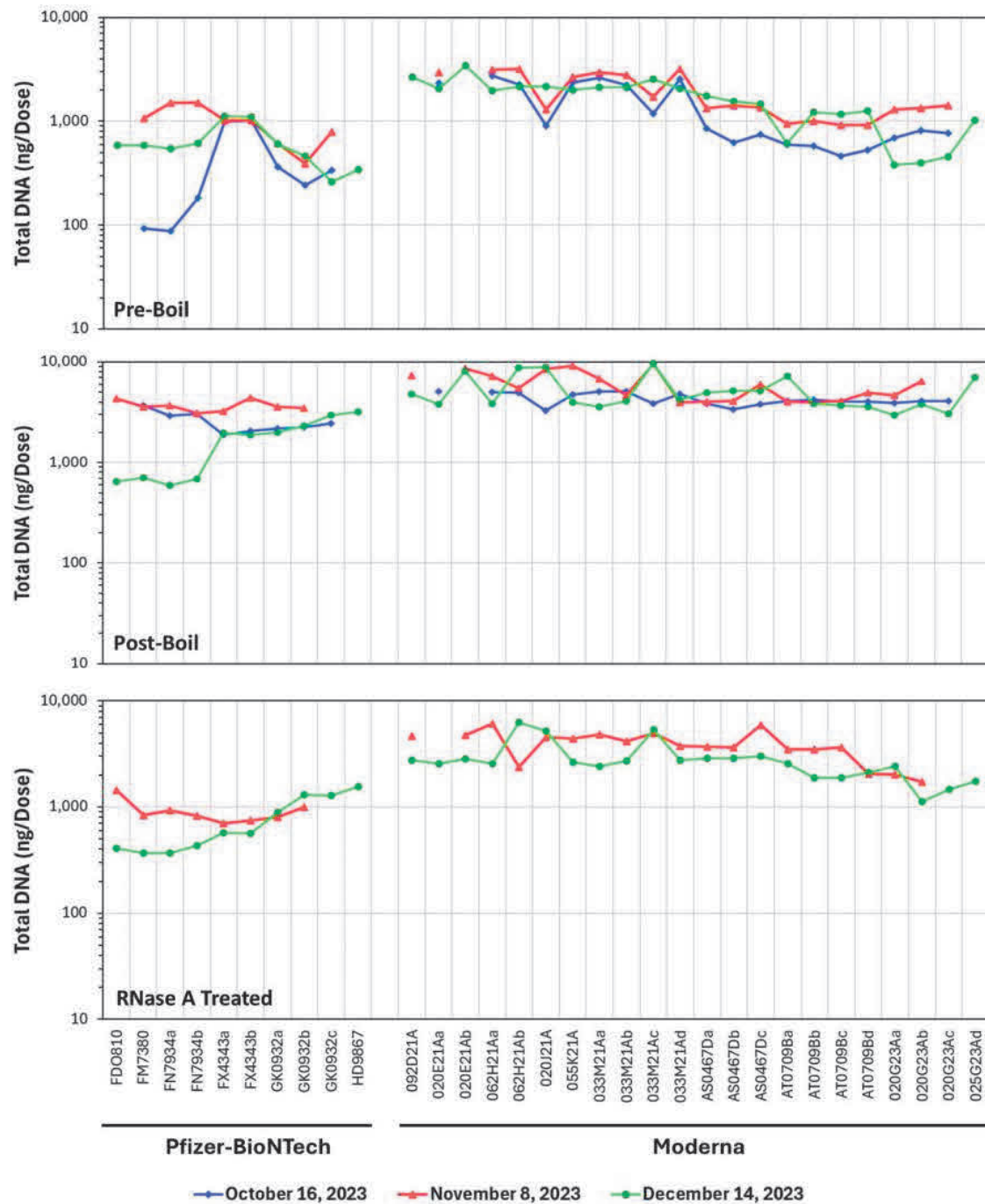


Figura 4. Le misurazioni Qubit sono state ripetute dopo un ciclo di congelamento-scongelo per comprendere la varianza che si può osservare durante il trasporto di fiale congelate da un laboratorio all'altro. Le misurazioni Qubit° sono state effettuate in tre diversi momenti (ottobre, novembre e dicembre 2023) direttamente dalla fiala (pre-ebollizione), dopo una fase di ebollizione a 95 °C (post-ebollizione) e in tre momenti successivi alla digestione con RNasi A.

i lotti. Questi dati relativi alle fiale di vaccino distribuite in Canada sono coerenti con diverse relazioni, sottoposte o meno a revisione paritaria, sulla contaminazione del DNA nei vaccini modRNA (McKernan, Buckhaults, König, Raoult, Kammerer, Wang) [8,23—26].

Moderna presentava la concentrazione di DNA più bassa secondo il qPCR, ma la più alta secondo il Qubit. Le fiale Moderna presentavano i livelli di DNA più uniformi tra le fiale, il che suggerisce un processo di produzione più solido e standardizzato. In ogni fiala del prodotto Moderna, ad eccezione del lotto AS0467D, ora presentava carichi inferiori ($C_t > 6$) rispetto a spike, il che suggerisce una rimozione più efficace del DNA vettoriale.

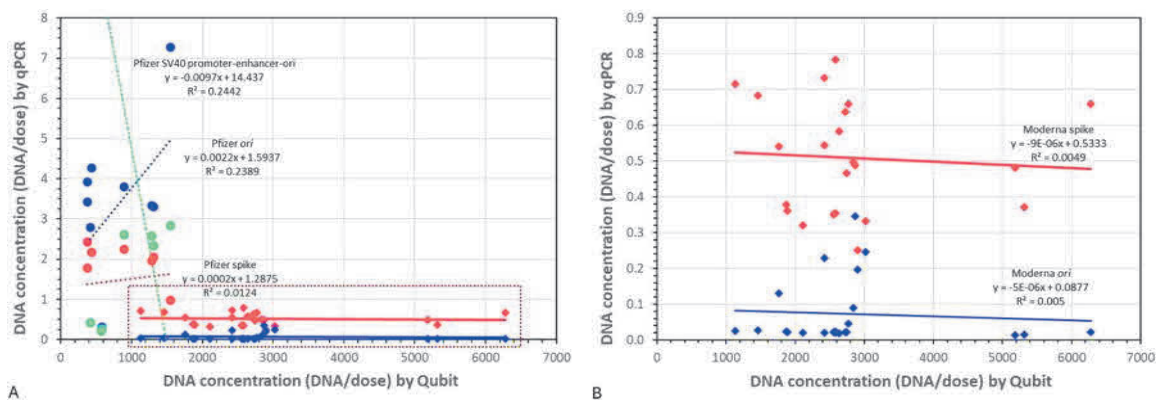


Figura 5. Confronto grafico della concentrazione di DNA residuo per spike (rosso), ori (blu) e promotore-potenziatore-ori SV40 (verde) determinato mediante qPCR e concentrazione totale di DNA residuo in singole fiale determinata mediante qubit. Nel pannello a, i dati di Pfizer e Moderna sono riportati sulla stessa scala. L'asse Y è stato regolato per visualizzare tutti i campioni, ad eccezione dei tre risultati SV40 promotore-potenziatore-ori. I dati Moderna sono racchiusi in un riquadro rosso e visualizzati separatamente con una scala ingrandita nel pannello B, per mostrare i dettagli.

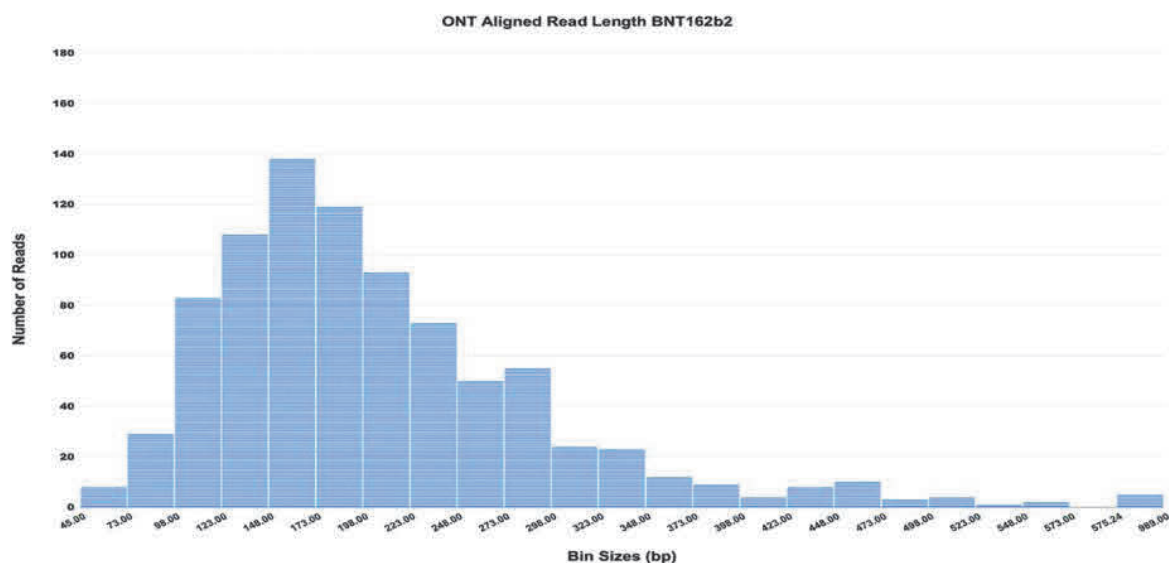


Figura 6. Distribuzione della lunghezza di lettura di Oxford Nanopore (ONT) da 865 letture mappate sulla sequenza vettoriale (NCBI OR134S77.1). Media= 214 bp. Massimo= 3,5 kb.

È possibile che l'RNA modificato omologo impedisca la digestione del DNA modello mediante ibridazione [4]. È importante notare che AS0467D rappresenta il vaccino bivalente BA.1, che è stato osservato essere costituito da due LNP separate contenenti mRNA di diversa purezza che sono state miscelate insieme nel prodotto finale [27]. Poiché la DNasi I è inibita dagli ibridi RNA-DNA, i diversi costrutti modRNA possono presentare una struttura secondaria o un potenziale di ibridazione con il DNA diversi e alterare l'attività della DNasi I rispetto ad altri vaccini Moderna. Questa estrema differenza nei target genetici spike e ori indica una variazione di produzione che non dovrebbe esistere e sottolinea l'importanza che le autorità di regolamentazione non si affidino a un unico test PCR per determinare il carico di DNA plasmidico residuo nel prodotto farmaceutico finale.

Le fiale con la più alta concentrazione di DNA provenivano da due lotti di fiale Pfizer monovalenti con tappo viola e formulazione PBS e richiedono diluizione prima della somministrazione. Il 29 ottobre 2021, la FDA statunitense ha autorizzato una modifica della formulazione con un tampone Tris/saccarosio; il vaccino monovalente per adulti con tappo grigio e un vaccino con tappo arancione per bambini di età compresa tra 6 e 11 anni. Questa modifica è stata apportata per aumentare la stabilità, semplificare i requisiti di conservazione e fornire una formulazione pronta all'uso [28,29]. Questi lotti Pfizer con tappo viola sono stati anche associati ad alcuni dei più alti numeri di AE e SAE segnalati nel VAERS tra tutti i lotti testati. Il motivo di questa differenza non è noto, ma

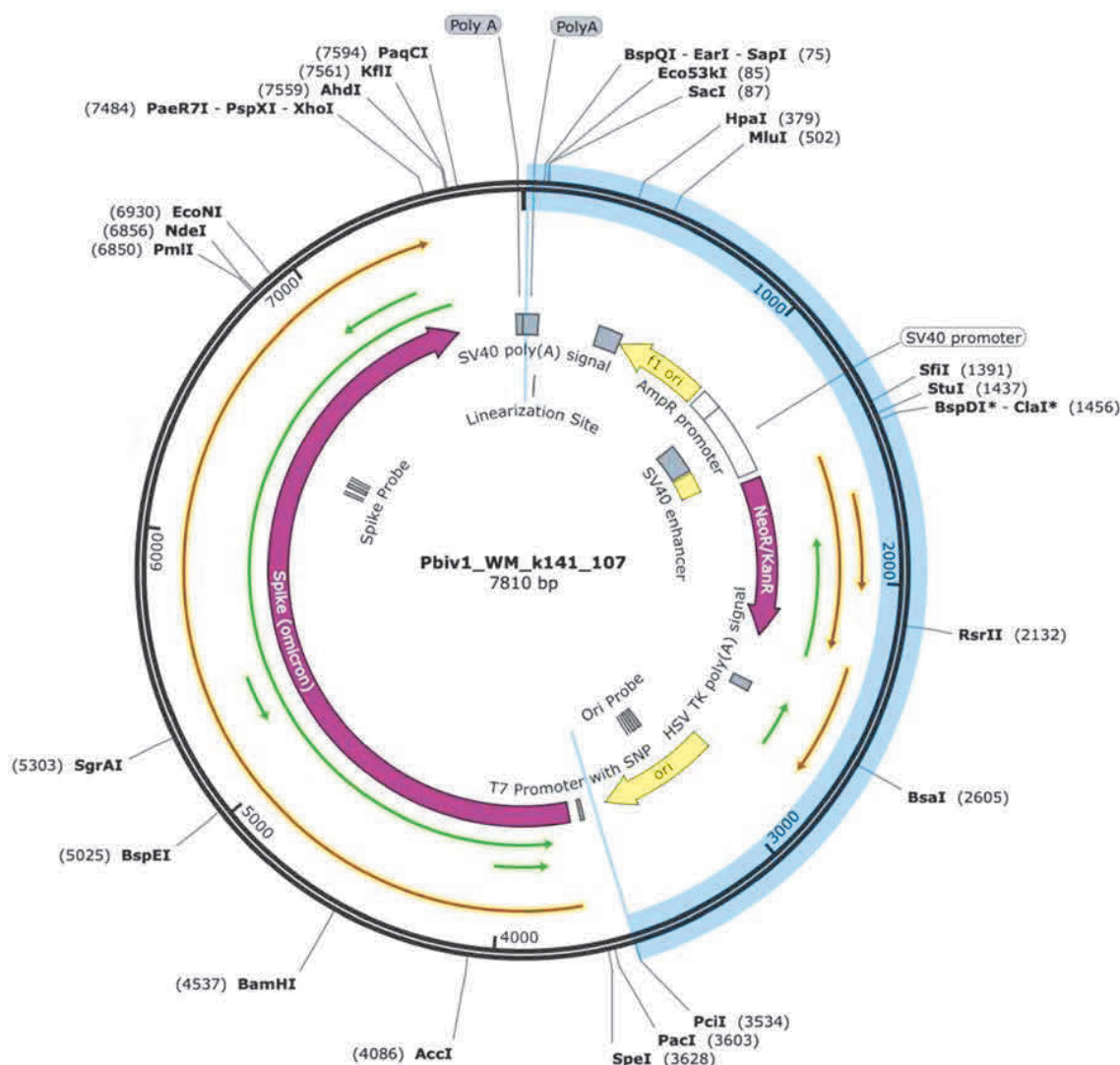


Figura 7. La lettura più lunga di Oxford Nanopore (ONT) si allinea alla regione vettoriale mostrata in blu. Le posizioni dei primer *ori* e spike sono annotate sul cerchio più interno. I frame di lettura aperti (ORF) sono annotati con frecce dorate e verdi. I geni di resistenza alla kanamicina sono stati rilevati in un'indagine di sequenziamento molto superficiale del vaccino.

L'uso del tampone PBS ha provocato la comparsa di particelle visibili nel prodotto farmaceutico finale, che potrebbero essere associate a tossicità, tra cui microembolia e reazioni infiammatorie [30]. Inoltre, sono state osservate impurità lipidiche dovute all'idrolisi dei lipidi e alla formazione di aldeidi, che hanno portato alla formazione di addotti lipidici che potrebbero avere implicazioni tossicologiche. L'uso di un tampone Tris agisce come un "pozzo di aldeide" riducendo le impurità LNP rilevate dagli scienziati di Moderna [31]. Gli addotti causano la perdita della funzione modRNA e possono influenzare la struttura di ordine superiore dell'mRNA; inoltre, possono essere responsabili cambiamenti nella cinetica dell'mRNA o altri fattori sconosciuti [32].

La variabilità inter e intra-lotto nel DNA residuo continua a essere dimostrata anche dopo 3 anni di esperienza nella produzione. Questa variabilità continua, specialmente nelle fiale Pfizer, è forse più fondamentale del raggiungimento di un basso livello di impurità, poiché dimostra un processo di produzione incoerente e probabilmente si verifica con altre impurità legate al processo e al prodotto. La purezza e la robustezza della DNasi possono variare tra i fornitori o i lotti dell'enzima DNasi [33]. Anche piccole differenze nel processo IVT o altri fattori possono influire sulla variabilità del DNA residuo. La fase di digestione con DNasi del vaccino Pfizer/BioNTech è stata oggetto di una raccomandazione da parte dell'EMA per migliorare la robustezza del metodo al momento dell'approvazione [34]. Tuttavia, una FOIA ottenuta in Germania ha evidenziato problemi persistenti relativi alla consistenza dei livelli di DNA residuo all'interno e tra i siti di produzione Pfizer/BioNTech, all'uso di "standard" interni e alla mancanza di

Significant fractions of the LNPs are DNaseI protected

This implies 10-30% of the nucleic acid isn't packaged in an LNP

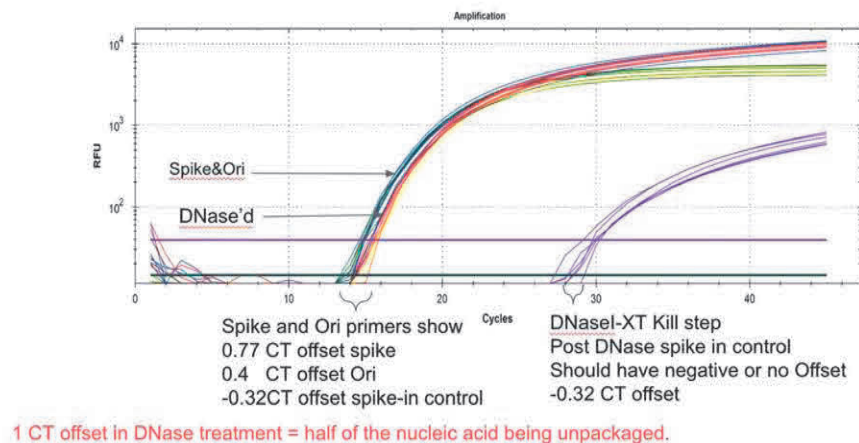


Figura 8. Il trattamento con DNasi I-XT del vaccino Pfizer dimostra la resistenza alla nucleasi del DNA contenuto nei vaccini.

Grim Reefer method eliminates all DNA at 37°C in 30 minutes.
2ul in qPCR of a 1:10 dilution of GR control = 15CT
LNPs protect against this activity.

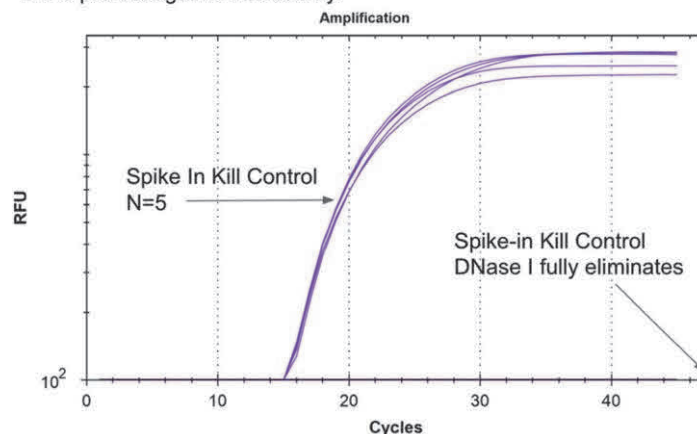


Figura 9. Il controllo positivo con DNasi I-XT dimostra che il test di digestione elimina tutto il DNA aggiunto nelle stesse condizioni utilizzate per valutare la sensibilità alla nucleasi del vaccino.

correlazione tra l'attività dell'enzima DNasi e il DNA residuo ben 15 mesi dopo l'autorizzazione [35]. Ciò dimostra che gli sforzi continui per rimuovere i frammenti di DNA hanno avuto un successo limitato.

La nostra analisi esplorativa della relazione tra il contenuto di DNA residuo e gli eventi avversi gravi segnalati al VAERS è preliminare e limitata in termini di dimensioni del campione, ma merita una conferma attraverso l'esame di molti più lotti e fiale. Questa analisi preliminare sembra mostrare una correlazione tra gli eventi avversi segnalati per ciascun lotto e i livelli di DNA, in particolare nel contesto *dell'ori*. Sono necessari ulteriori test sulle fiale da parte di altri laboratori indipendenti, compreso un monitoraggio prospettico a lungo termine, per confermare i nostri risultati e verificare l'esistenza di una correlazione. Quando testato con qPCR, il lotto FD0810 di Pfizer, il lotto più vecchio esaminato, ha mostrato livelli inferiori di spike e SV40 promoter-enhancer-ori con livelli di DNA ori paragonabili ad altre fiale monovalenti per adulti (con tappo viola), ma è stato associato al numero più alto di eventi avversi totali segnalati al VAERS. Abbiamo testato solo una singola fiala, che potrebbe non essere rappresentativa dell'intero lotto. Senza conoscere le dimensioni dei lotti o il numero di persone che hanno ricevuto dosi da ciascun lotto, è difficile correlare gli eventi avversi gravi (SAE) a lotti specifici con i dati relativi a soli 16 lotti. Se un lotto associato a un numero elevato di SAE fosse stato somministrato a un numero significativamente maggiore di persone, ciò potrebbe distorcere il rapporto SAE per persona, complicando ulteriormente gli sforzi per stabilire una chiara correlazione. Tuttavia, i nostri risultati suggeriscono che oltre

I livelli di DNA plasmidico, i problemi relativi alle LNP, la tossicità, l'autoimmunità e/o le risposte immunitarie aberranti dovute al frameshifting ribosomiale possono contribuire agli eventi avversi, compresa la pseudoallergia correlata all'attivazione del complemento (CARPA), e possono contribuire agli eventi avversi subito dopo la vaccinazione [36-41]. La composizione casuale dei frammenti di DNA in queste fiale complica la correlazione diretta tra i livelli di DNA plasmidico e le reazioni avverse specifiche, poiché gli effetti genotossici di ciascun frammento variano in modo imprevedibile a seconda della loro sequenza e dell'interazione con il genoma ospite. Questa variabilità rende impossibile stimare con precisione gli effetti avversi basandosi esclusivamente sulla quantità di DNA. Carichi di DNA più elevati potrebbero anche contribuire a rischi per la salute a lungo termine, come il cancro derivante da eventi di integrazione genomica. Il VAERS rileva principalmente gli eventi avversi a breve termine e potrebbe sottostimare gli effetti a lungo termine. Sono necessari ulteriori test sulle fiale per stabilire una curva dose-risposta utilizzando i dati del VAERS. Il monitoraggio prospettico a lungo termine è essenziale per valutare l'impatto dei vaccini genetici, soprattutto perché la proteina spike è stata rilevata fino a 704 giorni dopo la vaccinazione [42].

Sono state osservate relazioni diverse per i lotti Moderna per i dati qPCR e per i grafici basati sul DNA residuo stimato mediante fluorimetria sia per i lotti Pfizer che per quelli Moderna. Queste osservazioni potrebbero riflettere differenze tra i due prodotti, quali il volume della dose, la quantità di DNA, la distribuzione dimensionale dei frammenti di DNA, la composizione e la sequenza del vettore plasmidico e la composizione delle nanoparticelle lipidiche. Altre differenze, sia tra i due prodotti che tra i diversi lotti di ciascun prodotto, possono anche contribuire alle nostre osservazioni. Queste differenze includono variazioni nei livelli di contaminanti o impurità. Una delle principali fonti di impurità è l'mRNA frammentato, per il quale sono stati proposti diversi meccanismi tossicologici, come i suoi effetti sui processi miRNA [43]. Il dsRNA è un altro tipo di impurità che si verifica secondariamente al promotore della RNA polimerasi T7. Il dsRNA può indurre citochine pro-infiammatorie [44] ed è stato ipotizzato che contribuisca a reazioni immuno-infiammatorie come la miocardite [45]. I lipopolisaccaridi nelle cellule provenienti dall'endotossina possono legarsi sia alla subunità S1 che alla subunità S2 della proteina spike, il che può determinare un aumento delle risposte infiammatorie [46].

Un campionamento più ampio rivelerà probabilmente maggiori dettagli in termini di tipi di eventi, come la morte, nonché confronti con altri lavori, come quello riportato da Schmeling et al., che hanno segnalato una correlazione tra gli eventi avversi e vari numeri di lotto dei vaccini [47]. Nessuno dei lotti di vaccini attualmente studiati è stato incluso nello studio di Schmeling ed è necessario ulteriore lavoro per capire se e in che modo questa contaminazione del DNA sia correlata agli eventi avversi.

Sebbene l'enhancer SV40 faciliti il targeting nucleare [16,48], l'integrazione genomica dei frammenti di DNA deve ancora essere dimostrata per i prodotti modRNA COVID-19 [49]. Tuttavia, è noto che la contaminazione da DNA potrebbe innescare una risposta immunitaria innata ingiustificata e potrebbe essere protrombotica, in particolare per i frammenti con un alto contenuto di GC [50]. Il dsDNA può anche essere un fattore significativo nelle malattie ischemiche, compreso l'ictus [51]. È noto inoltre che il DNA citosolico innesca il cGAS-STING e si ritiene che la stimolazione cronica di questa via sia pro-oncogena [52]. Il brevetto statunitense n. 10.898.574 di Moderna sottolinea anche il rischio di mutagenesi inserzionale del DNA residuo nei loro vaccini. Sebbene sembri esserci una correlazione tra un'elevata contaminazione da DNA e gli eventi avversi gravi, sono necessarie ulteriori ricerche per ampliare la dimensione del campione e chiarire qualsiasi potenziale meccanismo in atto.

È importante sottolineare che, poiché la qPCR non è in grado di quantificare molecole di dimensioni inferiori a quelle dell'amplicone (105-114 bp), la qPCR sottostima il DNA totale presente in ciascun vaccino. L'incapacità della qPCR di quantificare completamente il DNA residuo nei vaccini a mRNA è descritta nel brevetto Moderna n. US 10.077.439. È importante sottolineare che l'uso di un singolo amplicone per la qPCR può portare a stime diverse di 100 volte in alcuni vaccini. Il DNA Spike in alcuni vaccini Moderna è 100 volte più prevalente (-6CT) rispetto al DNA non Spike, il che suggerisce un'inibizione della DNasi I con RNA complementare [4].

Questo spiega le grandi differenze che abbiamo osservato nei livelli di DNA residuo stimati mediante qPCR rispetto alla fluorimetria Qubit", in particolare tra i prodotti Pfizer e Moderna. I valori molto più elevati ottenuti per il prodotto Moderna potrebbero essere in parte dovuti al volume di dose maggiore, ma suggeriscono anche che vi è una percentuale più elevata di DNA residuo frammentato di piccole dimensioni rispetto al prodotto Pfizer. Ciò è coerente con una fase di digestione nucleasica più approfondita. Ciò dimostra che le linee guida sul DNA residuo raccomandate dalla FDA dipendono in larga misura dai metodi utilizzati per quantificare il DNA. Inoltre, è necessario stabilire la robustezza e l'affidabilità del test PCR, date le azioni dell'N-I-metilpseudouridina e la presenza di ibridi RNA-DNA.

Anche König et al. hanno riscontrato un elevato livello di contaminazione da DNA utilizzando la fluorimetria Qubit [24]. Tuttavia, questo studio non prevedeva un trattamento con RNasi A e probabilmente sovrastima la quantità di DNA presente a causa dell'interferenza dei coloranti specifici per il DNA che si intercalano con l'RNA. Sebbene la specificità di questi coloranti fluorometrici specifici per il DNA sia ben documentata, poco si sa dell'impatto sulla loro specificità quando vengono utilizzati con campioni che presentano elevate concentrazioni di NI-metil-pseudouridina modRNA o RNA ricco di GC incline alla formazione di strutture secondarie e solchi minori. I nostri dati Qubit hanno mostrato che si verificano variazioni tra i cicli di campionamento e di congelamento-scongelo. Questa variazione potrebbe essere dovuta alla natura approssimativa dei test fluorometrici, ai cicli di congelamento-scongelo o a errori di campionamento, in particolare perché la vortexatura dei campioni e il pipettaggio multiplo possono introdurre bolle d'aria che alterano le dimensioni e la sedimentazione delle LNP [53]. Tuttavia, i nostri dati RNase A dimostrano che la fluorimetria Qubit deve essere abbinata alla rimozione del modRNA del vaccino per quantificare correttamente il DNA residuo in presenza di elevate concentrazioni di RNA.

Questa valutazione fluorometrica è di particolare interesse poiché la fluorimetria e la spettrofotometria UV sono state utilizzate per quantificare l'RNA nei vaccini Pfizer COVID-19, come descritto nei documenti dell'EMA [7], mentre la qPCR è stata utilizzata per quantificare il DNA. Questo uso selettivo di metodi diversi per quantificare i rapporti RNA/DNA può portare a risultati molto diversi per le linee guida metriche in vigore presso l'EMA. Questa quantificazione fluorometrica elevata rispetto alla quantificazione qPCR è coerente con le distribuzioni della lunghezza di lettura ONT che suggeriscono anche che una parte del DNA potrebbe essere più piccola della dimensione dell'amplicone. Mentre il sequenziatore ONT rileva molecole più corte di 100 bp, i metodi per la costruzione della libreria per ONT utilizzano una fase di purificazione del DNA Ampure 0,7X che seleziona drasticamente contro la purificazione di molecole di dimensioni inferiori a 150 bp. Di conseguenza, le distribuzioni della lunghezza di lettura per le letture ONT sono sbilanciate verso frammenti >150 bp e non riflettono perfettamente i frammenti più piccoli che potrebbero essere presenti e sottostimati sia dall'ONT che dal qPCR.

Analogamente, Georgiou et al. dimostrano che i coloranti fluorometrici producono un segnale inferiore del 70% dopo il trattamento con DNasi I, poiché forniscono un segnale non lineare per molecole più lunghe della stessa massa di DNA [54]. Questi dati non sono stati compensati per questo effetto e riflettono probabilmente una sottostima della quantità effettiva nel test fluorometrico. Queste molecole di DNA più piccole vengono spesso perse anche durante le procedure di isolamento del DNA comunemente utilizzate, come la purificazione con fenolo/cloroformio o la precipitazione con etanolo. Kaiser et al. hanno misurato quantità molto inferiori di DNA nei loro vaccini, ma i loro metodi non hanno accertato la perdita di frammenti di DNA corti dopo precipitazioni multiple con etanolo [55]. Poiché i frammenti di DNA < 100bp possono andare persi durante i metodi di purificazione, compresa la precipitazione con etanolo, è preferibile quantificare il DNA totale direttamente sul prodotto farmaceutico finale senza alcuna fase di purificazione.

Attualmente, la FDA statunitense raccomanda ai produttori di vaccini virali di limitare la quantità di DNA residuo nel prodotto finale a meno di 10 ng/dose per le inoculazioni parenterali e la dimensione del DNA a meno della dimensione di un gene funzionale, ovvero -200 paia di basi [12]. Ciò è anche in linea con le raccomandazioni dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) [20,56] e riguarda il DNA "nudo", ovvero il DNA che non è associato a proteine, lipidi o altre molecole per la protezione o il confezionamento. I precedenti livelli di DNA residuo erano stati fissati dalla FDA a 10 pg/dose nel 1985. Uno studio del 1986 condotto da un gruppo di lavoro dell'OMS ha concluso che il rischio è trascurabile fino a 100 pg/dose e nel 1996 l'OMS ha ulteriormente aumentato i livelli fino a 10 rig per dose [20]. Tuttavia, poiché il DNA residuo è incapsulato nelle LNP e viene trasfettato in modo efficiente direttamente nelle cellule, è necessario rivalutare le linee guida sul DNA per i vaccini a mRNA modificato.

Le linee guida della FDA e dell'OMS relative al DNA ammissibile nei vaccini sono influenzate dal lavoro pubblicato dagli scienziati della FDA Sheng-Fowler et al. [57]. Questo lavoro si è concentrato sulla contaminazione del DNA genomico delle cellule ospiti e ha rilevato un aumento del numero di molecole presenti quando i vettori virali di piccole dimensioni sono le specie contaminanti. Per questi contaminanti ad alto numero di copie per nanogrammo, i femtogrammi e gli attogrammi di DNA sono considerati equivalenti ai nanogrammi di DNA genomico del substrato cellulare. Data la breve dimensione dei frammenti nei vaccini modRNA, il numero di molecole in ciascuna dose può superare i 100 miliardi. Il DNA residuo in questi vaccini è elevato in termini di numero di copie e ricco di promotori, origini di replicazione SV40 dei mammiferi, ORF e sequenze di targeting nucleare. Le linee guida della FDA e dell'OMS non hanno preso in considerazione il confezionamento del DNA in nanoparticelle lipidiche, con conseguente probabile persistenza più lunga del DNA e maggiore efficienza di trasfezione. Inoltre, le linee guida non hanno preso in considerazione

dosaggio cumulativo con modRNA basato su LNP. I dati hanno dimostrato che gli LNP sono in grado di aumentare l'ingresso di RNA o DNA nelle cellule di 10-100 volte [58-60].

In Giappone, il 13% della popolazione ha ricevuto sette dosi di vaccini contro il COVID-19 con un intervallo tra le dosi di richiamo talvolta breve fino a 2 mesi [61]. Inoltre, i rischi del dosaggio cumulativo da parte di vaccini mirati ad altre infezioni ma che utilizzano lo stesso plasmide e la stessa piattaforma modRNA basata su LNP non sono stati considerati nella definizione delle linee guida sul DNA residuo.

Le linee guida della FDA sono state redatte anche per quantificare solo frammenti di DNA di 200 bp o superiori, in parte perché i frammenti più piccoli non erano considerati in grado di produrre un gene funzionale. Tuttavia, Klinman et al. suggeriscono che frammenti di appena 7 bp possono comportare rischi di integrazione [62]. Inoltre, le linee guida potrebbero anche aver considerato che i frammenti di DNA nudo più corti di 200 bp sarebbero stati idrolizzati più rapidamente dall'attività nucleasica dell'ospite rispetto alle molecole più grandi [63]. Questa distruzione accelerata non può essere ipotizzata per i vaccini, poiché il DNA è incapsulato e protetto dalle LNP.

Klinman et al. osservano inoltre che *"nel valutare la potenziale integrazione dei frammenti di DNA, occorre tenere presente che il rischio di introdurre plasmidi con regioni regolatorie forti nel genoma ospite supera di gran lunga quello associato alle mutazioni puntiformi casuali"*.

Infine, le linee guida non considerano se il DNA residuo contenga sequenze di targeting nucleare, origini di replicazione dei mammiferi e promotori dei mammiferi presenti nel vaccino Pfizer [49]. Vacik et al. hanno dimostrato che l'enhancer SV40 presente nel vettore Pfizer è una potente sequenza di targeting nucleare che mostra promesse per la terapia genica [48]. Senigl et al. dimostrano che l'enhancer SV40 è un elemento di ipermutabilità somatica con potenziale tumorigenico [64]. Infine, Drayman et al. dimostrano che l'enhancer SV40 nel vaccino Pfizer si lega al P53, ricordandoci che i semplici limiti di nanogrammi di DNA residuo devono essere riconsiderati in base alla funzionalità e alla capacità replicativa di quel DNA [63].

Conclusione

Questi dati dimostrano la presenza di miliardi o centinaia di miliardi di molecole di DNA per dose nei prodotti modRNA COVID-19 testati. Utilizzando la fluorimetria abbinata alla digestione con RNasi A, tutti i prodotti testati hanno superato di 36-627 volte le linee guida per il DNA residuo stabilite dalla FDA e dall'OMS di 10 ng/dose. I test qPCR hanno dimostrato che tutte le fiale Moderna rientravano nel limite normativo e che 3 fiale Pfizer superavano il limite normativo per il promotore-potenziatore-ori SV40 e mostravano una variabilità intra e inter-lotto molto maggiore. La qPCR sottostima il DNA totale con risultati che variano notevolmente a seconda del target genomico, sottolineando l'importanza di utilizzare più di un test per determinare con precisione il carico di DNA. È importante che le autorità di regolamentazione producano linee guida chiare e coerenti su come quantificare l'mRNA e il DNA plasmidico nei vaccini modRNA. I risultati della PCR per i più recenti vaccini XBB.1.5 Moderna e Pfizer suggeriscono che i residui di DNA non sono stati ridotti rispetto alle versioni precedenti dei vaccini.

I nostri risultati ampliano le preoccupazioni esistenti sulla sicurezza dei vaccini e mettono in discussione la pertinenza delle linee guida concepite prima dell'introduzione della trasfezione efficiente mediante LNP. Con alcune ovvie limitazioni, sollecitiamo che il nostro lavoro sia replicato in condizioni forensi e che le linee guida siano riviste per tenere conto della trasfezione di DNA altamente efficiente e del dosaggio cumulativo.

Questo lavoro evidenzia la necessità che le autorità di regolamentazione e l'industria aderiscano al principio di precauzione e forniscano prove sufficienti e trasparenti della sicurezza e dell'efficacia dei prodotti, divulgando i dettagli della loro composizione e del loro metodo di fabbricazione.

Contributi degli autori

CRedit: **David J. Speicher:** Concettualizzazione, Curatela dei dati, Analisi formale, Indagine, Metodologia, Amministrazione del progetto, Scrittura — bozza originale, Scrittura — revisione e modifica; **Jessica Rose:** Analisi formale, Metodologia, Software, Scrittura — revisione e modifica; **Kevin McKernan:** Concettualizzazione, Analisi formale, Indagine, Metodologia, Risorse, Scrittura — bozza originale, Scrittura — revisione e modifica.

Dichiarazione di divulgazione

Kevin McKernan è dipendente della Medicinal Genomics e ha fornito gratuitamente i reagenti qPCR e Qubit". Gli autori non hanno segnalato alcun potenziale conflitto di interessi.

Finanziamenti

Questo progetto è stato autofinanziato con reagenti forniti da Kevin McKernan.

ORCID

David J. Speicher <http://orcid.org/0000-0002-1745-3263>
 Jessica Rose <http://orcid.org/0000-0002-9091-4425> Kevin
 McKernan <http://orcid.org/0000-0002-3908-1122>

Dichiarazione di disponibilità dei dati

File FASTQ per i dati di sequenziamento ONT mappati: <https://mega.nz/file/UZhkiTBQ#8vjDKñJV5N5Dj2On34B6zdRObEKGBY3ZC7wflq2t9UVc>

Riferimenti

- [1] de Fougères A, Elbashir SM. Consegna e formulazione di acidi nucleici ingegnerizzati. Ufficio brevetti e marchi degli Stati Uniti, Modernatx, Inc; 2021. <https://patents.google.com/patent/US1089S574B2/en>, <https://patentimages.storage.googleapis.com/29/f1/5c/fda42b8d8dd5ca/US1089S574.pdf>
- [2] Guetzkow JA, Levi R. L'effetto dei processi di produzione dei vaccini a mRNA sull'efficacia e la sicurezza è ancora una questione aperta. *BMJ*. 2023;378:o1731.
- [3] Rabe I, Buff M, Ziegenhals N. Tecnologie di trascrizione in vitro. Ufficio brevetti e marchi degli Stati Uniti; 2023. <https://patentimages.storage.googleapis.com/03/aa/75/b6d7d299ñc9653/US20230183769A1.pdf>
- [4] Sutton DH, Conn GL, Brown T, et al. La dipendenza dell'attività della DNasi I dalla conformazione degli oligodeossinucleotidi. *Biochem J*. 1997;321 (Pt 2):4fi1—4fi6. doi: [10.1042/bj32104b1](https://doi.org/10.1042/bj32104b1)
- [5] Thorn CR, Sharma D, Combs R, et al. Il viaggio di una vita: lo sviluppo del vaccino COVID-19 di Pfizer. *Curr Opin Biotechnol*. 2022;78:102803. doi: [10.1016/j.copbio.2022.102803](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102803)
- [6] Tinari S. La fuga di dati sull'EMA covid-19 e cosa ci dice sull'instabilità dell'mRNA. *BMJ*. 2021;372:n627. doi: [10.1136/bmj.n627](https://doi.org/10.1136/bmj.n627)
- [7] EMEA/H/C/005735/RR. Relazione di valutazione critica del relatore: aspetti qualitativi. Agenzia europea per i medicinali; 2020. <https://covidvaccinereactions.com/ema-pfizer-leak/>
- [8] McKernan K, Helbert Y, Kane LT, et al. Il sequenziamento dei vaccini bivalenti a mRNA di Moderna e Pfizer rivela quantità da nanogrammi a microgrammi di vettore di espressione dsDNA per dose. *OSFio*. 2023. doi: [10.31219/osf.io/b9t7m](https://doi.org/10.31219/osf.io/b9t7m). https://osf.io/preprints/osf/b9t7m_v1
- [9] Shimabukuro TT, Nguyen M, Martin D, et al. Monitoraggio della sicurezza nel sistema di segnalazione degli eventi avversi da vaccino (VAERS). *Vaccine*. 2015;33(36):4398—4405. doi: [10.1016/j.vaccine.2015.07.035](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.07.035)
- [10] Speicher DJ, Rose J, Gutschi LM, et al. Frammenti di DNA rilevati nei vaccini monovalenti e bivalenti Pfizer/BioNTech e Moderna modRNA COVID-19 dell'Ontario, Canada: relazione esplorativa dose-risposta con eventi avversi gravi. *OSF Preprints*; 2023. doi: [10.31219/osf.io/mjc97](https://doi.org/10.31219/osf.io/mjc97). https://osf.io/preprints/osf/mjc97_v1
- [11] Consiglio internazionale per l'armonizzazione (ICH). Q6B: specifiche: procedure di prova e criteri di accettazione per prodotti biotecnologici/biologici; 1999. Estratto da <https://database.ich.org/sites/default/files/Q6B%20Guideline.pdf>
- [12] Food and Drug Administration. Informazioni relative alla chimica, alla produzione e al controllo (CMC) per le domande di autorizzazione all'uso sperimentale di nuovi farmaci (IND) per la terapia genica umana. Dipartimento della Salute e dei Servizi Umani degli Stati Uniti; 2020. Estratto da <https://www.fda.gov/media/113760/download>.
- [13] Agenzia della sanità pubblica del Canada. Catalogo nazionale dei vaccini: lotto di vaccini. 2024. Tratto da <https://nvc-cnvc.canada.ca/en/vaccine-lots>
- [14] Team VAERS. Procedura operativa standard del Sistema di segnalazione degli eventi avversi da vaccino (VAERS) per COVID-19 (al 29 gennaio 2021). Estratto da <https://www.cdc.gov/vaccinesafety/pdf/VAERS-v2-SOP.pdf>
- [15] Port Hedland. Australia - ordine del giorno della riunione straordinaria del consiglio comunale - 11 ottobre 2024 allegati. Consiglio comunale di Port Hedland; 2024. Tratto da <https://www.porthedland.wa.gov.au/council-meetings/>

- riunioni-speciali-del-consiglio/riunione-speciale-del-consiglio-11-ottobre-2024/247/documenti/allegati_scm_11102024.pdf
- [16] Dean DA, Dean BS, Muller S, et al. Requisiti di sequenza per l'importazione nucleare dei plasmidi. *Exp Cell Res.* 1999;253(2):713—722. doi: 10.1006/excr.1999.4716
- [17] New England Biolabs. NEBioCalculator; 2023.
- [18] R Development Core Team. R: Il progetto R per l'elaborazione statistica. R Foundation for Statistical Computing; 2010. Estratto da <http://www.R-project.org>
- [19] Li H, Durbin R. Allineamento veloce e accurato di letture brevi con la trasformata di Burrows-Wheeler. *Bioinformatica.* 2009;25(14):1754—1760. doi: 10.1093/bioinformatics/btp324
- [20] Shin J, Wood D, Robertson J, et al. Consultazione informale dell'OMS sull'applicazione dei metodi molecolari per garantire la qualità, la sicurezza e l'efficacia dei vaccini, Ginevra, Svizzera, 7-8 aprile 2005. *Biologicals.* 2007;35(1):63—71. doi: 10.1016/j.biologicals.2005.12.005
- [21] Ban E, Kim A. Test PicoGreen per la quantificazione dell'acido nucleico - Applicazioni, sfide e soluzioni. *Anal Biochem.* 2024;692:115577. doi: 10.1016/j.ab.2024.115577
- [22] Team VAERS. Guida per gli utenti dei dati VAERS; 2020. Estratto da <https://vaers.hhs.gov/docs/VAERSDataUseGuideNovember2020.pdf>
- [23] Senato della Carolina del Sud. Audizione del Senato della Carolina del Sud - Prof. Phillip Buckhaults, USC; 2023.
- [24] König B., Kirchner, J.O. Considerazioni metodologiche relative alla quantificazione delle impurità del DNA nel vaccino a mRNA Comirnaty contro il COVID-19". *Methods Protoc.* 2024, 7(41):1-S. doi: 10.3390/mps7030041
- [25] Kämmerer U, Schulz V, Steger K. Le iniezioni COVID-19 a base di RNA di BioNTech contengono grandi quantità di DNA residuo, compresa una sequenza promotrice/potenziatrice SV40. *Science, Public Health Policy and the Law,* 5:1-22. Tratto da <https://publichealthpolicyjournal.com/biontech-rna-based-covid-19-inject-ions-contain-large-amounts-of-residual-dna-including-an-sv40-promoter-enhancer-sequence/>
- [26] Wang TJ, Kim A, Kim K. Un metodo di rilevamento rapido del DNA plasmidico competente alla replicazione dai vaccini a mRNA COVID-19 per il controllo di qualità. *J High School Sci.* 2024;fi(4):427—439. doi: 10.64336/001c.127890
- [27] Agenzia europea per i medicinali. EMA/896245/2022: Relazione di valutazione per Spikevax. 2022 Estratto da https://www.ema.europa.eu/en/documents/variation-report/spikevax-previously-covid-19-vaccine-moderna-h-c-005791-ii-0075-g-e-par-assessment-report-variation_en.pdf
- [28] Food and Drug Administration degli Stati Uniti. Autorizzazione all'uso di emergenza (EUA) per un memorandum di revisione di un prodotto non approvato. 2021. Estratto da <https://www.fda.gov/media/153947/download>
- [29] Food and Drug Administration. Lettera di autorizzazione; 2023. Estratto da <https://www.fda.gov/media/150356/download>
- [30] Dipartimento della Salute e dei Servizi Umani degli Stati Uniti. Ispezione dei prodotti iniettabili per particelle visibili - Linee guida per l'industria, 2021. Tratto da <https://www.fda.gov/media/154h68/download>
- [31] Packer M, Gyawali D, Yerabolu R, et al. Un nuovo meccanismo per la perdita di attività dell'mRNA nei sistemi di somministrazione di nanoparticelle lipidiche. *Nat Commun.* 2021;12(1):6777. doi: 10.1038/s41467-021-26926-0
- [32] Hashiba K, Taguchi M, Sakamoto S, et al. Superare le sfide della termostabilità nei sistemi di nanoparticelle lipidiche mRNA con lipidi ionizzabili a base di piperidina. *Commun Biol.* 2024;7(1):556. doi: 10.1038/s42003-024-06275-0
- [33] Bushon RN, Kephart CM, Koltun GF, 3rd, et al. Valutazione statistica della variabilità dei lotti di reagenti per l'estrazione del DNA nella PCR quantitativa in tempo reale. *Lett Appl Microbiol.* 2010;50(3):276—282. doi: 10.1111/j.1472-765X.2009.02758.x
- [34] EMEA/H/C/00S735/0000. Comirnaty European Public Assessment Report (EPAR). 2021. Estratto da https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/comirnaty-epar-public-assessment-report_en.pdf
- [35] Agenzia europea per i medicinali. EMA/CHMP/50784/2022: relazione sulla variazione di tipo IB; 2022. Tratto da <https://postvac.org/wp-content/uploads/wpforo/attachments/3025/1252-Type-IB-variation-report.pdf>
- [36] Oldfield PR, Gutschi LM, McCullough PA, et al. Vaccini modRNA COVID-19 di Pfizer/BioNTech: meccanismo d'azione genetico pericoloso rilasciato prima di test preclinici sufficienti. *J Am Phys Surgeons.* 2024;29:118—126.
- [37] Greenhawt M, Abrams EM, Shaker M, et al. Il rischio di reazioni allergiche ai vaccini SARS-CoV-2 e la valutazione e la gestione raccomandate: una revisione sistematica, una meta-analisi, una valutazione GRADE e un approccio di consenso internazionale. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2021;9(10):3546—3567. doi: 10.1016/j.jaip. 2021.06.006
- [38] Song J, Su D, Wu H, et al. Implicazioni dell'anafilassi a seguito di vaccini mRNA-LNP: è urgente eliminare il PEG e trovare alternative. *Farmaceutica.* 2025;17(6):798. doi: 10.3390/pharmaceutics17060798
- [39] Wiseman DM, Gutschi LM, Speicher DJ, et al. Il frameshifting ribosomiale e la lettura errata dell'mRNA nei vaccini COVID-19 producono proteine "off-target" e risposte immunitarie che suscitano preoccupazioni in termini di sicurezza: commento allo studio britannico di Mulroney et al. *OSF Preprints;* 2023. Tratto da [10.31219/osf.io/nt8jh](https://doi.org/10.31219/osf.io/nt8jh)
- [40] Mulroney TE, Pöyry T, Yann-Puc JC, et al. La N1-metilpseudouridilazione dell'mRNA causa uno spostamento del frame ribosomiale +1. *Nature.* 2024;625(7993):189-194. doi: 10.1038/s41586-023-06800-3
- [41] Rubio-Casillas A, Cowley D, Raszek M, et al. Review: ri 1-metil-pseudouridina (m1'U): amica o nemica del cancro? *Int J Biol Macromol.* 2024;267(Pt 1):131427. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.131427

- [42] Bhattacharjee B, Lu P, Monteiro VS, et al. Segni immunologici e antigenici associati a malattie croniche dopo la vaccinazione contro il COVID-19. medRxiv. 2025. 2025.02.18.25322379; doi: 10.1101/2025.02.18.25322379 Stati G ,
- [43] Amerio P , Nubile M , et al. Preoccupazioni sull'efficacia della tecnologia di vaccinazione a mRNA e sulla sua sicurezza a lungo termine: potenziale interferenza sul meccanismo dei miRNA. *Int J Mol Sci.* 2023;24(2):1404. doi: 10.3390/ijms24021404
- [44] Nelson J, Sorensen EW, Mintri S, et al. Impatto della chimica dell'mRNA e del processo di produzione sull'attivazione del sistema immunitario innato. *Sci Adv.* 2020;6(26):eaz6893. doi: 10.1126/sciadv.aaz6893
- [45] Milano G, Gal J, Creisson A, et al. Miocardite e vaccini a mRNA contro il COVID-19: un'ipotesi meccanicistica che coinvolge il dsRNA. *Future Virol.* 2022, 17:191—196 doi: 10.2217/fvl-2021-0280
- [46] Samsudin F, Raghuvamsi P, Petruk G, et al. La proteina spike SARS-CoV-2 come sistema di rilascio di lipopolisaccaridi batterici in una cascata infiammatoria eccessiva. *J Mol Cell Biol.* 2023;14: 1—14.
- [47] Schmeling M, Manniche V, Hansen PR. Sicurezza dipendente dal lotto del vaccino BNT 162b2 mRNA COVI D-19. *Eur J Clin Invest.* 2023;53(8):e 13998. doi: 10.1111/eci.13995
- [48] Vacik J, Dean BS, Zimmer WE, et al. Importazione nucleare specifica per cellula del DNA plasmidico. *Gene Ther.* 1999;6(6):1006—1014. doi: 10.1038/sj.gt.3300924
- [49] Lim S, Yocum RR, Silver PA, et al. Elevati tassi di integrazione spontanea di DNA lineare modificato alle estremità in seguito a trasfezione di cellule di mammifero. *Sci Rep.* 2023;13(1):6835. doi: 10.1038/s41598-023-33862-0
- [50] Gaitzsch E, Czermak T, Ribeiro A, et al. Il DNA a doppio filamento induce un fenotipo protrombotico nell'endotelio vascolare. *Sci Rep.* 2017;7(1):1112. doi: 10.1038/s41598-017-01148-x
- [51] Ma X, Xin D, She R, et al. Nuove intuizioni sul percorso cGAS-STING nell'ictus ischemico: dalla fase pre-malattia alla fase post-malattia. *Front Immunol.* 2023;14:1275408. doi: 10.3389/fimmu.2023.1275408
- [52] Kwon J, Bakhoun SF. Il percorso cGAS-STING di rilevamento del DNA citosolico nel cancro. *Cancer Discov.* 2020;10(1):26—39. doi: 10.1158/2159-8290.CD-19-0761
- [53] Matthessen R, Van Pottelberge R, Goffin B, et al. Impatto della miscelazione e dell'agitazione sulle caratteristiche qualitative dei farmaci mRNA-LNP. *Sci Rep.* 2024;14(1): 19590. doi: 10.1038/s41598-024-70650-4
- [54] Georgiou CD, Papapostolou I, Grintzalis K. Protocollo per la valutazione quantitativa della concentrazione e del danno al DNA (frammentazione e tagli). *Nat Protoc.* 2009;4(2):125—131. doi: 10.1038/nprot.2005.222 Kaiser S , Kaiser S , Reis J , et al. Quantificazione delle concentrazioni oggettive di impurità del DNA nei vaccini a mRNA. *Vaccine.* 2025;S5:127022. doi: 10.1016/j.vaccine.2025.127022
- [55] Organizzazione Mondiale della Sanità. Allegato 3: requisiti per l'uso di colture cellulari animali come substrati per la produzione di medicinali biologici e la caratterizzazione delle banche cellulari. Sostituzione dell'Allegato 1 della Serie di rapporti tecnici dell'OMS n. 878; 2013. Estratto da https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/documents/trs_978_annex_3.pdf
- [56] Sheng-Fowler L, Lewis AM, Jr., Peden K. Problemi associati al DNA residuo del substrato cellulare nei vaccini virali. *Prodotti biologici.* 2009;37(3): 190—195. doi: 10.1016/j.biologica.2009.02.015
- [57] Di J, Du Z, Wu K, et al. Biodistribuzione ed espressione genica non lineare delle LNP di mRNA influenzate dalla via di somministrazione e dalla dimensione delle particelle. *Pharm Res.* 2022;39(1):10S—114. doi: 10.1007/s 11095-022-03166-5
- [58] Phua KK, Leons KW, Nair SK. Efficienza di trasfezione e cinetica di espressione del transgene dell'mRNA somministrato in formato nudo e nanoparticellare. *J Control Release.* 2013;166(3):227—233. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.12.029 Turnbull IC, Eltoukhy AA, Fish KM, et al. Il rilascio miocardico di nanoparticelle lipidoidi che trasportano modRNA induce un'espressione rapida e transitoria. *Mol Ther.* 2016;24(1):66—75. doi: 10.1038/mt.2015.193
- [59] Ufficio del Primo Ministro del Giappone. Vaccini COVID-19; 2024. <https://japan.kantei.go.jp/ongoingtopics/vaccine.htm>
- [60] Klinman DM, Klaschik S, Tross D, et al. Linee guida della FDA sui vaccini profilattici a DNA: analisi e raccomandazioni. *Vaccine.* 2010;28(16):2801—2805. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.11.025
- [61] André M, Reghin S, Boussard E, et al. Test PCR universale in tempo reale per la quantificazione e la valutazione delle dimensioni del DNA cellulare residuo nei vaccini virali umani. *Biologicals.* 2016;44(3):139—149. doi: 10.1016/j.biologicals. 2016.03.002
- [62] Senigl F, Soikkeli AI, Prost S, et al. L'enhancer del virus SV40 funziona come un elemento che mira all'ipermutazione somatica con potenziale attività tumorigenica. *Tumour Virus Res.* 2024; 18:200293. doi: 10.1016/j.tvr.2024.200293
- [63] Drayman N, Ben-Nun-Shaul O , Butin-Israeli V , et al. L'aumento di p53 nelle cellule umane blocca l'infezione da SV40 inibendo l'espressione di T-ag. *Oncotarget.* 2016;7(33):S2643—S2660. doi: 10.18632/oncotarget.10769
- [64]
- [65]

Some Differences Between RNA-based Vaccines and RNA-viral Infections and Immune Reactivity

Lorenzo Alibardi

Comparative Histolab Padova, Italy; PAM, Dept Biology, University of Bologna, via Selmi3,
40126, Bologna, Italy

E-mail: lorenzo.alibardi@unibo.it

Received: December 23, 2024 Accepted: January 30, 2025 Published: February 11, 2025

doi:10.5296/jbls.v16i2.22643 URL: <https://doi.org/10.5296/jbls.v16i2.22643>

Abstract

Some basic differences between RNA-virus infections and immune reactions elicited after injection of modified biotech-constructed RNA or DNA short viral sequences are briefly presented based on consolidated knowledge on viruses and immunology. Reactivity to manufactured biotech-RNAs are relatively known and controlled within test tubes. As opposed, interactions between inoculated biotech-RNA-DNAs-modified vaccines into the human body and its complex and incompletely known functions are unpredictable. To state the contrary, indicates that present-day technology pretends to know everything on how the human body reacts to the inoculation of these RNA-DNA vaccines, and untenable scientific belief. Unknown pathological reactions might be generated from biotech-RNAs utilized as vaccines, at the cellular and organismal level, as the active spike protein of the SarsCov2 virus has demonstrated, generating many more adverse effects in comparison to previously used vaccines. The present brief paper of general theoretical content, points out some of the main biological differences present between traditional vaccines, based on attenuated viruses or their proteins, and RNA-DNA vaccines, based on randomly delivered short and specific modified RNAs or by virus-carried DNAs. While protein-based vaccines inject inactive proteins with a short turnover for degradation, RNA-DNA-based vaccines give rise to active and pathogenic proteins with unknown certified turnover. Furthermore, biotech-modified nucleotide sequences can penetrate into numerous cell types in different organs, generating spike proteins, autoimmunity, and potential genetic alterations still to be evaluated in future years. The administration of RNA-DNA vaccines appears as an experimental treatment with unknown short-terms and long-term consequences on millions of people, and many years of experimentation are needed before their use might become a common medical practice.

Keywords: RNA-vaccine, viral infection, protein release, monoclonal, polyclonal, immune reaction

1. Introduction to General Viral and Immune Functions

The present paper of general nature is based on basal information on what we presently know about viral infections and immunity, with considerations on modern vaccinations. Viruses are 30-300 nm size biochemical particles containing RNA or DNA, few structural and functional proteins and sometimes lipids, and they behave as *genetic parasites of cells* (Curtis, 1965; Brock and Madigan, 1991). During a viral infection, the viral RNA or DNA enter into cells and replicate giving rise to millions of virus particles ready to infect other cells. This occurs because the viral RNA or DNA contains information (genes) that specifically stop ribosomes of the infected cell to translate their own mRNAs while they mainly or exclusively translate viral RNAs or DNAs. This mechanism allows the high production of viral proteins and of new viral RNAs or DNAs and their virus. The newly generated *viruses are complete*, including the inner and external proteins utilized for binding and penetrate into cells (spikes; see Freire et al., 2015; Krupovic and Koonin, 2017). Most of these proteins *remain attached* to the rest of the virus, in the capsid or in viral core, including the spike, and are not released outside the cells. Releasing viral proteins during the virus cycle instead of complete viruses would distribute spike proteins into body fluids, and potentially limit the infections of other cells from the new viruses since the free spikes might also compete with the complete viruses for the attachment to other cells. In contrast, when only spike proteins are produced in large amount from an RNA-DNA vaccine (Chaudhary et al., 2021; Chavda et al., 2022), these are the only molecules that can exit infected cells. The spike proteins or their fragments are released among cells as *soluble proteins*, and circulate to different regions of the body where they can activate pathological functions, as observed for Covid19 spike (Gambacorti-Passerini and Aroldi, 2022; Acevedo-Whitehouse and Bruno, 2023; Bellavite et al., 2023). As we will see later, the above basic characteristics of an infective viral cycle, the production of complete virus, in addition to others, *are not met* in RNA-based vaccines where the viral cycle is altered (Alibardi, 2023).

The immune system, innate and adaptive, has progressively evolved to preserve the biological self of our multicellular bodies, including *fighting against viral infections* (Danilova, 2006; Sompayrac, 2012; Simon et al. 2015). This defense takes place by the production of *numerous varieties of immune cells and antibodies* that neutralize in different ways viruses invading our body. Through a complex mechanism of *gene reshuffling*, our immune system can produce over 500 millions of different antibodies, capable to circulate *inside our body* (IgM, IgG, IgE) and *coat the mucosal surfaces* of nasal, lung, intestine, and genital ducts (IgA). The production of many different types of immune cells and antibodies (*polyclonal immunity*), potentially tagging any type of viral proteins (antigens), determines the success of immunization and has allowed humans *to survive during million years* of biological evolution. For most types of viruses (cold, small pox, chicken pox, yellow fever, measles, influenza, rubella, mumps, SarsCov2 etc.), multiple and specific types of antibodies are produced that are directed to all the varieties of virus proteins penetrated in the body.

The resulting immunization protects us from future infections from the same virus for *various*

years or even permanently. A lasting immunity likely derives from the *successive occasional expositions* of the body to the same viruses during our life, expositions that maintain active our immune system. This is also demonstrated from the presence of developed lymphoid organs such as lymph nodes, spleen and thymus in our body. In fact, in animals kept in sterile environments or in humans born with immunological deficits such as agammaglobulinemia or severe immunodeficiency, and kept in sterile environments where no immunity reactivity is elicited, *no or undeveloped lymphoid organs* are present. The presence of these lymphoid organs in our body is therefore a proof of a continuous and variable exposition to microbes, including viruses. Once a person is naturally healed from an infection disease, he/she becomes *permanently immune or however protected for several years* against that disease, and can only be lightly affected from the same viral infection in rare circumstances (immunodepression, other ongoing illnesses, dietary unbalance, lowering immunity during aging etc.).

The process of biological evolution, where any new immunological function was sequentially built, adding new capabilities to previously established immune mechanisms, has been *perfected over millions of years*, giving rise to bodies adapted to efficiently contrast most viruses. A natural immune reaction is not limited to *1-2 viral antigens like modern vaccines*, but instead is potentially directed against *all viral antigens*, providing efficiency and *generating a lasting immune protection* in inner organs and mucosae surfaces. Consequently, *no medical intervention can be more effective than our polyclonal natural immune system*. In fact, while a long biological evolution has proceeded gradually facing multiple stimulations that adapted our bodies to most viruses, immunological medical interventions progresses empirically, according to the level of knowledge acquainted in its short period of history, few centuries (see later).

Only in few but dramatic cases (small pox, rabies, ebola, yellow fever, AIDS etc.), the elaborate adaptive immune system so far evolved *reacts too slowly* to avoid these diseases and, sometimes, even death (Brock and Madigan, 1991). The latter, in particular for airborne viral infections, typical diseases of vertebrates that colonized the land during different Paleozoic Periods, is however generally due to secondary bacterial infections such as pneumonia, not to the virus itself. However, for most viral infections, with a low level of lethality in healthy normal people (chicken pox, rubella, measles, mumps, west Nile disease, adenoma pharyngitis, etc.), the body reacts well with low-mild suffering, and the person *becomes almost permanently immune* or healed from these viral diseases. For other diseases, such as cold and influenza, immunity is not lasting due to the high rate of mutation in particular of the spike/outer external proteins that interact with cell receptors of the host. For influenza viruses this continuous generations of variants derive from combinatory processes among fragmented RNAs of different mutants/variants (Brock and Madigan, 1991). This is the reason why multiple of other influenza antigens (other viral proteins) should be selected to make lasting influenza vaccines. For covid19, insufficient information on a lasting immunity is so far available, although naturally immunized (healed) individuals are better or equally protected with a longer immunity than the vaccinated people with RNA or DNA

vaccines. Because of their polyclonal natural immunization, it is likely that haled people from Covi19 are also more protected from new variants than vaccinated only against the spike protein (monovalent immunization), but contrasting opinions are published and definitive laboratory proofs are inconclusive at the present.

As for other viral infections, also for sarsCov2 virus variants, polyclonal vaccines tagging the other viral proteins aside spike, should be manufactured (Fig. 1).

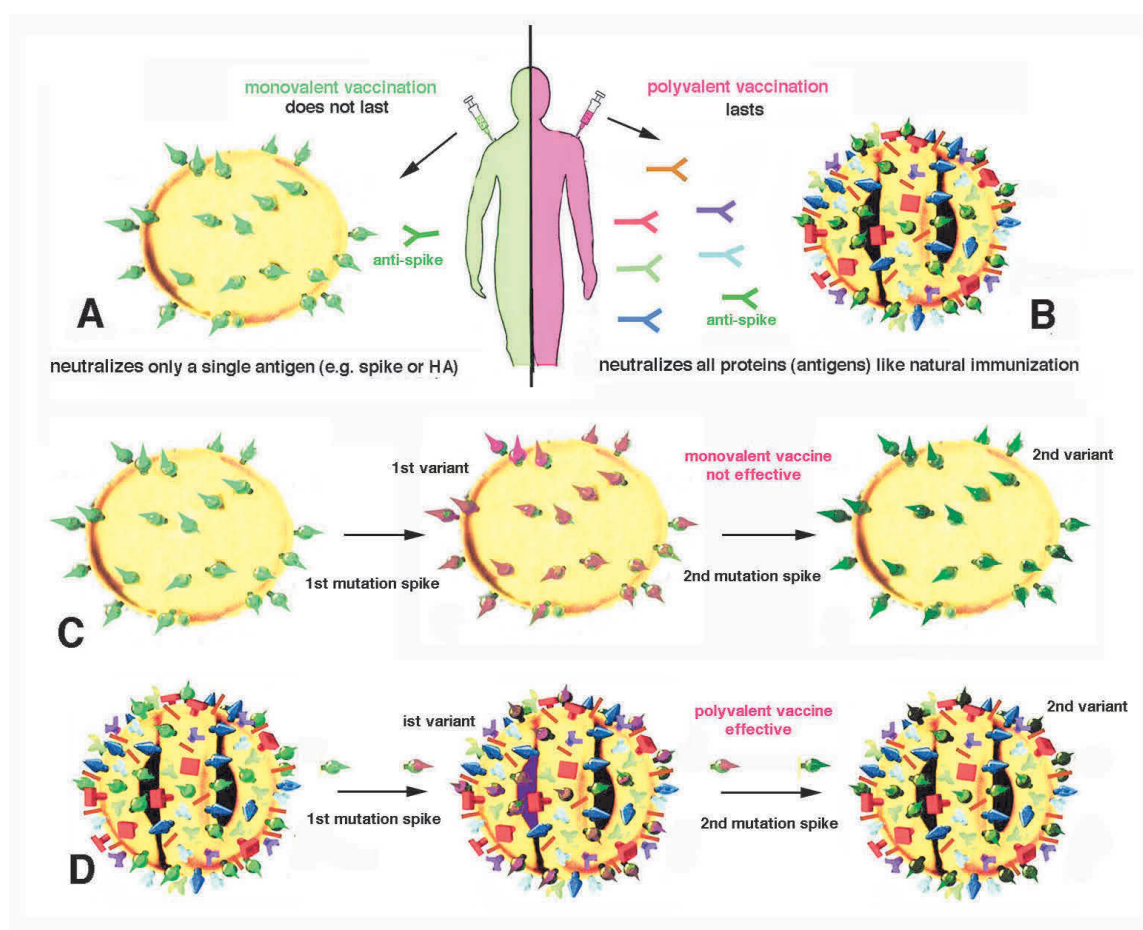


Fig. 1. Comparison between a monovalent and a polyvalent vaccination **A**, only one protein (e.g. spike) is neutralized by anti-spike antibodies. **B**, numerous antibodies (7 here shown, including anti-spike) are produced. **C**, a monovalent vaccination only stimulate production of anti-spike proteins as the virus would be covered only from spike. Mutations of spike would lower or completely abolish any immune protection. **D**, a polyvalent vaccination instead stimulates production of numerous antibodies (polyclonal reaction, only 7 are here shown) that neutralize most or all the antigens (with different shapes and colors) so the protection lasts for the first variant, the second variant and following variants.

In contrast, continuing to manufacture vaccines for influenza or sarCov2, or for other viruses, tagging only the external and most changing (from mutations) viral proteins that are ligands

of cell receptors, appears a poorly driven procedure from a scientific point of view. It is here suggested that the over 100 variants of influenza virus and the 6-8 sarsCov2 variants so far

known, and new ones generated every 6-12 months, might also depend from the selection of variants derived from the use of modern monovalent vaccines. The latter, while contrast the main variant of a certain year, allow the survival and selection of the other variants generated in that specific year that will infect people in the following years (Alibardi, 2023).

In conclusion, since the immune system has evolved polyclonal reactions that continuously save our lives, it is rationale to predict that any *medical procedure meant to permanently immunize* people from potentially dangerous infections should follow the natural rules of the viral cycles (*not liberating functionally active viral proteins*) and those of the activated immune system (*eliciting a polyclonal immunity*; Fig. 1 A, B). Polyclonal or natural immunity hits virus variants because this vaccination tags many changing (from mutations) and non-mutated viral antigens and, although some antigens change from genomic mutations, most of the others remain unchanged, so that polyvalent vaccinations give a lasting protection (Fig. 1 C, D). Unfortunately, from many years these scientific indications are not followed from Pharma industries, that mainly produce and sale continuously new monovalent vaccines.

2. Vaccination and Traditional Vaccines

The intuition, mainly due to Edward Jenner in 1796, that the protection from the lethal or devastating human small-pox disease (40-80% lethality in old ages), by the induction of immunity using a cow small-pox infection, paved the way to vaccination (Curtis, 1965; Aichelburg, 1977). Conferred immunity derived from the *antigenic similarity* of the cow virus to that of the human virus (both pox-viruses) that immunizes and prevents human small-pox. Using this medical procedure, other severe viral diseases such as rabies, yellow fever, blackleg, polio, hepatitis B, ebola etc. have been controlled or even erased in the past. It was learnt that the scarification, injection or oral administration of inactivated viruses, of their proteins or attenuated viruses un-capable to give rise the disease but *preserving the immunogenic capacity*, could avoid the severe infection, providing a lasting immunity. Vaccination was and is an *amazing conquest of medicine* and has saved millions of people, but it is a *voluntary introduction in the body of healthy people* of inactivated viruses or their antigens to prevent the risk of serious infections, not minor affections, and that the benefits should largely overweight the risks of negative effects.

Inactivation of virus proteins eliminates any pathogenic effect but maintains immunogenicity of the injected denatured protein (Fig. 2 A). In contrast, vaccination with RNA or DNA *gives rise to active proteins* which interaction with the body functions *are unknown or even pathogenic* (Wong and Webbing, 2013; Gambacorti-Passerini and Aroldi, 2022; Bellavite et al., 2023; Fig. 2 B).

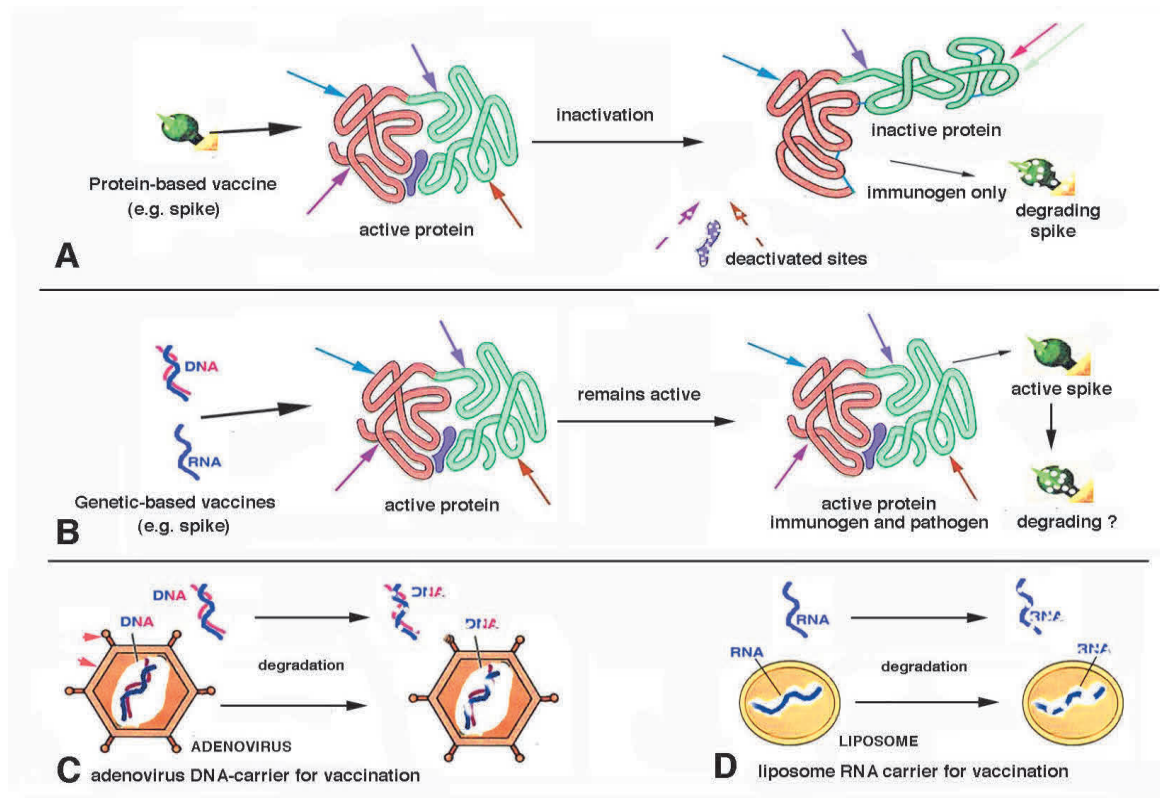


Fig. 2. Differences between a protein-based vaccine (A) and a genetic vaccine (B), and biotech vectors of RNA or DNA (C, D). A, the inactivation of the antigenic protein (arrows indicate some tagged epitopes) gives rise to a denatured protein that has lost some epitope sites, formed others epitopes, and changed conformation. The inactive protein however keeps some of the former and new immunogenic epitopes (arrows on the right), and is rapidly degraded. B, as opposed, genetic vaccines produce a spike protein that remains active and is released among different tissues or is circulating in the blood, triggering immune-stimulation but also unknown pathological reactions. The time of degradation of the vaccine RNA and its active spike protein is not known (?). C, viral carrier of a DNA-vaccine sequence with possible DNA fragmentation and degradation during mass vaccination. Red arrowheads indicate that also the capsid proteins can produce pathogenic effects. D, liposome carrier of RNA-vaccine with possible RNA fragmentation and degradation during mass vaccination.

Traditional vaccinations initially mimicked as much as possible the entire immunogenic potential of the viruses, since a polyclonal immune reaction was elicited, like for natural immunity (Curtis, 1965; Aichelburg, 1977; Brock and Madigan, 1991; Wong and Webby, 2013; Fig. 1 B, D). However, a variety of *adverse body reactions* can be activated after vaccination, generally in very few people with severe consequences and, rarely, even death. These adverse reactions depend from the individual health conditions and also from the type of vaccines utilized. Some of the pathological consequences of traditional vaccines derived from *lack of purity of vaccines*, incomplete inactivation of viruses, or to minor pollutions from unwanted substances derived from the processes of viral production. The impurities contained residual cell or organic fragments from the cell culture system where viruses were

produced in high amount, or from the chick eggs utilized for rising a high number of viruses, and later inactivated for vaccination.

To guarantee purity of these traditional vaccines, long and tedious procedures, large infrastructures and costly activities involving numerous dedicated personnel were and are required, a *big investment for any Pharma company* or Public Hygiene Institutions. However, improving the technologies for the safe production of traditional vaccines had to be pursued during the last 40-50 years. This in particular through the *biotechnological production of viral proteins* of known amino acid sequence in high amount and purity, proteins that can be *inactivated and utilized as polyvalent vaccines*. This means that most of the viral proteins can be utilized as antigens so that the numerous antibodies produced following vaccination bind and neutralize all or most of the viral proteins. In case an infection with the same virus or its variants occurs, the immune system elicits a strong reaction that determines a broad protection also against the variants or even a *complete and lasting immunity*, like for natural immunity (Alibardi, 2023). For what is known, inactivated proteins injected as vaccines, *do not replicate, do not penetrate into cells but remain extracellular; do not produce other physiological effects aside immunization*, and they are degraded within 1-3 weeks. During this time, inactivated viral proteins (antigens) are phagocytized from “antigen presenting cells” (APC-cells) distributed in different body organs, and the derived peptides are presented to lymphocytes within lymphoid organs where they stimulate polyclonal immune responses.

Instead to follow this general immunological principle, modern vaccines are manufactured only *against one or few viral proteins or their smaller epitopes* that bind to cell receptors (ACE2 or others), for instance the haemoagglutinin (HA) for influenza viruses or the spike protein for the Sars-cov2 virus (Wong and Webbing, 2013; Chaudhary et al., 2021; Chavda et al., 2022; Bellavite et al., 2023, Fig. 1 A, B). The scope of these monovalent vaccines is to impede the virus attachment to our cell receptors through the HA or the spike protein. Modern vaccines that only neutralize a single viral antigen, e.g. HA of specific influenza viruses or the Spike protein of SarsCov2 variants during a certain Fall-Winter, allow the other variants derived from the frequent mutations for these single proteins, to remain in the environment also in the following Spring-Summer periods. When the seasonal conditions change again from the Summer to Fall in the next year, these new variants, selected by monovalent vaccines, can determine a new contagious. Therefore, epidemics are only limited to that specific year by manufacturing and selling monovalent vaccines, a continuous productive process from Pharma industries. It would be scientifically more correct, and logic, to use polyvalent vaccines instead of monovalent vaccines for obtaining a better and lasting immunization. Therefore, the frequently generated virus variants (mutants) for the HA, the spike or other viral proteins would be completely or partially *neutralized following a polyclonal vaccination*, since also the remaining unchanged antigens are neutralized from the immunity derived from these vaccinations (Fig. 1 C). As opposed, as previously indicated, the monovalent vaccinations that are *routinely utilized today*, likely contribute to the continuous *selection of new virus variants* since these vaccines only hit the variant of a certain month or year, allowing the continuous production and permanence of new variants that will generate the next seasonal epidemics of influenza, covid19 or other viral infections

(Alibardi, 2023, see later). The immunization against one-two proteins is *unnatural and apparently illogical*, also considering that these are the proteins that change more frequently (mutate) in the virus (HA and spike). Therefore, the scientific logic and knowledge would produce vaccines against the least changing viral proteins, not those that more frequently change following genetic mutations. The change of these external viral proteins allows that the mutated viruses (variants) can infect our cells through new binding proteins while the antibodies effective against the initial binding viral proteins result ineffective (Alibardi, 2023). In conclusion, modern monovalent vaccines *do not last* while they are manufactured and sold from Pharma industries at any new epidemic burst.

3. Some Differences Between Viral RNA Infections and Those from RNA-vaccines

The development of molecular manipulation of genes, both RNA and DNA sequences in the last 30-40 years has now become a routine (Brock and Madigan, 1991; Khalil, 2020). Main areas of medical applications are gene therapies, production of transgenic plants and animals, attempts to cure genetic impairments, use of virus for experiments of gene transfections and, recently, also the *manufacturing of vaccines based on viral RNA or DNA* (Pardi et al., 2018; Zhou et al., 2023). The latter technology, indicated as the *future of vaccination*, induces the production of viral antigens in the body, after the injection of parts of the viral RNA or DNA coding for these antigens (Chaudhary et al., 2021; Chavda et al., 2022). The production of the viral antigens (e.g. spike) is completely made by *the patients, the new factories for the production of the viral antigens*, and eliminates the complex and costly production of traditional vaccines made by *Pharma industries* that "only" synthesize RNA or DNA sequences at relatively low cost using the modern biotech platforms.

However, a *number of differences* are present between the natural viral infection and the biotech-RNA or DNA infection induced with this type of vaccination (Gambacorti-Passerini and Aroldi, 2022; Petit and Longo, 2023; Alibardi, 2023). The technical capability of genetic engineer operations in test tubes and laboratory experiments *has been equalized to that of RNA-DNA vaccines*, indicating that there were 20-30 years of experience in using RNA-DNA vaccines. This type of statements is untenable since manipulating RNAs or DNAs for laboratory experiments, agronomical purposes or gene therapy or editing, is not equal to manipulate RNAs or DNAs for vaccination on humans. *Humans are not reacting as test tubes*, but this seems to be neglected from the manufacturers of RNA-DNA vaccines. In the latter case *no experimental testing, evidences and experiences were and are available* for RNA or DNA vaccines before their use for mass vaccination in 2020-2024. A serious scientific evaluation on the risk/benefit ratio and consequences of inoculated genetic material into partially known and complex human bodies has not been done, and these studies are still ongoing (Chaudhary et al., 2021; Chavda et al., 2022; Bellavite et al., 2023). Genetic material such as RNA or DNA is not like any other drug previously utilized, because these molecules determine basal cellular processes and interactions still incompletely known and are mainly academic information, with unknown possible risks in their medical applications and transmissibility to next generations. Consequently, the indiscriminate use of RNA-DNA vaccines appears, also today, a mass experimentation. Also, the administration of biotech-RNAs or DNA inside carrier viruses or liposomes for mass vaccination, outside of

the lab control environment, cannot guarantee that these genetic molecules *remain integral* (Fig. 2 C, D). Fragmented DNAs or RNAs could produce unknown effects on the body, likely pathogenic (Tinari et al., 2021; Zhang et al., 2021; Schoenmaker et al., 2021; Seneff et al., 2022). While the biological evolution of immune mechanisms occurred step by step, any technological novelty based on a partial and empirical knowledge introduces in complex body mechanisms, established from a long evolution, unpredictable interactions that very likely give rise to pathological conditions.

When a virus enters the body and overcomes the multiple physical and chemical barrier, and also innate immune cells (phagocytes such as granulocytes and macrophages), the viral particles penetrate into cells of specific or preferred organs, following their receptors recognition (lungs, liver, nervous system etc.; Fig. 3 A).

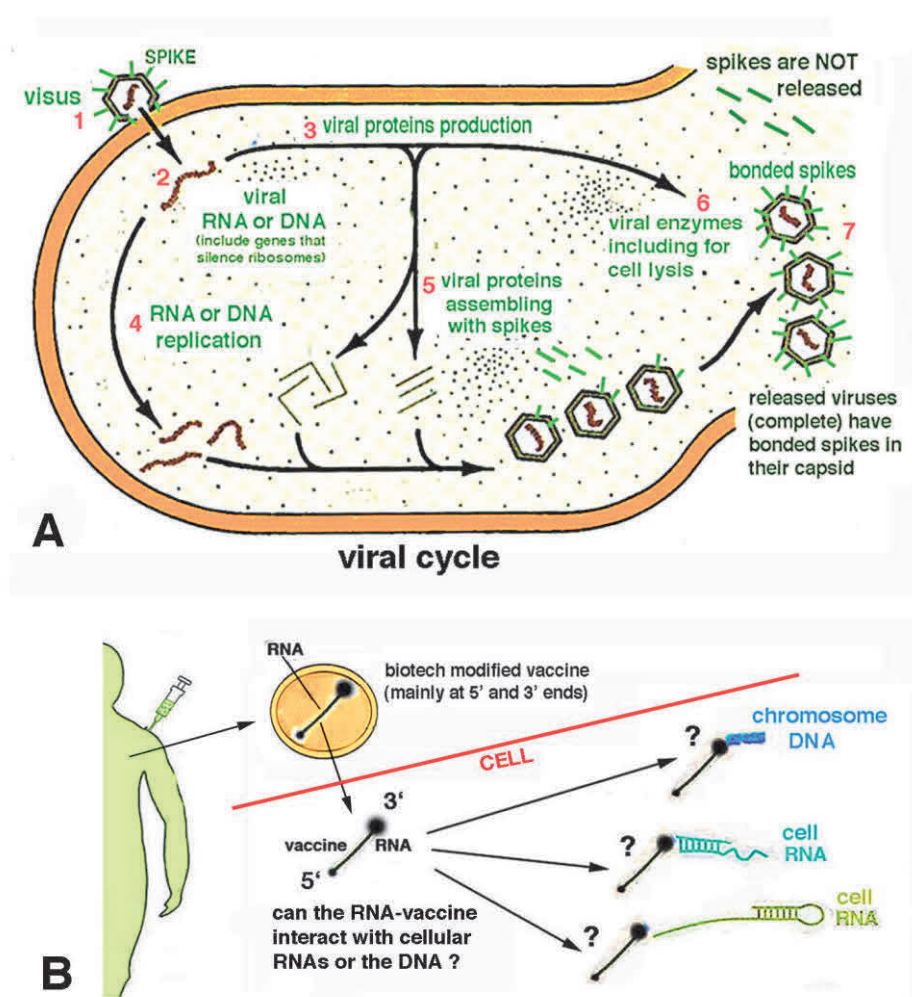


Fig. 3. Classic viral cycle (A) and biotech-RNA vaccine potential interactions within cells. A, after viral infection, new viral particles are release complete, with spikes attached to the capsid, not released as soluble spike proteins. B, after RNA-vaccine (black bar with main modification in the 5' and 3' nucleotide ends of the RNA) injection and penetration into various cells, potential interaction (?) with cellular RNAs or DNA remain unknown because of incomplete knowledge of all cellular functions.

Many different viruses possess specific organ-cell tropisms (skin, intestine, lungs, glands, brain etc.) and *do not infect any cell type* present in the body, limiting the extension of the infection. This does not occurs using vaccines containing RNA for spike that, aside their unknown stability in the blood or intercellular fluids, do not target specific cells but are potentially *incorporated at random into any cells that they encounter* (Schoenmaker et al., 2021; Chaudhary et al., 2021; Chavda et al., 2022; Bellavite et al., 2023). Inside the body, the invading viruses are identified through specific macrophages or dendritic cells (APC, Antigen Presenting Cells) that activate different types of lymphocytes (T helper lymphocytes and B lymphocytes). When viruses penetrate in their target cells, they are detected and later destroyed by specific macrophages and lymphocytes (T-cytotoxic cells) that check the cell surface of these infected cells. Both mechanisms, extracellular (antibody production) and intracellular (viral infection), give rise to broad *polyclonal immune responses and immune memory*, since numerous different clones of lymphocytes are produced and neutralize most or all viral antigens internally and on mucosal surfaces, *not only one or two antigens like modern vaccines* (Sompayrac, 2012; Fig. 1 D).

In contrast, when a simple but alien biotech-RNA-DNA is injected into the body, the *viral cycle is modified* since only the spike proteins or fragments are released inside and outside the cell but not the entire virus (Fig. 3 A-B). The intracellular spike can interact with the DNA of chromosomes during cell division since no nuclear membrane is present for 1-3 hours during this phase (Figs. 3 B, 4 A). The spike proteins are later exposed on the cell membrane associated to MHC I or II or become soluble into biological fluids. Furthermore, such biotech-RNAs have undergone *a number of chemical modifications* to make it more stable and lasting, especially in the 5'- and 3'- nucleotide ends, and even introducing nucleotide base modification (Pardi et al., 2018; Chaudhary et al., 2021; Chavda et al., 2022; Kim et al., 2022; Bellavite et al., 2023; Fig. 3 B). The potential interactions, fate and duration of these biotech-RNAs randomly incorporated in many cells and organs with no specificity, in the complex human body *are unknown*. The human body *cannot be treated as a test tube*, since nobody knows all the functions and interactions of its cells and organs. Nobody can predict or has experimentally tested possible interactions with these RNA-DNA vaccines inside the body (Gambacorti-Passerini and Aroldi, 2022; Alibardi, 2023; Fig. 3 B). The modified biotech-RNAs (or DNAs-carried from viruses) *can penetrate the nucleus* and contact the genomic DNA, especially during the metaphase and anaphase of cell division, when the *nuclear membrane disappears for 1-3 hour* (Fig. 4 A). This potentially dangerous process of penetration and DNA-interaction occurs in particular in bodies where billions of cells are dividing, namely in *embryos, fetuses and children*, aside the stem cells of renewing tissues (skin, intestine, blood marrow etc.) or in the gonads of adults (Alibardi, 2023; Fig. 4 B).

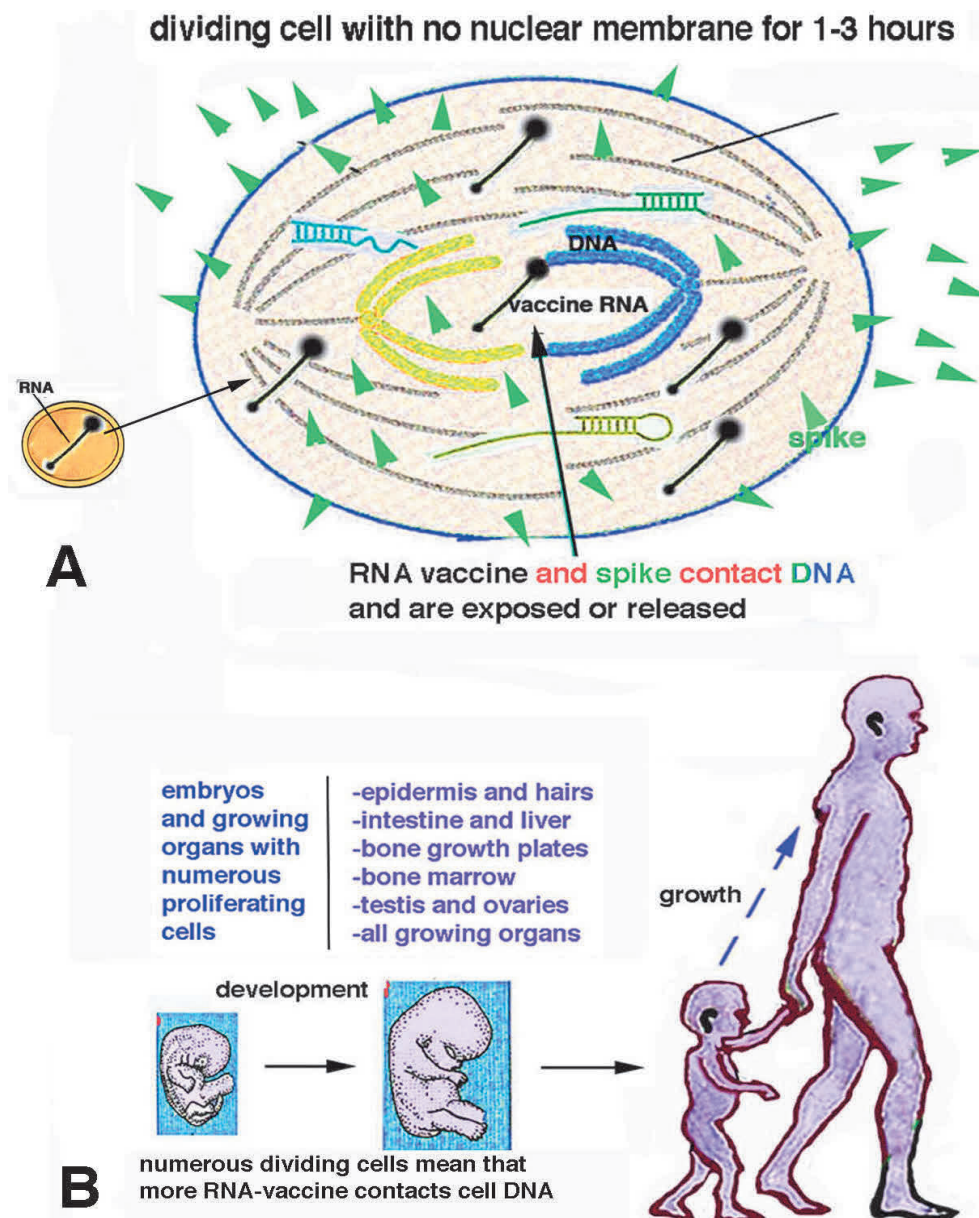


Fig. 4. Contact of vaccine RNA with chromosomes (DNA) during mitosis (A), and unknown consequences on bodies containing many dividing cells that can incorporate high amount of biotech-RNA (B). **A**, dividing cell containing both biotech-RNAs and their coded spike proteins that are distributed in the cytoplasm and nuclear region contacting the chromosomes (DNA). Spike proteins or their fragments (peptides) are exposed on the cell surface or released extracellularly. **B**, embryos, fetuses, growing children and young individuals contain many dividing cells so that the uptake of biotech-RNA or-DNA is higher than in fully grown-up adult or elderly individuals where a lower number of dividing cells are present. Main affected tissues are physiologically renewal tissues, and some are indicated.

While "*natural cellular mRNAs*" are not interacting with their own DNA, a mechanism that has been likely "perfected" with other cell functions during the 1-2 billion year of evolution of eukaryotic cells, *potential interactions and recombination of biotech-RNAs* with cellular

RNAs, DNA or other molecules *are unknown* (Gambacorti-Passerini and Aroldi, 2022; Bellavite et al., 2023). Again, the human body *cannot be reduced to a test tube* where these interactions and recombination are instead better known, a reductionist approach that could generate adverse or pathological outcomes in numerous people (Petit and Longo, 2023).

Furthermore, without other genes for silencing cell ribosomes as in complete viruses, biotech-RNA sequences only containing the nucleotides for the production of the spike protein or its binding site to cell receptors, likely cannot produce the same high levels of the spike antigen for immunization like the entire RNA of a sarsCov2 virus in a natural infection. Although made more stable through biotech manipulations, the lack of specific ribosome inhibition from biotech-RNAs, may contribute to explain why the spike produced at random in sparse cells of the body cannot induce a strong immune *stimulation that is also limited to few months* (Gambacorti-Passerini and Aroldi, 2022; Bellavite et al., 2023). Even producing relatively high spike concentrations, the duration of the antibodies that are produced remains however limited and does not elicit a lasting protection in comparison to a natural viral infection, as this has become evident after RNA-DNA based vaccinations.

4. Pathological Consequences of RNA-DNA Vaccines

Viral protein antigens in the capsid carry RNA or DNA into specific cells and are captured from APC-dendritic cells that activate the immune response (Sompayrac, 2012). As previously indicated, viral RNAs or DNAs or their generated proteins *do not travel as isolated molecules into the body* since they would be rapidly degraded extracellularly and intracellularly. Potential unknown side effects derived from injecting RNAs through liposomes (Pfizer or Moderna vaccines) or DNA inserted into the carrier capsid of an alien adenovirus (Astrazeneca or Johnson & Johnson), have been reported (Gambacorti-Passerini and Aroldi, 2022; Seneff et al., 2022; Acevedo-Whitehouse and Bruno, 2023; Bellavite et al., 2023; Petit and Longo, 2023; Fig. 2 C, D). The incorporation of a complete or partial viral RNA or DNA produces intracellular spike proteins that *are exposed on the surface of any cell* that received the biotech-RNA or -DNA. The spike-derived antigens, aside penetrating in the nucleus, would also alert the immune sentinels (macrophages and T-helper and/or T-killer lymphocytes) after their surface exposition on various types of cells. In fact, the exposition of spikes on the surface of many different cell types after they have incorporated the RNA-DNA vaccines indicates that these cells are infected and should be destroyed by specific immune cells (e.g., T-cytotoxic lymphocytes). The latter event *determines autoimmunity*, and can hit all organs that contain cells that have randomly adsorbed the RNA- or DNA-vaccines, giving rise to myocarditis, hepatitis, nevrites, encephalites etc. (Gambacorti-Passerini and Aroldi, 2022; Acevedo-Whitehouse and Bruno, 2023; Bellavite et al., 2023). Aside the problems indicated above, another complication in the utilization of these vaccines is the production of *active proteins that travel freely* inside the body (Fig. 2 A, B). This information was and is necessary before activating the RNA-DNA vaccination for the Sars-cov2 spike protein, and will be essential for the viral proteins produced in future vaccination programs using RNA-DNA vaccines for most viral infections (Pardi et al., 2018; Chaudhary et al., 2021; Chavda et al., 2022; Kim et al., 2022; Zhou et al., 2023; Fig. 5).

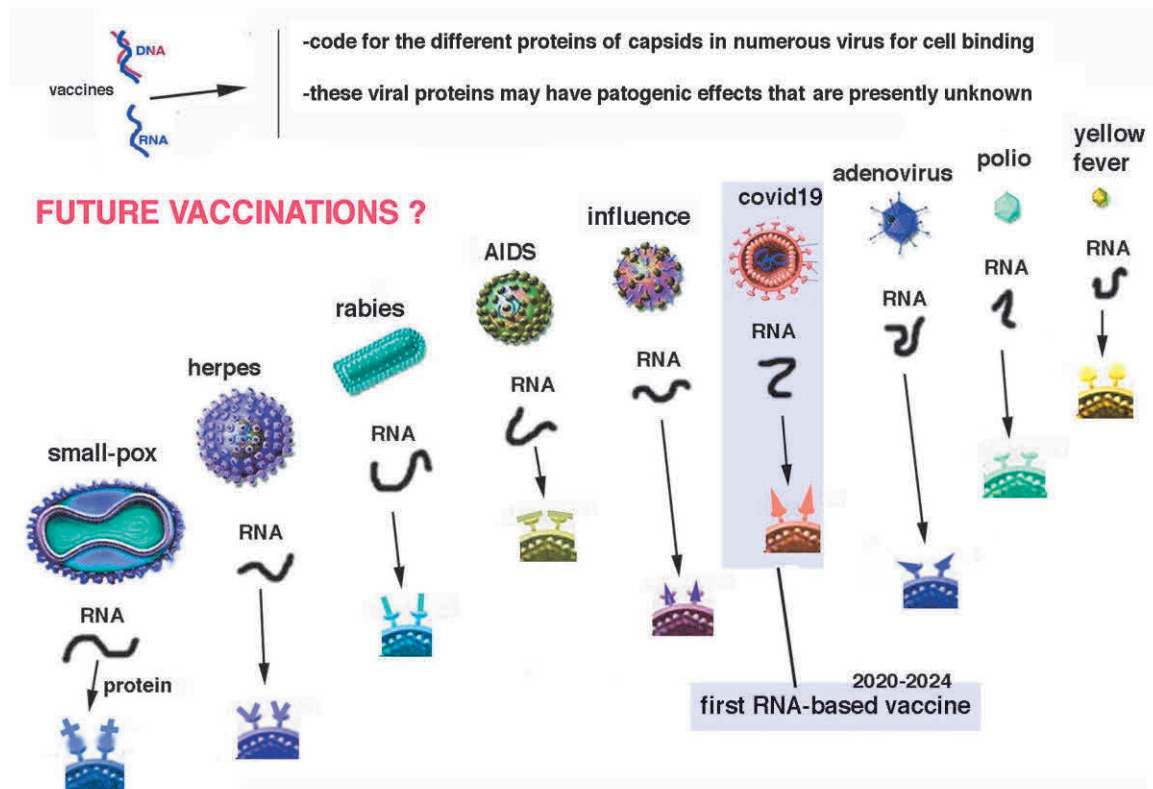


Fig. 5. Future potential RNA-vaccinations against different viruses, planned to replace traditional vaccines. After selecting specific RNAs (or DNAs) coding for the different spikes or external binding proteins to cell receptors that are present in these viruses, these vaccines may be utilized, as the covid19 vaccine, for mass vaccination. Whether these active virus proteins can also determine pathogenic effects, like those of the Sars-cov-2 spike protein, should be evaluated through a long experimentation before inoculating these RNA-based vaccines to people.

Other pathological effects, clearly demonstrated after the RNA or DNA Covid-19 vaccination, are the alterations on *blood pressure (ictus)* and *increasing blood clotting* with consequent failure of tissues oxygenation and necrosis of affected organs from anoxia, heart, lungs, kidneys etc. (Acevedo-Whitehouse and Bruno, 2023; Bellavite et al., 2023). A more basal alteration of the cellular homeostasis generated from the spike protein, regards the potential alteration of DNA-repair mechanisms, as suggested from a published study (Jang and Mey, 2021). The latter study has been later retracted from the scientific Journal but no follow-up research has been conducted in this direction, for unclear reasons. If confirmed, the alteration of cell genetic mechanisms can be devastating, *increasing tumors, infections and autoimmunity*. In contrast, if not confirmed, the use of RNA-DNA vaccines would have appeared safer, but *unfortunately no further independent research* has been conducted to confirm or deny the initial 2021-study. The uncontrolled distribution of RNAs-DNAs producing "infected cells" for destruction and potential DNA-integrations must be predicted using these types of vaccines based on RNA or DNA (Zhang et al., 2021; Gambacorti-Passerini and Aroldi, 2022; Bellavite et al., 2023). Instead, RNA- and

DNA-based vaccines are reported, neglecting the lack of largely accepted scientific evidence, to be *very successful and even worth of the 2023 Nobel Prize* (Chaudhary et al., 2021; Chavda et al., 2022). RNA-DNA vaccines are indicated *to have saved many lives from Covid19*, and these new types of vaccines are planned for mass utilization in the next epidemic outbursts predicted for the coming years (Pardi et al., 2018; Kim et al., 2022; Zhou et al., 2023; Fig. 5).

Unfortunately, little is known on the functionality of isolated viral proteins, especially those binding to our cell receptors on our complex and partially known body functions. The active spike protein has caused many and still poorly known pathological effects on numerous vaccinated people, with light to serious adverse reactions or even *deaths, sensibly higher than using traditional vaccines* (Bellavite et al., 2023; Alibardi, 2023). We do not know the potential damage derived from *other active viral proteins induced by next viral RNA-DNA based vaccines* (Fig. 5). This information requires years of independent, public scientific study and evaluation, not derived from few months or 1 year of research conducted by Pharma industries, organizations that primarily search for profits, their natural goal, before pure knowledge. RNA-DNA vaccines production and mass vaccination should be stopped, and a long experimentation should be done in 10-20 years to come if these vaccines are really indicated as the *future of vaccination*.

5. Conclusions

As indicated above, a scientific-driven and logical approach to make lasting and effective vaccines would be to neutralize first of all the *least changing viral proteins* together those that change frequently such as the HA and spike proteins, and not *only or exclusively* neutralize the more changing proteins. A number of proteins are present inside and on the surface of viruses aside those that binds to cell receptors (Brock and Madigan, 1991; Chaudhary et al., 2021; Chavda et al., 2022; Fig. 1), and they can be tagged by antibodies derived from polyvalent vaccinations. This is how our natural immune system works and *a fair medical system should mimic* what has evolved in nature during million years of evolution. The production of monovalent instead of polyvalent vaccines does not follow a scientific purpose and determines *the continuous selling of new, temporarily working vaccines* offered against new virus variants *every 6-12 months*. These vaccinations provide little help to stop for long periods or permanently viral epidemics. In fact, monovalent vaccines, as typical for flue or covid19 vaccines, do not last that few months since the HA-protein of the influenza virus or the spike protein for Covid19 have changed (following their gene mutation) in the meantime. The new variants are likely also selected from these monovalent vaccines that neutralize only the dominating variant that is present in a certain season, *allowing the survival and therefore the selection of other variants* for future infections, and requiring more new vaccinations. Instead, vaccination like natural immunization should be lasting for the benefit of people. Differences between RNA-viral infections indicated above, and immune reactivity with RNA-biotech vaccines indicate that the latter need many years ahead of scientific-medical research and evaluation.

In conclusion, the numerous researches presently conducted on future vaccines where

sophisticated biotech modifications are experimented should avoid to consider the *human body as a test tube* (Chaudhary et al., 2021; Chavda et al., 2022). The science in these laboratory biotechnological studies is high, but these researchers do not know the body reactions to biotech-RNA-DNA because they *have not generated* the human body and cannot know the entire complexity of its functions. The latter instead derives from million years of progressive, step by step evolution through trials and errors. Some problems with modern vaccines are here summarized: a) RNA-DNA degradation (Fig. 2 C, D) should be eliminated and these vaccines proved safe; b) lasting RNA-DNA vaccines should be made to produce many antigens, not only one protein, the spike or few others; c) RNA-DNA vaccines do not repeat the viral cycle as they release active proteins that can produce pathological effects, and this should be predicted through long studies; d) the random incorporation of RNA-DNA in various cells generate exposed spikes that elicits autoimmunity, and this event should be eliminated, e) the cellular impact on RNA recombination, possible DNA insertions and blocking DNA repair mechanisms within cells must be known before using RNA or DNA vaccines, f) polyvalent vaccines, produced through biotechnological procedures on all or most viral proteins, avoiding using past in-vivo sources (eggs, cell cultures etc.), are probably the best vaccines to use in future after some reasonable period of experimentation. Therefore, the safe utilization of these vaccines requires many years of scientific investigation before they can be commercialized, and some ongoing experimentation is trying to clarify (Chaudhary et al., 2021; Chavda et al., 2022; Kim et al., 2022). The production of lasting vaccines *should be the main goal of Pharma industries*, and the use of protein-based vaccines would really provide lasting benefits on people's health in the present time.

Acknowledgments

Study conducted in the Comparative Histolab, Padova, Italy. I greatly appreciate some colleagues discussion on the topic.

Authors contributions

Dr. L. Alibardi was responsible for study design and conducting research, data collection, drafting the manuscript and revising it. The author read and approved the final manuscript.

Funding

The Comparative Histolab, Padova, Italy, funded the study.

Competing interests

The author declares that he has no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Informed consent

Obtained.

Ethics approval

The Publication Ethics Committee of the Macrothink Institute.

The journal's policies adhere to the Core Practices established by the Committee on Publication Ethics (COPE).

Provenance and peer review

Not commissioned; externally double-blind peer reviewed.

Data availability statement

The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy or ethical restrictions.

Data sharing statement

No additional data are available.

Open access

This is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Copyrights

Copyright for this article is retained by the author(s), with first publication rights granted to the journal.

References

- Acevedo-Whitehouse, K., & Bruno, R. (2023). Potential health risks of mRNA vaccine therapy: a hypothesis. *Medical Hypotheses*, 171, 111015. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2023.111015>
- Aichelburg, U. (1977). *Vita e morte dei microbi. (Life and death of microbes)*. Collana Aperta Mondadori, Milan, Italy.
- Alibardi, L. (2023). *The meaning of vaccination and RNA vaccines. Human so much can achieve as much as one knows (Significato della vaccinazione e vaccini a RNA. L'uomo tanto può quanto sa)*. Aracne Editrice, Rome, Italy.
- Bellavite, P., Ferraresi, A., & Isidoro, C. (2023). Immune response and molecular mechanisms of cardiovascular adverse effects of spike proteins from SARS-CoV-2 and mRNA vaccines. *Biomedicine*, 11, 451. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11020451>
- Brock, T. D., & Madigan, M. T. (1991). *Biology of microorganisms*. 6th Edition. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, USA.
- Chaudhary, N., Weissman, D., & Whitehead, K. A. (2021). Review. mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation. *Nature Reviews*, 20, 817-838. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00283-5>
- Chavda, V.P., Soni, S., Vora, L.K., Soni, S., Khadela, A., & Ajabiya, J. (2022).

mRNA-based vaccines and therapeutics for Covid-19 and future pandemics. *Vaccines*, 10, 2150. <https://doi.org/10.3390/vaccines10122150>

Curtis, H. (1965). *The Viruses*. The Natural History Press, New York, USA.

Danilova, N. (2006). The evolution of immune mechanisms. *Journal of Experimental Zoology*, 306B, 496-520. <https://doi.org/10.1002/jez.b.21102>

Freire, J. M., Santos, N. C., Veiga, A. S., Da Poian, A. T., & Castanho, M. (2015). Rethinking the capsid proteins of enveloped viruses: multifunctionality from genome packaging to genome transfection. *FEBS Journal*, 282, 2267-2278. <https://doi.org/10.1111/febs.13274>

Gambacorti-Passerini, C., & Aroldi, A. (2022). RNA-based vaccines against SARS-Cov-2: a word of caution and analysis of potential long-term adverse events. *Organisms*, 5, 101-104.

Jang, H., & Mey, Y. F. (2021). Sars-Cov2-spike impairs DNA damage repair and inhibits V (D) J recombination in vitro. *Viruses*, 13, 2056. <https://doi.org/10.3390/v13102056>

Khalil, A. M. (2020). The genome editing revolution: review. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18, 68. <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00078-y>

Kim, S. C., Sekhon, S. S., Shin, W. R., Cho, B. K., Ahn, J. Y., & Kim, Y. H. (2022). Modifications of mRNA vaccine structural elements for improving mRNA stability and translation efficiency. *Molecular and Cellular Toxicology*, 18, 1-8. <https://doi.org/10.1007/s13273-021-00171-4>

Krupovic, M., & Koonin, E. V. (2017). Multiple origins of viral capsid proteins from cellular ancestors. *PNAS* E2401-E2410. <https://doi.org/10.1073/pnas.1621061114>

Pardi, N., Hogan, M. J., Porter, F. W., & Weissman D. (2018). mRNA vaccines. A new era in vaccinology. *Nature Reviews on Drug Discovery*, 17, 261-279. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.243>

Petit, C., & Longo, G. (2023). The Pandemic and the Techno-fix. *Organisms*, 6, 23-39.

Schoenmaker, L., Witzigmann, D., Kulkarni, J. A., Verbeke, R., Kersten, G., Jiskoot, W., & Crommelin, D. J. A. (2021). Review. mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccine: structure and stability. *International Journal of Pharmacology*, 601, 120586. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120586>

Seneff, S., Nigh, G., Kyriakopoulos, A.M., & McCulloch, P. A. (2022). Innate immune suppression by SARS-COV-2 mRNA vaccination: the role of G-quadruplexes, exosomes, and micro-RNAs. *Food and Chemical Toxicology*, 164, 113008. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113008>

Simon, A. K., Hollander, G. A., & McMichael, A. (2015). Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. *Proceedings of the Royal Society B*, 282, 20143085. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.3085>

Sompayrac, L. (2012). *How the Immune system works*. John Wiley & Sons.

-
- Tinari, S. (2021). The EMA Covid-19 data leak, and what it tells us about RNA instability. *British Medical Journal*, 372, n627. <https://doi.org/10.1136/bmj.n627>
- Wong, S. S., & Webby, R. J. (2013). Traditional and new influenza vaccines. *Clinical and Microbiological Reviews*, 26, 476-492. <https://doi.org/10.1128/CMR.00097-12>
- Zhou, W., Jang, J., Liao, S., Wu, F., Yang, W., Hou, L., ... & Zhang, Y. 2023. Vaccines' new era-RNA vaccine. *Viruses*, 15, 1760. <https://doi.org/10.3390/v15081760>

Alcune differenze tra i vaccini a base di RNA e le infezioni virali a RNA e la reattività immunitaria

Lorenzo Alibardi

Histolab Comparato Padova, Italia; PAM, Dipartimento di Biologia, Università di Bologna, via Selmi3, 40126, Bologna, Italia

E-mail: lorenzo.alibardi@unibo.it

Ricevuto: 23 dicembre 2024

Accettato: 30 gennaio 2025

Pubblicato: 11 febbraio 2025

doi:10.5296/jbls.v16i2.22643

URL: <https://doi.org/10.5296/jbls.v16i2.22643>

Astratto

Vengono presentate brevemente alcune differenze fondamentali tra le infezioni da RNA-virus e le reazioni immunitarie suscitate dopo l'iniezione di brevi sequenze virali di RNA o DNA biotecnologico modificato, sulla base di conoscenze consolidate sui virus e sull'immunologia. La reattività agli RNA biotecnologici fabbricati è relativamente nota e controllata all'interno delle provette. Al contrario, le interazioni tra i vaccini biotech-RNA-DNA modificati inoculati nel corpo umano e le loro funzioni complesse e incompletamente conosciute sono imprevedibili. Affermare il contrario indica che la tecnologia attuale pretende di sapere tutto su come il corpo umano reagisce all'inoculazione di questi vaccini a RNA-DNA, una convinzione scientifica insostenibile. Reazioni patologiche sconosciute potrebbero essere generate da RNA biotecnologici utilizzati come vaccini, a livello cellulare e organismico, come ha dimostrato la proteina spike attiva del virus SarsCov2, generando molti più effetti avversi rispetto ai vaccini precedentemente utilizzati. Il presente breve documento, di contenuto teorico generale, evidenzia alcune delle principali differenze biologiche presenti tra i vaccini tradizionali, basati su virus attenuati o sulle loro proteine, e i vaccini a RNA-DNA, basati su RNA modificati corti e specifici somministrati in modo casuale o su DNA trasportati dal virus. Mentre i vaccini a base di proteine iniettano proteine inattive con un breve turnover per la degradazione, i vaccini a base di RNA-DNA danno origine a proteine attive e patogene con un turnover certificato sconosciuto. Inoltre, le sequenze nucleotidiche biotecnologiche modificate possono penetrare in numerosi tipi di cellule in diversi organi, generando proteine spike, autoimmunità e potenziali alterazioni genetiche ancora da valutare negli anni futuri. La somministrazione di vaccini a RNA-DNA appare come un trattamento sperimentale con conseguenze sconosciute a breve e lungo termine su milioni di persone, e sono necessari molti anni di sperimentazione prima che il loro uso possa diventare una pratica medica comune.

Parole chiave: RNA-vaccino, infezione virale, rilascio di proteine, monoclonale, policlonale, reazione immunitaria

1. Introduzione alle funzioni virali e immunitarie in generale

Il presente documento, di carattere generale, si basa su informazioni di base su ciò che attualmente sappiamo sulle infezioni virali e sull'immunità, con considerazioni sulle moderne vaccinazioni. I virus sono particelle biochimiche delle dimensioni di 30-300 nm contenenti RNA o DNA, poche proteine strutturali e funzionali e talvolta lipidi, e si comportano come *parassiti genetici delle cellule* (Curtis, 1965; Brock e Madigan, 1991). Durante un'infezione virale, l'RNA o il DNA virale entrano nelle cellule e si replicano dando origine a milioni di particelle virali pronte a infettare altre cellule. Questo avviene perché l'RNA o il DNA virale contiene informazioni (geni) che impediscono in modo specifico ai ribosomi della cellula infetta di tradurre i propri mRNA, mentre traducono principalmente o esclusivamente gli RNA o i DNA virali. Questo meccanismo consente un'elevata produzione di proteine virali e di nuovi RNA o DNA virali e del relativo virus. I nuovi *virus generati sono completi*, comprese le proteine interne ed esterne utilizzate per legarsi e penetrare nelle cellule (spikes; vedi Freire et al., 2015; Krupovic e Koonin, 2017). La maggior parte di queste proteine *rimane attaccata* al resto del virus, nel capsido o nel nucleo virale, compreso lo spike, e non viene rilasciata al di fuori delle cellule. Il rilascio di proteine virali durante il ciclo virale, anziché di virus completi, distribuirebbe le proteine dello spike nei fluidi corporei e potenzialmente limiterebbe le infezioni di altre cellule da parte nuovi virus, poiché gli spike liberi potrebbero competere con i virus completi per l'attacco ad altre cellule. Al contrario, quando solo le proteine spike sono prodotte in grandi quantità da un vaccino RNA-DNA (Chaudhary et al., 2021; Chavda et al., 2022), queste sono le uniche molecole che possono uscire dalle cellule infette. Le proteine spike o i loro frammenti vengono rilasciati tra le cellule come *proteine solubili* e circolano in diverse regioni del corpo dove possono attivare funzioni patologiche, come osservato per lo spike Covid19 (Gambacorti-Passerini e Aroldi, 2022; Acevedo-Whitehouse e Bruno, 2023; Bellavite et al., 2023). Come vedremo in seguito, le caratteristiche fondamentali di un ciclo virale infettivo, la produzione di un virus completo, oltre ad altre, *non sono soddisfatte* nei vaccini a base di RNA in cui il ciclo virale è alterato (Alibardi, 2023).

Il sistema immunitario, innato e adattativo, si è progressivamente evoluto per preservare il sé biologico dei nostri corpi multicellulari, compresa la *lotta contro le infezioni virali* (Danilova, 2006; Sompayrac, 2012; Simon et al. 2015). Questa difesa avviene attraverso la produzione di *numerosa varietà di cellule immunitarie e anticorpi* che neutralizzano in modi diversi i virus che invadono il nostro corpo. Attraverso un complesso meccanismo di *rimescolamento dei geni*, il nostro sistema immunitario è in grado di produrre oltre 500 milioni di anticorpi diversi, capaci di circolare *all'interno del nostro corpo* (IgM, IgG, IgE) e di *rivestire le superfici mucose* di naso, polmoni, intestino e condotti genitali (IgA). La produzione di molti tipi diversi di cellule immunitarie e anticorpi (*immunità policlonale*), potenzialmente in grado di marcare qualsiasi tipo di proteine virali (antigeni), determina il successo dell'immunizzazione e ha permesso all'uomo di *sopravvivere durante milioni di anni* di evoluzione biologica. Per la maggior parte dei tipi di virus (raffreddore, vaiolo, varicella, febbre gialla, morbillo, influenza, rosolia, parotite, SarsCov2 ecc.), vengono prodotti tipi multipli e specifici di anticorpi diretti verso tutte le varietà di proteine virali penetrate nell'organismo.

L'immunizzazione che ne deriva ci protegge da future infezioni dello stesso virus per *diversi anni*.

anni o addirittura in modo permanente. Un'immunità duratura deriva probabilmente dalle *successive esposizioni occasionali* dell'organismo agli stessi virus nel corso della vita, esposizioni che mantengono attivo il nostro sistema immunitario. Ciò è dimostrato anche dalla presenza nel nostro corpo di organi linfoidi sviluppati come linfonodi, milza e timo. Infatti, negli animali tenuti in ambienti sterili o negli esseri umani nati con deficit immunologici come l'agammaglobulinemia o l'immunodeficienza grave, e tenuti in ambienti sterili in cui non viene suscitata alcuna reattività immunitaria, *gli organi linfoidi sono assenti o non sviluppati.* La presenza di questi organi linfoidi nel nostro corpo è quindi la prova di un'esposizione continua e variabile ai microbi, compresi i virus. Una volta che una persona è guarita naturalmente da una malattia infettiva, diventa *definitivamente immune o comunque protetta per diversi anni* da quella malattia, e può essere colpita leggermente dalla stessa infezione virale solo in rare circostanze (immunodepressione, altre malattie in corso, squilibri alimentari, abbassamento dell'immunità durante l'invecchiamento ecc.)

Il processo di evoluzione biologica, in cui ogni nuova funzione immunologica è stata costruita in sequenza, aggiungendo nuove capacità ai meccanismi immunitari precedentemente stabiliti, è stato *perfezionato nel corso di milioni di anni*, dando origine a organismi adattati a contrastare efficacemente la maggior parte dei virus. Una reazione immunitaria naturale non è limitata a *1-2 antigeni virali come i moderni vaccini*, ma è invece potenzialmente diretta contro *tutti gli antigeni virali*, fornendo efficienza e *generando una protezione immunitaria duratura* negli organi interni e nelle superfici delle mucose. Di conseguenza, *nessun intervento medico può essere più efficace del nostro sistema immunitario naturale policlonale.* Infatti, mentre una lunga evoluzione biologica ha proceduto gradualmente affrontando molteplici stimoli che hanno adattato il nostro corpo alla maggior parte dei virus, gli interventi medici immunologici progrediscono empiricamente, secondo il livello di conoscenza conosciuto nel suo breve periodo di storia, pochi secoli (vedi oltre).

Solo in pochi ma drammatici casi (vaiolo, rabbia, ebola, febbre gialla, AIDS ecc.), l'elaborato sistema immunitario adattativo finora evoluto *reagisce troppo lentamente* per evitare queste malattie e, a volte, persino la morte (Brock e Madigan, 1991). Quest'ultima, in particolare per le infezioni virali trasmesse per via aerea, malattie tipiche dei vertebrati che hanno colonizzato la terraferma durante i diversi periodi del Paleozoico, è tuttavia generalmente dovuta a infezioni batteriche secondarie, come la polmonite, e non al virus stesso. Tuttavia, per la maggior parte delle infezioni virali, con un basso livello di letalità nelle persone sane e normali (varicella, rosolia, morbillo, parotite, malattia del Nilo occidentale, faringite adenoma, ecc.), l'organismo reagisce bene con una sofferenza di lieve entità e la persona *diventa quasi permanentemente immune* o guarita da queste malattie virali. Per altre malattie, come il raffreddore e l'influenza, l'immunità non è duratura a causa dell'alto tasso di mutazione in particolare delle proteine spike/esterne che interagiscono con i recettori cellulari dell'ospite. Per i virus influenzali queste continue generazioni di varianti derivano da processi combinatori tra RNA frammentati di diversi mutanti/varianti (Brock e Madigan, 1991). Questo è il motivo per cui, per realizzare vaccini antinfluenzali duraturi, si dovrebbero selezionare multipli di altri antigeni influenzali (altre proteine virali). Per il covid19, finora non sono disponibili informazioni sufficienti su un'immunità duratura, anche se gli individui immunizzati naturalmente (guariti) sono meglio o ugualmente protetti con un'immunità più lunga rispetto alle persone vaccinate con RNA o DNA.

vaccini. A causa della loro immunizzazione naturale policlonale, è probabile che le persone vaccinate Covi19 siano anche più protette dalle nuove varianti rispetto a quelle vaccinate solo contro la proteina spike (immunizzazione monovalente), ma sono stati pubblicati pareri contrastanti e le prove di laboratorio definitive sono al momento inconcludenti.

Come per altre infezioni virali, anche per le varianti del virus sarsCov2 devono essere prodotti vaccini policlonali che tagghino le altre proteine virali, a parte lo spike (Fig. 1).

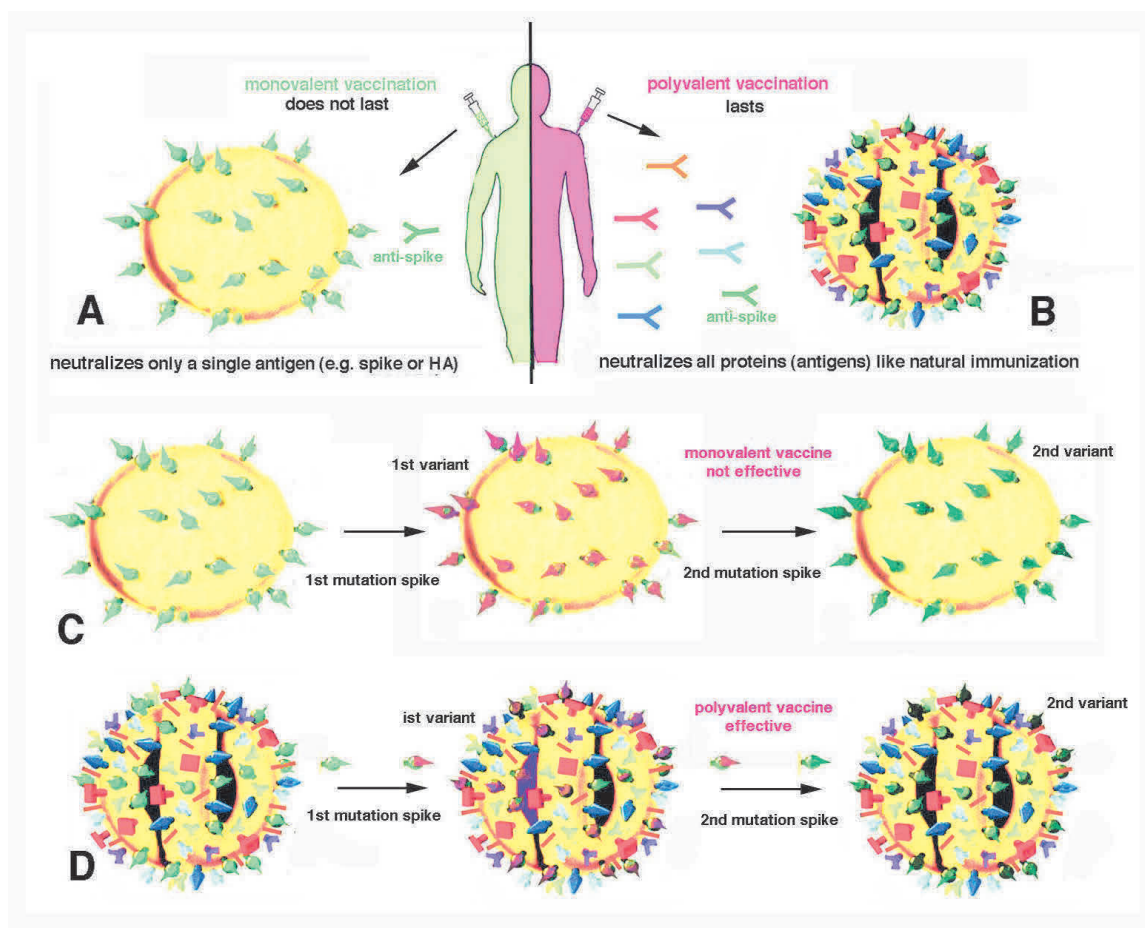


Fig. 1. Confronto tra una vaccinazione monovalente e una polivalente **A**, solo una proteina (ad esempio, lo spike) viene neutralizzata dagli anticorpi anti-spike. **B**, vengono prodotti numerosi anticorpi (7 qui mostrati, compresi quelli anti-spike). **C**, una vaccinazione monovalente stimola solo la produzione di proteine anti-spike, poiché il virus sarebbe coperto solo dallo spike. Mutazioni dello spike ridurrebbero o abolirebbero completamente qualsiasi protezione immunitaria. **D**, una vaccinazione polivalente stimola invece la produzione di numerosi anticorpi (reazione policlonale, solo 7 sono qui mostrati) che neutralizzano la maggior parte o tutti gli antigeni (con forme e colori diversi) in modo che la protezione duri per la prima variante, la seconda variante e le varianti successive.

Al contrario, continuare a produrre vaccini per l'influenza o per il sarCov2, o per altri virus, etichettando solo le proteine virali esterne e più modificate (dalle mutazioni) che sono ligandi

dei recettori cellulari, appare una procedura poco guidata dal punto di vista scientifico. Si suggerisce qui che le oltre 100 varianti del virus dell'influenza e le 6-8 varianti di sarsCov2 finora

noti, e nuovi generati ogni 6-12 mesi, potrebbe dipendere anche dalla selezione delle varianti derivate dall'uso dei moderni vaccini monovalenti. Questi ultimi, pur contrastando la variante principale di un certo anno, permettono la sopravvivenza e la selezione delle altre varianti generate in quello specifico anno che infetteranno le persone negli anni successivi (Alibardi, 2023).

In conclusione, poiché il sistema immunitario ha evoluto reazioni policlonali che ci salvano continuamente la vita, è logico prevedere che qualsiasi *procedura medica volta a immunizzare permanentemente* le persone da infezioni potenzialmente pericolose debba seguire le regole naturali dei cicli virali (*non liberare proteine virali funzionalmente attive*) e quelle del sistema immunitario attivato (*suscitare un'immunità policlonale*; Fig. 1 A, B). L'immunità policlonale o naturale colpisce le varianti virali perché questa vaccinazione etichetta molti antigeni virali mutati (da mutazioni) e non mutati e, sebbene alcuni antigeni cambino a causa di mutazioni genomiche, la maggior parte degli altri rimane invariata, così che le vaccinazioni polivalenti danno una protezione duratura (Fig. 1 C, D). Purtroppo, da molti anni queste indicazioni scientifiche non vengono seguite dalle industrie farmaceutiche, che producono e vendono principalmente nuovi vaccini monovalenti.

2. Vaccinazione e vaccini tradizionali

L'intuizione, dovuta principalmente a Edward Jenner nel 1796, che la protezione dalla malattia letale o devastante del vaiolo umano (40-80% di letalità in età avanzata), mediante l'induzione dell'immunità utilizzando un'infezione di vaiolo bovino, ha aperto la strada alla vaccinazione (Curtis, 1965; Aichelburg, 1977). L'immunità conferita derivava dalla *somiglianza antigenica* del virus della mucca con quello umano (entrambi virus del vaiolo) che immunizza e previene il vaiolo umano. Utilizzando questa procedura medica, in passato sono state controllate o addirittura cancellate altre gravi malattie virali come la rabbia, la febbre gialla, la febbre catarrale, la poliomielite, l'epatite B, l'ebola, ecc. Si è appreso che la scarificazione, l'iniezione o la somministrazione orale di virus inattivati, delle loro proteine o di virus attenuati non in grado di dare origine alla malattia ma che *conservano la capacità immunogena*, potevano evitare la grave infezione, fornendo un'immunità duratura. La vaccinazione è stata ed è una *straordinaria conquista della medicina* e ha salvato milioni di persone, ma si tratta di un'*introduzione volontaria nell'organismo di persone sane* di virus inattivati o di loro antigeni per prevenire il rischio di infezioni gravi, non di affezioni minori, e che i benefici dovrebbero superare ampiamente i rischi di effetti negativi.

L'inattivazione delle proteine virali elimina qualsiasi effetto patogeno, ma mantiene l'immunogenicità della proteina denaturata iniettata (Fig. 2 A). Al contrario, la vaccinazione con RNA o DNA *dà origine a proteine attive* la cui interazione con le funzioni dell'organismo è *sconosciuta o addirittura patogena* (Wong e Webbing, 2013; Gambacorti-Passerini e Aroldi, 2022; Bellavite et al., 2023; Fig. 2 B).

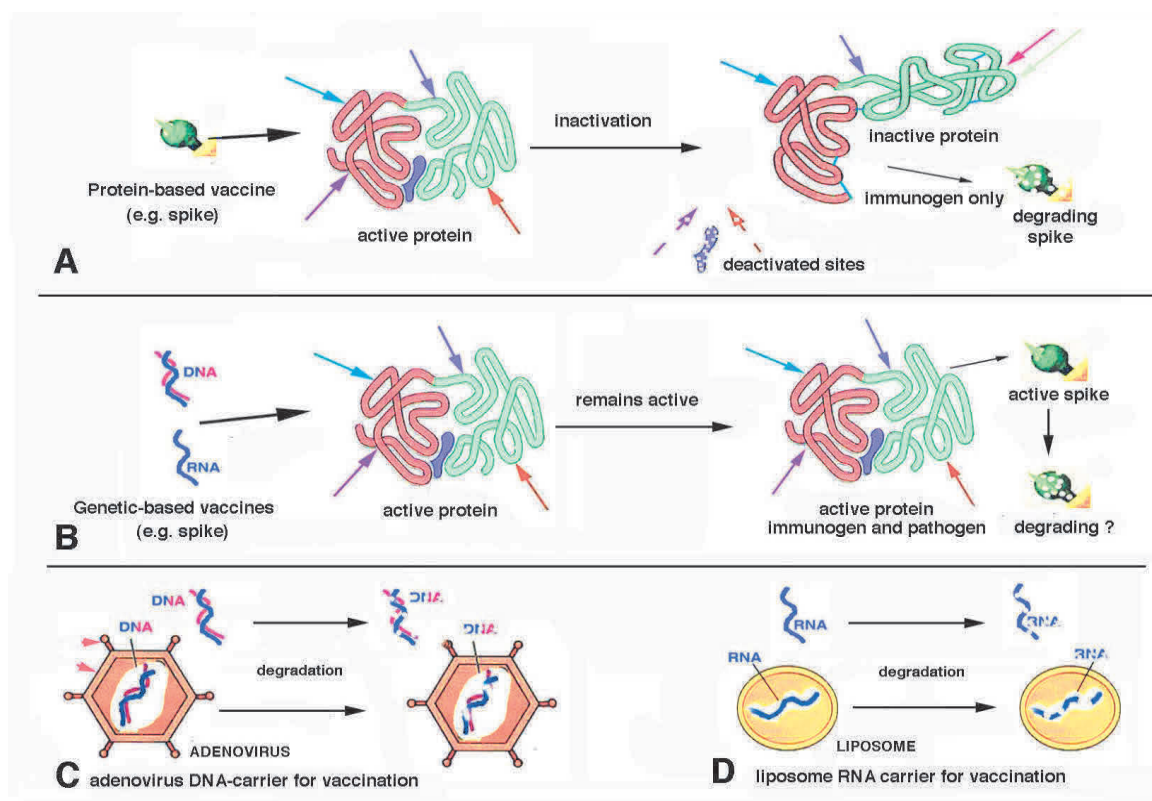


Fig. 2. Differenze tra un vaccino a base di proteine (A) e un vaccino genetico (B), e vettori biotecnologici di RNA o DNA (C, D). A, l'inattivazione della proteina antigenica (le frecce indicano alcuni epitopi marcati) dà origine a una proteina denaturata che ha perso alcuni siti epitopici, formato altri epitopi e cambiato conformazione. La proteina inattiva, tuttavia, mantiene alcuni degli epitopi immunogenici precedenti e nuovi (frecce o a destra) e viene rapidamente degradata. B, al contrario, i vaccini genetici producono una proteina spike che rimane attiva e viene rilasciata in diversi tessuti o circola nel sangue, innescando l'immuno-stimolazione ma anche reazioni patologiche sconosciute. Il tempo di degradazione dell'RNA del vaccino e della sua proteina spike attiva non è noto (?). C, vettore virale di una sequenza DNA-vaccino con possibile frammentazione e degradazione del DNA durante la vaccinazione di massa. Le frecce rosse indicano che anche le proteine del capsido possono produrre effetti patogeni. D, vettore liposomico di RNA-vaccino con possibile frammentazione e degradazione dell'RNA durante la vaccinazione di massa.

Le vaccinazioni tradizionali inizialmente imitavano il più possibile l'intero potenziale immunogenico dei virus, poiché veniva suscitata una reazione immunitaria policlonale, come per l'immunità naturale (Curtis, 1965; Aichelburg, 1977; Brock e Madigan, 1991; Wong e Webby, 2013; Fig. 1 B, D). Tuttavia, dopo la vaccinazione si possono attivare diverse *reazioni avverse dell'organismo*, in genere in pochissime persone, con conseguenze gravi e, raramente, persino la morte. Queste reazioni avverse dipendono dalle condizioni di salute individuali e anche dal tipo di vaccino utilizzato. Alcune delle conseguenze patologiche dei vaccini tradizionali derivano dalla *manca di purezza dei vaccini*, dall'inattivazione incompleta dei virus o da piccoli inquinamenti dovuti a sostanze indesiderate derivate dai processi di produzione virale. Le impurità contenevano residui cellulari o frammenti organici provenienti dal sistema di coltura cellulare in cui i virus venivano

prodotti in quantità elevata, o dalle uova di pulcino utilizzate per la lievitazione di un numero elevato di virus, e successivamente inattivati per la vaccinazione.

Per garantire la purezza di questi vaccini tradizionali, erano e sono necessarie procedure lunghe e noiose, grandi infrastrutture e attività costose che coinvolgono numerosi addetti, *grande investimento per qualsiasi azienda farmaceutica* o istituzione di igiene pubblica. Tuttavia, negli ultimi 40-50 si è cercato di migliorare le tecnologie per la produzione sicura dei vaccini tradizionali. In particolare attraverso la *produzione biotecnologica di proteine virali* di sequenza aminoacidica nota in quantità e purezza elevate, proteine che possono essere *inattivate e utilizzate come vaccini polivalenti*. Ciò significa che la maggior parte delle proteine virali può essere utilizzata come antigene in modo che i numerosi anticorpi prodotti in seguito alla vaccinazione leghino e neutralizzino tutte o la maggior parte delle proteine virali. Nel caso in cui si verifichi un'infezione con lo stesso virus o con le sue varianti, il sistema immunitario suscita una forte reazione che determina un'ampia protezione anche contro le varianti o addirittura un'*immunità completa e duratura*, come per l'immunità naturale (Alibardi, 2023). Per quanto è noto, le proteine inattivate iniettate come vaccini *non si replicano, non penetrano nelle cellule ma rimangono extracellulari, non producono altri effetti fisiologici a parte l'immunizzazione* e vengono degradate entro 1-3 settimane. Durante questo periodo, le proteine virali inattivate (antigeni) vengono fagocitate da "cellule presentanti l'antigene" (cellule APC) distribuite in diversi organi corporei e i peptidi derivati vengono presentati ai linfociti all'interno degli organi linfoidi dove stimolano risposte immunitarie policlonali.

Invece di seguire questo principio immunologico generale, i vaccini moderni sono prodotti solo *contro una o poche proteine virali o i loro epitopi più piccoli che si legano ai recettori cellulari* (ACE2 o altri), ad esempio l'emoagglutina (HA) per i virus influenzali o la proteina spike per il virus Sars-cov2 (Wong e Webbing, 2013; Chaudhary et al., 2021; Chavda et al., 2022; Bellavite et al., 2023, Fig. 1 A, B). Lo scopo di questi vaccini monovalenti è quello di impedire l'attacco del virus ai nostri recettori cellulari attraverso l'HA o la proteina spike. I moderni vaccini che neutralizzano solo un singolo antigene virale, ad esempio l'HA di specifici virus influenzali o la proteina Spike delle varianti SarsCov2, durante un certo autunno-inverno, permettono alle altre varianti derivate dalle frequenti mutazioni di queste singole proteine di rimanere nell'ambiente anche nei successivi periodi di primavera-estate. Quando le condizioni stagionali cambiano nuovamente dall'estate all'autunno dell'anno successivo, queste nuove varianti, selezionate dai vaccini monovalenti, possono determinare un nuovo contagio. Pertanto, le epidemie sono limitate solo a quell'anno specifico grazie alla produzione e alla vendita di vaccini monovalenti, un processo produttivo continuo delle industrie farmaceutiche. Sarebbe scientificamente più corretto, e logico, utilizzare vaccini polivalenti invece di vaccini monovalenti per ottenere un'immunizzazione migliore e duratura. Pertanto, le varianti virali frequentemente generate (mutanti) per l'HA, lo spike o altre proteine virali verrebbero completamente o parzialmente *neutralizzate in seguito a una vaccinazione policlonale*, poiché anche gli antigeni invariati rimanenti vengono neutralizzati dall'immunità derivata da queste vaccinazioni (Fig. 1 C). Al contrario, come indicato in precedenza, le vaccinazioni monovalenti *oggi utilizzate di routine* contribuiscono probabilmente alla continua *selezione di nuove varianti virali*, poiché questi vaccini colpiscono solo la variante di un certo mese o anno, consentendo la continua produzione e permanenza di nuove varianti che genereranno le prossime epidemie stagionali di influenza, covid19 o altre infezioni virali.

(Alibardi, 2023, vedi oltre). L'immunizzazione contro una-due proteine è *innaturale e apparentemente illogica*, anche considerando che si tratta delle proteine che cambiano più frequentemente (mutano) nel virus (HA e spike). Pertanto, la logica e la conoscenza scientifica dovrebbero produrre vaccini contro le proteine virali che cambiano meno, non contro quelle che cambiano più frequentemente in seguito a mutazioni genetiche. Il cambiamento di queste proteine virali esterne fa sì che i virus mutati (varianti) possano infettare le nostre cellule attraverso nuove proteine leganti, mentre gli anticorpi efficaci contro le proteine virali leganti iniziali risultano inefficaci (Alibardi, 2023). In conclusione, i moderni vaccini monovalenti *non durano* finché vengono prodotti e venduti dalle industrie farmaceutiche a ogni nuova esplosione epidemica.

3. Alcune differenze tra le infezioni da RNA virale e quelle da RNA-vaccini

Lo sviluppo della manipolazione molecolare dei geni, sia delle sequenze di RNA che di DNA, negli ultimi 30-40 anni è ormai diventato una routine (Brock e Madigan, 1991; Khalil, 2020). Le principali aree di applicazione medica sono le terapie geniche, la produzione di piante e animali transgenici, i tentativi di curare le menomazioni genetiche, l'uso di virus per esperimenti di trasfezione genica e, recentemente, anche la *produzione di vaccini basati su RNA o DNA virale* (Pardi et al., 2018; Zhou et al., 2023). Quest'ultima tecnologia, indicata come il *futuro della vaccinazione*, induce la produzione di antigeni virali nell'organismo, dopo l'iniezione di parti di RNA o DNA virale che codificano per questi antigeni (Chaudhary et al., 2021; Chavda et al., 2022). La produzione degli antigeni virali (ad esempio lo spike) è completamente a carico dei *pazienti, le nuove fabbriche per la produzione degli antigeni virali*, ed elimina la complessa e costosa produzione dei vaccini tradizionali realizzati dalle *industrie farmaceutiche* che "solo" sintetizzano sequenze di RNA o DNA a costi relativamente bassi utilizzando le moderne piattaforme biotecnologiche.

Tuttavia, sono presenti *numerosissime differenze* tra l'infezione virale naturale e l'infezione da RNA o DNA biotecnologico indotta con questo tipo di vaccinazione (Gambacorti-Passerini e Aroldi, 2022; Petit e Longo, 2023; Alibardi, 2023). La capacità tecnica delle operazioni di ingegneria genetica in provetta e degli esperimenti di laboratorio è *stata equiparata a quella dei vaccini a RNA-DNA*, indicando che ci sono stati 20-30 anni di esperienza nell'uso di vaccini a RNA-DNA. Questo tipo di affermazioni è insostenibile, poiché manipolare RNA o DNA per esperimenti di laboratorio, per scopi agronomici o per la terapia o l'editing genico, non è uguale a manipolare RNA o DNA per la vaccinazione sull'uomo. *Gli esseri umani non reagiscono come provette*, ma questo sembra essere trascurato dai produttori di vaccini a RNA-DNA. In quest'ultimo caso *non erano e non sono disponibili prove sperimentali, evidenze ed esperienze* per i vaccini a RNA o DNA prima del loro utilizzo per la vaccinazione di massa nel 2020-2024. Non è stata una seria valutazione scientifica del rapporto rischi/benefici e delle conseguenze dell'inoculazione di materiale genetico in corpi umani parzialmente conosciuti e complessi, e questi studi sono ancora in corso (Chaudhary et al., 2021; Chavda et al., 2022; Bellavite et al., 2023). Il materiale genetico come l'RNA o il DNA non è come qualsiasi altro farmaco utilizzato in precedenza, perché queste molecole determinano i processi cellulari di base e le interazioni ancora incompletamente conosciute e sono principalmente informazioni accademiche, con possibili rischi sconosciuti nelle loro applicazioni mediche e nella trasmissibilità alle generazioni successive. Di conseguenza, l'uso indiscriminato di vaccini a RNA-DNA appare, anche oggi, una sperimentazione di massa. Inoltre, la somministrazione di RNA biotecnologici o di DNA all'interno di virus vettori o liposomi per la vaccinazione di massa, al di fuori di

l'ambiente di controllo del laboratorio, non può garantire che queste molecole genetiche *rimangano integre* (Fig. 2 C, D). DNA o RNA frammentati potrebbero produrre effetti sconosciuti sull'organismo, probabilmente patogeni (Tinari et al., 2021; Zhang et al., 2021; Schoenmaker et al., 2021; Seneff et al., 2022). Mentre l'evoluzione biologica dei meccanismi immunitari è avvenuta passo dopo passo, qualsiasi novità tecnologica basata su una conoscenza parziale ed empirica introduce in meccanismi corporei complessi, consolidati da una lunga evoluzione, interazioni imprevedibili che molto probabilmente danno origine a condizioni patologiche.

Quando un virus entra nell'organismo e supera le molteplici barriere fisiche e chimiche, nonché le cellule immunitarie innate (fagociti come granulociti e macrofagi), le particelle virali penetrano nelle cellule di organi specifici o preferiti, in seguito al riconoscimento dei loro recettori (polmoni, fegato, sistema nervoso ecc.; Fig. 3 A).

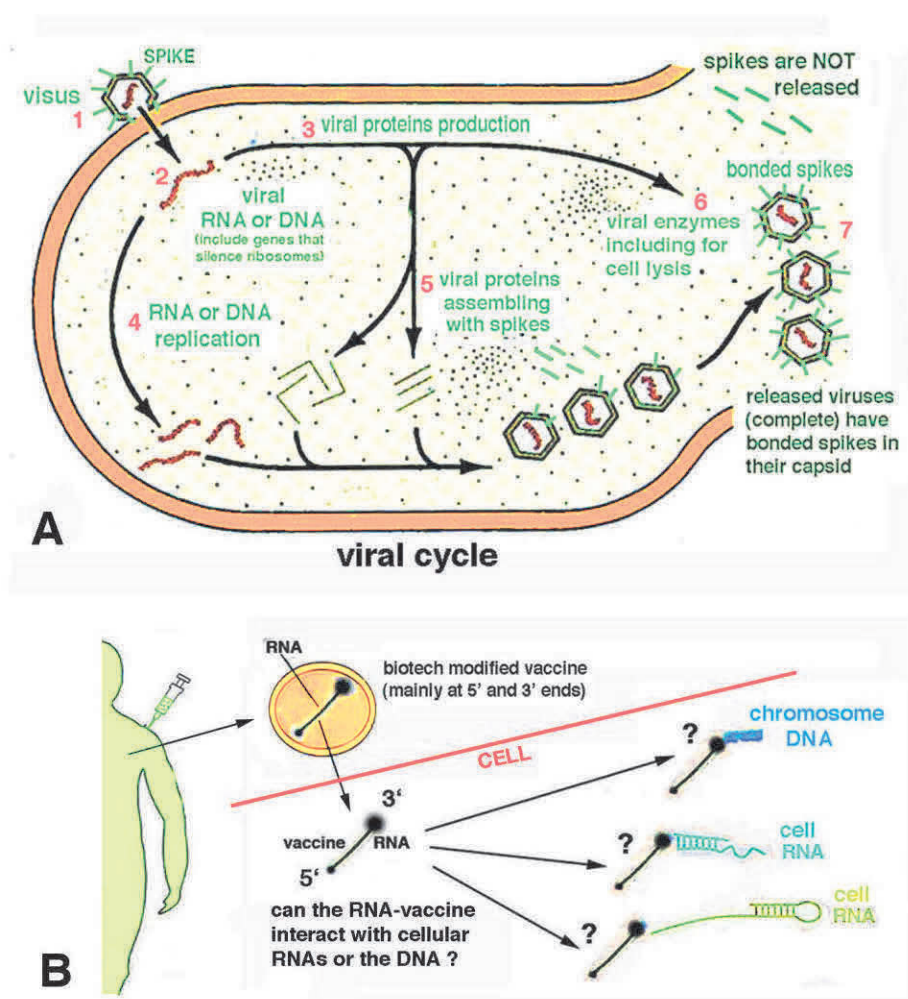


Fig. 3. Ciclo virale classico (A) e potenziali interazioni vaccino biotecnologico-RNA all'interno delle cellule. **A**, dopo l'infezione virale, le nuove particelle virali vengono rilasciate complete, con le punte attaccate al capsido, non rilasciate come proteine di punta solubili. **B**, dopo l'iniezione e la penetrazione dell'RNA-vaccino (barra nera con le principali modifiche alle estremità nucleotidiche 5' e 3' dell'RNA) in varie cellule, le potenziali interazioni (?) con gli RNA o il DNA cellulari rimangono sconosciute a causa della conoscenza incompleta di tutte le funzioni cellulari.

Molti virus diversi possiedono tropismi organo-cellulari specifici (pelle, intestino, polmoni, ghiandole, cervello ecc.) e *non infettano nessun tipo di cellula* presente nell'organismo, limitando l'estensione dell'infezione. Ciò non avviene utilizzando vaccini contenenti RNA per picchi che, a parte la loro stabilità sconosciuta nel sangue o nei fluidi intercellulari, non mirano a cellule specifiche ma sono potenzialmente *incorporati a caso in tutte le cellule che incontrano* (Schoenmaker et al., 2021; Chaudhary et al., 2021; Chavda et al., 2022; Bellavite et al., 2023). All'interno dell'organismo, i virus invasori vengono identificati attraverso specifici macrofagi o cellule dendritiche (APC, Antigen Presenting Cells) che attivano diversi tipi di linfociti (linfociti T helper e linfociti B). Quando i virus penetrano nelle cellule bersaglio, vengono individuati e successivamente distrutti da macrofagi e linfociti specifici (cellule T-citotossiche) che controllano la superficie cellulare di queste cellule infette. Entrambi i meccanismi, extracellulare (produzione di anticorpi) e intracellulare (infezione virale), danno origine ad ampie *risposte immunitarie policlonali e alla memoria immunitaria*, poiché vengono prodotti numerosi cloni diversi di linfociti che neutralizzano la maggior parte o tutti gli antigeni virali all'interno e sulle superfici mucosali, *non solo uno o due antigeni come i moderni vaccini* (Sompayrac, 2012; Fig. 1 D).

Al contrario, quando un semplice ma alieno biotech-RNA-DNA viene iniettato nel corpo, il *ciclo virale viene modificato poiché* solo le proteine o i frammenti dello spike vengono rilasciati all'interno e all'esterno cellula, ma non l'intero virus (Fig. 3 A-B). Lo spike intracellulare può interagire con il DNA dei cromosomi durante la divisione cellulare, poiché in questa fase non è presente la membrana nucleare per 1-3 ore (Fig. 3 B, 4 A). Le proteine dello spike sono successivamente esposte sulla membrana cellulare associate a MHC I o II o diventano solubili nei fluidi biologici. Inoltre, questi RNA biotecnologici sono stati sottoposti a *una serie di modifiche chimiche* per renderli più stabili e duraturi, soprattutto nelle estremità nucleotidiche 5'- e 3'- e persino introducendo modifiche alle basi nucleotidiche (Pardi et al., 2018; Chaudhary et al., 2021; Chavda et al., 2022; Kim et al., 2022; Bellavite et al., 2023; Fig. 3 B). Le potenziali interazioni, il destino e la durata di questi RNA biotecnologici incorporati casualmente in molte cellule e organi senza alcuna specificità, nel complesso corpo umano, *sono sconosciuti*. Il corpo umano *non può essere trattato come una provetta*, poiché nessuno conosce tutte le funzioni e le interazioni delle sue cellule e dei suoi organi. Nessuno è in grado di prevedere o ha testato sperimentalmente le possibili interazioni con questi vaccini RNA-DNA all'interno dell'organismo (Gambacorti-Passerini e Aroldi, 2022; Alibardi, 2023; Fig. 3 B). Gli RNA biotecnologici modificati (o i DNA trasportati dai virus) *possono penetrare nel nucleo* e contattare il DNA genomico, soprattutto durante la metafase e l'anafase della divisione cellulare, quando la *membrana nucleare scompare per 1-3 ore* (Fig. 4 A). Questo processo potenzialmente pericoloso di penetrazione e interazione con il DNA si verifica in particolare negli organismi in cui miliardi di cellule si dividono, ossia negli *embrioni, nei feti e nei bambini*, a parte le cellule staminali dei tessuti in via di rinnovamento (pelle, intestino, midollo sanguigno ecc.) o nelle gonadi degli adulti (Alibardi, 2023; Fig. 4 B).

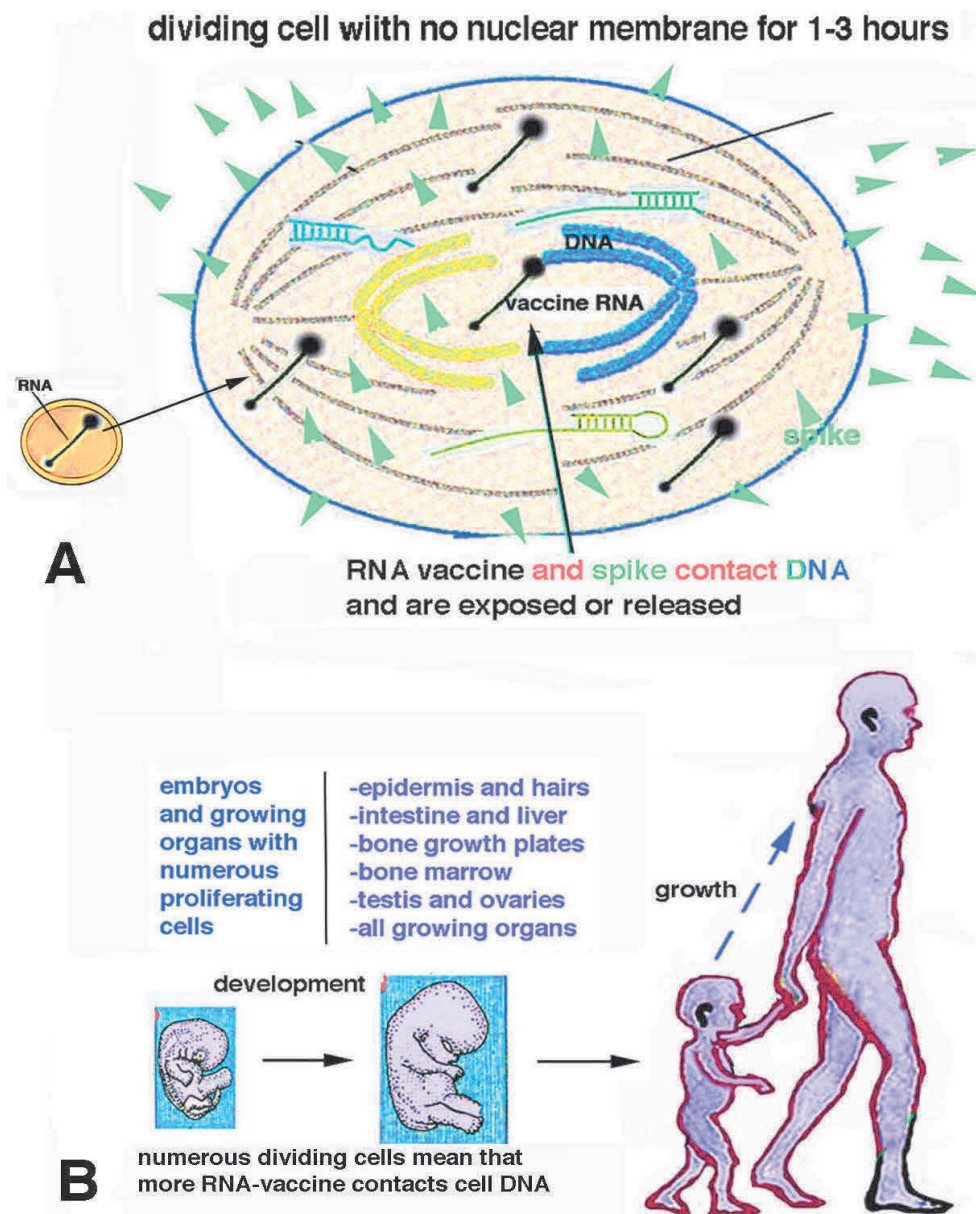


Fig. 4. Contatto dell'RNA vaccinale con i cromosomi (DNA) durante la mitosi (A) e conseguenze sconosciute su organismi contenenti molte cellule in divisione che possono incorporare un'elevata quantità di RNA biotecnologico (B). **A**, cellula in divisione contenente sia biotech-RNA sia le loro proteine spike codificate, distribuite nel citoplasma e nella regione nucleare a contatto con i cromosomi (DNA). Le proteine spike o i loro frammenti (peptidi) sono esposti sulla superficie cellulare o rilasciati a livello extracellulare. **B**, gli embrioni, i feti, i bambini in crescita e gli individui giovani contengono molte cellule in divisione, per cui l'assorbimento di biotecnologie-RNA o DNA è maggiore rispetto agli individui adulti o anziani completamente cresciuti, in cui è presente un numero inferiore di cellule in divisione. I principali tessuti colpiti sono quelli che si rinnovano fisiologicamente e alcuni sono indicati.

Mentre gli "*mRNA cellulari naturali*" non interagiscono con il proprio DNA, un meccanismo che è stato probabilmente "perfezionato" con altre funzioni cellulari durante gli 1-2 miliardi di anni di evoluzione delle cellule eucariotiche, le *potenziali interazioni e la ricombinazione degli RNA biotecnologici* con il DNA cellulare non sono state in grado di garantire la sicurezza delle cellule.

RNA, DNA o altre molecole *sono sconosciute* (Gambacorti-Passerini e Aroldi, 2022; Bellavite et al., 2023). Ancora una volta, il corpo umano *non può essere ridotto a una provetta* dove queste interazioni e ricombinazioni sono invece meglio conosciute, un approccio riduzionista che potrebbe generare esiti avversi o patologici in numerose persone (Petit e Longo, 2023).

Inoltre, senza altri geni per il silenziamento dei ribosomi cellulari come nei virus completi, le sequenze di RNA biotecnologico che contengono solo i nucleotidi per la produzione della proteina spike o il suo sito di legame ai recettori cellulari, probabilmente non possono produrre gli stessi alti livelli di antigene spike per l'immunizzazione come l'intero RNA di un virus sarsCov2 in un'infezione naturale. Anche se reso più stabile grazie alle manipolazioni biotecnologiche, la mancanza di un'inibizione specifica dei ribosomi da parte degli RNA biotecnologici può contribuire a spiegare perché lo spike prodotto a caso in cellule sparse del corpo non può indurre una forte *stimolazione* immunitaria, *che è anche limitata a pochi mesi* (Gambacorti-Passerini e Aroldi, 2022; Bellavite et al., 2023). Anche producendo concentrazioni di picchi relativamente elevate, la durata degli anticorpi prodotti rimane comunque limitata e non genera una protezione duratura rispetto a un'infezione virale naturale, come è diventato evidente dopo le vaccinazioni basate su RNA-DNA.

4. Conseguenze patologiche dei vaccini a RNA-DNA

Gli antigeni proteici virali nel capsido trasportano l'RNA o il DNA in cellule specifiche e vengono catturati dalle cellule APC-dendritiche che attivano la risposta immunitaria (Sompayrac, 2012). Come indicato in precedenza, gli RNA o i DNA virali o le proteine da essi generate *non viaggiano come molecole isolate nell'organismo*, poiché verrebbero rapidamente degradati a livello extracellulare e intracellulare. Sono stati segnalati potenziali effetti collaterali sconosciuti derivanti dall'iniezione di RNA attraverso liposomi (vaccini Pfizer o Moderna) o di DNA inserito nel capsido portante di un adenovirus alieno (Astrazeneca o Johnson & Johnson) (Gambacorti-Passerini e Aroldi, 2022; Seneff et al., 2022; Acevedo-Whitehouse e Bruno, 2023; Bellavite et al., 2023; Petit e Longo, 2023; Fig. 2 C, D). L'incorporazione di un RNA o di un DNA virale completo o parziale produce proteine spike intracellulari che *vengono esposte sulla superficie di qualsiasi cellula* che ha ricevuto il bio-RNA o -DNA. Gli antigeni derivati dagli spike, oltre a penetrare nel nucleo, allerterebbero anche le sentinelle immunitarie (macrofagi e linfociti T-helper e/o T-killer) dopo la loro esposizione superficiale su vari tipi di cellule. Infatti, l'esposizione di picchi sulla superficie di molti tipi di cellule diverse dopo che queste hanno incorporato i vaccini a RNA-DNA indica che queste cellule sono infette e devono essere distrutte da cellule immunitarie specifiche (ad esempio, linfociti T-citotossici). Quest'ultimo evento *determina l'autoimmunità* e può colpire tutti gli organi che contengono cellule che hanno casualmente adsorbito i vaccini a RNA o a DNA, dando origine a miocarditi, epatiti, nevriti, encefaliti ecc. (Gambacorti-Passerini e Aroldi, 2022; Acevedo-Whitehouse e Bruno, 2023; Bellavite et al., 2023). Oltre ai problemi sopra indicati, un'altra complicazione nell'utilizzo di questi vaccini è la produzione di *proteine attive che viaggiano liberamente* all'interno dell'organismo (Fig. 2 A, B). Questa informazione era ed è necessaria prima di attivare la vaccinazione a RNA-DNA per la proteina spike Sars-cov2 e sarà essenziale per le proteine virali prodotte in futuri programmi di vaccinazione che utilizzano vaccini a RNA-DNA per la maggior parte delle infezioni virali (Pardi et al., 2018; Chaudhary et al., 2021; Chavda et al., 2022; Kim et al., 2022; Zhou et al., 2023; Fig. 5).

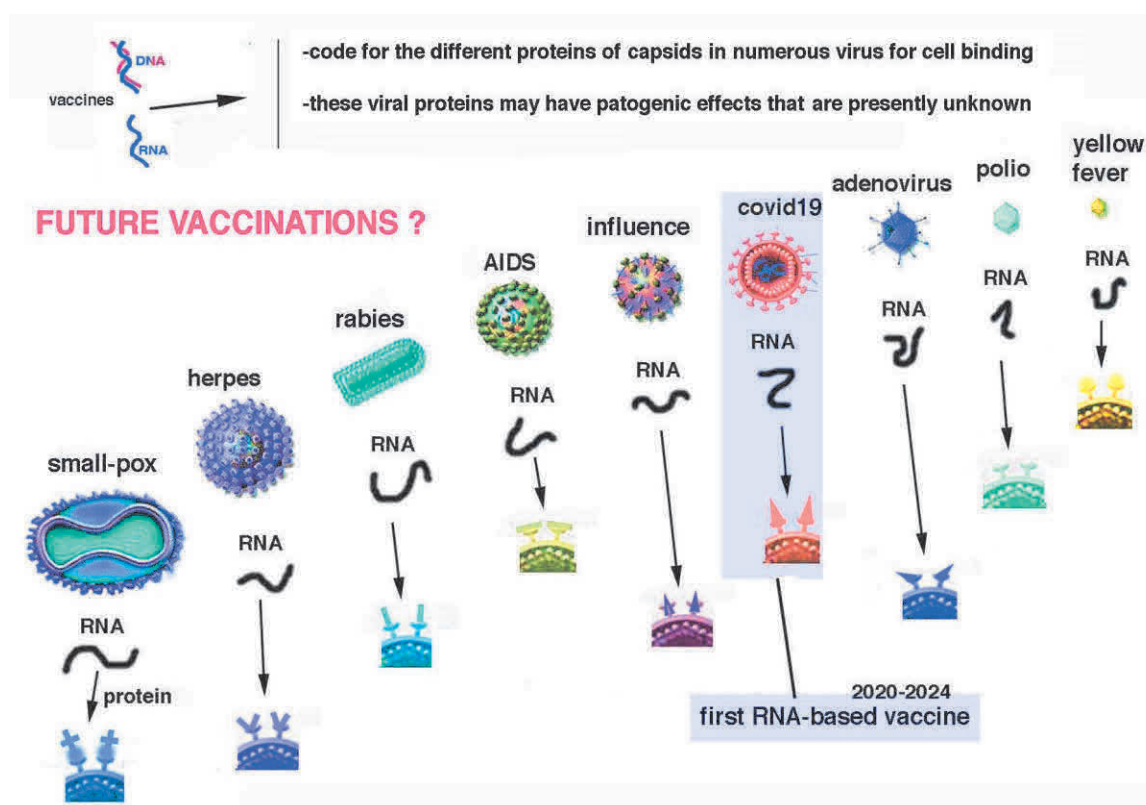


Fig. 5. Futuri potenziali vaccini a RNA contro diversi virus, previsti per sostituire i vaccini tradizionali. Dopo aver selezionato specifici RNA (o DNA) che codificano per i diversi spike o per le proteine esterne che si legano ai recettori cellulari presenti in questi virus, questi vaccini possono essere utilizzati, come il vaccino covid19, per la vaccinazione di massa. Se queste proteine virali attive possano determinare anche effetti patogeni, come quelli della proteina spike della Sars-cov-2, dovrà essere valutato attraverso una lunga sperimentazione prima di inoculare questi vaccini a base di RNA alle persone.

Altri effetti patologici, chiaramente dimostrati dopo la vaccinazione con RNA o DNA Covid-19, sono le alterazioni della pressione sanguigna (ictus) e l'aumento della coagulazione del sangue con conseguente mancata ossigenazione dei tessuti e necrosi degli organi colpiti da anossia, cuore, polmoni, reni, ecc. Un'alterazione più basale dell'omeostasi cellulare generata dalla proteina spike riguarda la potenziale alterazione dei meccanismi di riparazione del DNA, come suggerito da uno studio pubblicato (Jang e Mey, 2021). Quest'ultimo studio è stato successivamente ritrattato dalla rivista scientifica, ma non sono state condotte ricerche successive in questa direzione, per ragioni non chiare. Se confermata, l'alterazione dei meccanismi genetici cellulari può essere devastante, aumentando tumori, infezioni e autoimmunità. Al contrario, se non confermato, l'uso di vaccini a RNA-DNA sarebbe apparso più sicuro, ma purtroppo non sono state condotte ulteriori ricerche indipendenti per confermare o smentire lo studio iniziale del 2021. La distribuzione incontrollata di RNA-DNA che produce "cellule infette" da distruggere e potenziali integrazioni di DNA deve essere prevista con questi tipi di vaccini a base di RNA o DNA (Zhang et al., 2021; Gambacorti-Passerini e Aroldi, 2022; Bellavite et al., 2023). Invece, i vaccini a RNA e

I vaccini a base di DNA, trascurando la mancanza di prove scientifiche ampiamente accettate, vengono indicati come di *grande successo e addirittura degni del Premio Nobel 2023* (Chaudhary et al., 2021; Chavda et al., 2022). Si dice che i vaccini a RNA-DNA *abbiano salvato molte vite da Covid19* e che questi nuovi tipi di vaccini siano previsti per un utilizzo di massa nelle prossime epidemie previste per i prossimi anni (Pardi et al., 2018; Kim et al., 2022; Zhou et al., 2023; Fig. 5).

Purtroppo, si sa poco della funzionalità delle proteine virali isolate, soprattutto di quelle che si legano ai nostri recettori cellulari sulle nostre complesse e parzialmente note funzioni corporee. La proteina spike attiva ha causato numerosi effetti patologici, ancora poco conosciuti, su numerose persone vaccinate, con reazioni avverse da lievi a gravi o addirittura con *decessi, sensibilmente superiori rispetto all'uso dei vaccini tradizionali* (Bellavite et al., 2023; Alibardi, 2023). Non conosciamo i potenziali danni derivanti da *altre proteine virali attive indotte dai prossimi vaccini a base di RNA-DNA virale* (Fig. 5). Queste informazioni richiedono anni di studi e valutazioni scientifiche indipendenti e pubbliche, non derivate da pochi mesi o un anno di ricerche condotte dalle industrie farmaceutiche, organizzazioni che cercano principalmente il profitto, il loro obiettivo naturale, prima della pura conoscenza. La produzione di vaccini a RNA-DNA e la vaccinazione di massa dovrebbero essere interrotte, e una lunga sperimentazione dovrebbe essere fatta nei prossimi 10-20 anni se questi vaccini sono davvero indicati come il *futuro della vaccinazione*.

5. Conclusioni

Come indicato in precedenza, un approccio scientifico e logico per realizzare vaccini duraturi ed efficaci sarebbe quello di neutralizzare innanzitutto le *proteine virali meno mutevoli* insieme a quelle che cambiano frequentemente, come le proteine HA e spike, e non *solo o esclusivamente* le proteine più mutevoli. All'interno e sulla superficie dei virus sono presenti numerose proteine, oltre a quelle che si legano ai recettori cellulari (Brock e Madigan, 1991; Chaudhary et al., 2021; Chavda et al., 2022; Fig. 1), che possono essere marcate da anticorpi derivati da vaccinazioni polivalenti. Questo è il modo in cui funziona il nostro sistema immunitario naturale e *un sistema medico equo dovrebbe imitare* ciò che si è evoluto in natura durante milioni di anni di evoluzione. La produzione di vaccini monovalenti anziché polivalenti non segue uno scopo scientifico e determina *la continua vendita di nuovi vaccini, temporaneamente funzionanti*, offerti contro nuove varianti virali *ogni 6-12 mesi*. Queste vaccinazioni forniscono uno scarso aiuto per fermare per lunghi periodi o in modo definitivo le epidemie virali. Infatti, i vaccini monovalenti, come quelli tipici per l'influenza o il Covid19, non durano così pochi mesi, poiché la proteina HA del virus dell'influenza o la proteina spike del Covid19 sono cambiate (in seguito alla mutazione del loro gene) nel frattempo. Le nuove varianti sono probabilmente selezionate anche da questi vaccini monovalenti che neutralizzano solo la variante dominante presente in una certa stagione, *consentendo la sopravvivenza e quindi la selezione di altre varianti* per infezioni future e richiedendo ulteriori nuove vaccinazioni. Invece, la vaccinazione, come l'immunizzazione naturale, dovrebbe essere duratura a beneficio delle persone. Le differenze tra le infezioni da RNA-virale indicate sopra e la reattività immunitaria con i vaccini RNA-biotech indicano che questi ultimi necessitano di molti anni di ricerca e valutazione medico-scientifica.

In conclusione, le numerose ricerche attualmente condotte sui futuri vaccini dove

Le sofisticate modifiche biotecnologiche sperimentate dovrebbero evitare di considerare il *corpo umano come una provetta* (Chaudhary et al., 2021; Chavda et al., 2022). La scienza in questi studi biotecnologici di laboratorio è elevata, ma questi ricercatori non conoscono le reazioni del corpo alle biotecnologie-RNA-DNA perché *non hanno generato* il corpo umano e non possono conoscere l'intera complessità delle sue funzioni. Quest'ultima invece deriva da milioni di anni di evoluzione progressiva, passo dopo passo, attraverso prove ed errori. Alcuni problemi dei vaccini moderni sono qui riassunti: a) la degradazione RNA-DNA (Fig. 2 C, D) dovrebbe essere eliminata. 2 C, D) dovrebbe essere eliminata e questi vaccini dovrebbero dimostrarsi sicuri; b) i vaccini a RNA-DNA duraturi dovrebbero essere fatti per produrre molti antigeni, non solo una proteina, lo spike o poche altre; c) i vaccini a RNA-DNA non ripetono il ciclo virale in quanto rilasciano proteine attive che possono produrre effetti patologici, e questo dovrebbe essere previsto attraverso lunghi studi; d) l'incorporazione casuale di RNA-DNA in varie cellule genera picchi esposti che suscitano l'autoimmunità, e questo evento dovrebbe essere eliminato; e) l'impatto cellulare sulla ricombinazione dell'RNA, le possibili inserzioni di DNA e il blocco dei meccanismi di riparazione del DNA all'interno delle cellule devono essere conosciuti prima di utilizzare vaccini a RNA o a DNA; f) i vaccini polivalenti, prodotti attraverso procedure biotecnologiche su tutte o la maggior parte delle proteine virali, evitando di utilizzare fonti pregresse in vivo (uova, colture cellulari ecc.), sono probabilmente i migliori vaccini.), sono probabilmente i migliori vaccini da utilizzare in futuro dopo un ragionevole periodo di sperimentazione. Pertanto, l'utilizzo sicuro di questi vaccini richiede molti anni di indagini scientifiche prima che possano essere commercializzati, e alcune sperimentazioni in corso stanno cercando di fare chiarezza (Chaudhary et al., 2021; Chavda et al., 2022; Kim et al., 2022). La produzione di vaccini duraturi *dovrebbe essere l'obiettivo principale delle industrie farmaceutiche*, e l'uso di vaccini a base di proteine *would really provide lasting benefits on people's health in the present time.*

Ringraziamenti

Studio condotto presso l'Histolab comparativo di Padova, Italia. Apprezzo molto la discussione dei colleghi sull'argomento.

Contributi degli autori

Il Dr. L. Alibardi è stato responsabile del disegno dello studio e della conduzione della ricerca, della raccolta dei dati, della stesura del manoscritto e della sua revisione. L'autore ha redatto e approvato il manoscritto finale.

Finanziamento

Il Comparative Histolab, Padova, Italia, ha finanziato lo studio.

Interessi contrastanti

L'autore dichiara di non avere interessi finanziari concorrenti o relazioni personali che possano influenzare il lavoro riportato in questo articolo.

Consenso informato

Ottenuto.

Approvazione etica

Il Comitato etico per le pubblicazioni del Macrothink Institute.

The journal's policies adhere to the Core Practices established by the Committee on
Etica della pubblicazione (COPE).

Provenienza e revisione paritaria

Non commissionato; sottoposto a revisione esterna in doppio cieco.

Dichiarazione di disponibilità dei dati

I dati che supportano i risultati di questo studio sono disponibili su richiesta all'autore corrispondente.
I dati non sono disponibili al pubblico a causa di restrizioni etiche o di privacy.

Dichiarazione di condivisione dei dati

Non sono disponibili altri dati.

Accesso libero

Questo è un articolo ad accesso libero distribuito secondo i termini e le condizioni della licenza
Creative Commons Attribution (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Diritti d'autore

I diritti d'autore di questo articolo sono di proprietà dell'autore o degli autori, mentre i diritti di prima
pubblicazione sono concessi alla rivista.

Riferimenti

Acevedo-Whitehouse, K., & Bruno, R. (2023). Potenziali rischi per la salute della terapia con vaccini
a mRNA: a ipotesi. *Ipotesi mediche Ipotesi*, 171, 111015.
<https://doi.org/10.1016/j.mehy.2023.111015>

Aichelburg, U. (1977). *Vita e morte dei microbi. (Vita e morte dei microbi)*. Collana Aperta Mondadori,
Milano, Italia.

Alibardi, L. (2023). *Il significato della vaccinazione e dei vaccini a RNA. L'uomo tanto può quanto sa
(Significato della vaccinazione e vaccini a RNA. L'uomo tanto può quanto sa)*. Aracne Editrice,
Roma, Italia.

Bellavite, P., Ferraresi, A., & Isidoro, C. (2023). Risposta immunitaria e meccanismi molecolari degli
effetti avversi cardiovascolari delle proteine spike del SARS-CoV-2 e dei vaccini a mRNA.
Biomedicina, 11, 451. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11020451>

Brock, T. D. e Madigan, M. T. (1991). *Biologia dei microrganismi*. 6a edizione. Prentice Hall,
Englenwood Cliffs, New Jersey, USA.

Chaudhary, N., Weissman, D. e Whitehead, K. A. (2021). Recensione. Vaccini a mRNA per le
malattie infettive: principi, consegna e traduzione clinica. *Nature Reviews*, 20, 817-838.
<https://doi.org/10.1038/s41573-021-00283-5>

Chavda, V.P., Soni, S., Vora, L.K., Soni, S., Khadela, A., & Ajabiya, J. (2022).

Vaccini e terapie a base di mRNA per la Covid-19 e le future pandemie. *Vaccini*, 10, 2150. <https://doi.org/10.3390/vaccines10122150>

Curtis, H. (1965). *I virus*. The Natural History Press, New York, USA.

Danilova, N. (2006). L'evoluzione dei meccanismi immunitari. *Journal of Experimental Zoology*, 306B, 496-520. <https://doi.org/10.1002/jez.b.21102>

Freire, J. M., Santos, N. C., Veiga, A. S., Da Poian, A. T., & Castanho, M. (2015). Ripensare le proteine del capsido dei virus avvolti: multifunzionalità dall'imballaggio del genoma alla trasfezione del genoma. *FEBS Journal*, 282, 2267-2278. <https://doi.org/10.1111/febs.13274>

Gambacorti-Passerini, C., & Aroldi, A. (2022). Vaccini a base di RNA contro la SARS-Cov-2: una parola di cautela e un'analisi dei potenziali eventi avversi a lungo termine. *Organismi*, 5, 101-104.

Jang, H. e Mey, Y. F. (2021). La Sars-Cov2-spike ostacola la riparazione dei danni al DNA e inibisce la V

(D) Ricombinazione J in vitro. *Virus*, 13, 2056. <https://doi.org/10.3390/v13102056>

Khalil, A. M. (2020). La rivoluzione dell'editing del genoma: recensione. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18, 68. <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00078-y>

Kim, S. C., Sekhon, S. S., Shin, W. R., Cho, B. K., Ahn, J. Y. e Kim, Y. H. (2022). Modifiche degli elementi strutturali del vaccino dell'mRNA per migliorare la stabilità dell'mRNA e l'efficienza della traduzione. *Molecular and Cellular Toxicology*, 18, 1-8. <https://doi.org/10.1007/s13273-021-00171-4>

Krupovic, M., & Koonin, E. V. (2017). Origini multiple delle proteine del capsido virale da antenati cellulari. *PNAS* E2401-E2410. <https://doi.org/10.1073/pnas.1621061114>

Pardi, N., Hogan, M. J., Porter, F. W., & Weissman D. (2018). Vaccini a mRNA. Una nuova era nella vaccinologia. *Nature Recensioni su Farmaco Discovery*, 17, 261-279. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.243>

Petit, C. e Longo, G. (2023). La pandemia e la soluzione tecnologica. *Organismi*, 6, 23-39.

Schoenmaker, L., Witzigmann, D., Kulkarni, J. A., Verbeke, R., Kersten, G., Jiskoot, W., & Crommelin, D. J. A. (2021). Review. mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccine: structure and stability. *International Journal of Pharmacology*, 601, 120586. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120586>

Seneff, S., Nigh, G., Kyriakopoulos, A.M., & McCulloch, P. A. (2022). Soppressione immunitaria innata da parte della vaccinazione con mRNA SARS-COV-2: ruolo dei G-quadruplex, degli esosomi e dei micro-RNA. *Food e Chemical Toxicology*, 164, 113008. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113008>

Simon, A. K., Hollander, G. A., & McMichael, A. (2015). Evoluzione del sistema immunitario negli esseri umani dall'infanzia alla vecchiaia. *Proceedings of the Royal Society B*, 282, 20143085. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.3085>

Sompayrac, L. (2012). *Come funziona il sistema immunitario*. John Wiley & Sons.

Tinari, S. (2021). La fuga di dati dell'EMA Covid-19 e cosa ci dice sull'instabilità dell'RNA.

British Medical Journal, 372, n627. <https://doi.org/10.1136/bmj.n627>

Wong, S. S. e Webby, R. J. (2013). Vaccini antinfluenzali tradizionali e nuovi. *Recensioni cliniche e microbiologiche*, 26, 476-492. <https://doi.org/10.1128/CMR.00097-12>

Zhou, W., Jang, J., Liao, S., Wu, F., Yang, W., Hou, L.,... & Zhang, Y. 2023. La nuova era dei vaccini: il vaccino a RNA. *Virus*, 15, 1760. <https://doi.org/10.3390/v15081760>

Review: Calls for Market Removal of COVID-19 Vaccines Intensify as Risks Far Outweigh Theoretical Benefits

Nicolas Hulscher^{1*}, Mary T. Bowden², Peter A. McCullough¹

Abstract

COVID-19 vaccination campaigns around the globe have failed to meet fundamental standards of safety and efficacy, leading to mounting evidence of significant harm. More than 81,000 physicians, scientists, researchers, and concerned citizens, 240 elected government officials, 17 professional public health and physician organizations, 2 State Republican Parties, 17 Republican Party County Committees, and 6 scientific studies from across the world have called for the market withdrawal of COVID-19 vaccines. As of September 6, 2024, the CDC has documented 19,028 deaths in the United States reported to the Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS) by healthcare professionals or pharmaceutical companies who believe the product is related to the death. The total number of COVID-19 vaccine deaths reported to VAERS (37,544 among all participating countries) have far exceeded the recall limits of past vaccine withdrawals by up to 375,340%. The criteria for an FDA Class I recall, which applies to products with a reasonable probability of causing serious adverse health consequences or death, have been far exceeded. Excess mortality, negative efficacy, widespread DNA contamination, and a lack of demonstrated reduction in transmission, hospitalization, or mortality have undermined the rationale for continued administration. These unified requests for regulatory action underscore substantial shortcomings in data safety monitoring and risk mitigation. Immediate removal of COVID-19 vaccines from the market is essential to prevent further loss of life and ensure next steps are taken for accountability of the harm incurred.

*Correspondence: nichulscher@gmail.com

1. McCullough Foundation, Dallas, TX

2. Americans for Health Freedom, Houston, TX

Keywords

COVID-19 vaccine, DNA contamination, excess mortality, market withdrawal, negative efficacy, pharmaceutical recalls

Introduction

The approval of COVID-19 vaccines was based on expedited Emergency Use Authorization (EUA) processes that prioritized addressing the urgent public health crisis posed by SARS-CoV-2. Early randomized controlled trials (RCTs) demonstrated a 95% relative risk reduction in symptomatic COVID-19, a metric that underpinned the decision for widespread rollout [1, 2]. However, these trials present serious methodological concerns [3]. The trials were prematurely terminated, and placebo groups were unblinded, effectively eliminating the ability to assess long-term safety and adverse events. Key subgroups, such as children, pregnant women, and immunocompromised individuals, were excluded, and trial endpoints focused on reducing mild symptoms rather than severe disease or mortality. This design bias limited the ability to evaluate the true risk-benefit profile of the vaccines [3].

The CDC estimated that 70.3% of Americans aged ≥ 16 years had contracted COVID-19 by September 2022, using SARS-CoV-2 antibodies as measurement [4]. As of December 1st, 2024, we estimate that at least 90% of the entire U.S. population has contracted COVID-19 illness and has natural immunity to SARS-CoV-2. The CDC reported 1,212,008 fatalities occurring between January 1, 2020 and November 23, 2024, with a positive test for COVID-19 at some point before death [5]. Among those, 94% were above age 50 years. If adjudication was performed by expert clinicians, we estimate that approximately 10% of the total casualty count or 121,200 deaths may have COVID-19 pneumonia as the primary cause of

death. Procter et al. have published that 85% of these deaths may have been avoidable with early multidrug protocols started on day 1 at home [6]. Figure 1 shows that, by September 6, 2024, the CDC has recorded 19,028 American COVID-19 vaccine deaths reported to them in the Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS) by healthcare professionals or pharmaceutical companies who believe the product is related to the death [7]. Approximately 1175 deaths have occurred on the same day of vaccination, and 1250 deaths on the day following vaccination. The deaths reported in VAERS are estimated to be under-reported by a conservative multiplier of 31, based on a comparison between expected serious adverse event (SAE) rates from clinical trials and the observed reports in VAERS [8]. Pfizer's clinical trial data indicated an SAE rate of 0.7%, which, when applied to the 197 million doses of COVID-19 vaccines administered in the U.S. by August 2021, would suggest approximately 1.4 million expected SAEs. However, VAERS documented far fewer cases, leading to the conclusion that only 1 in 31 deaths or serious adverse events is captured in the VAERS system due to its passive reporting nature and known underreporting challenges [8]. This means the American death toll from COVID-19 vaccination may be 589,868 ($19,028 \times 31$). Thus, it is our opinion that more Americans may have died of COVID-19 vaccination than from SARS-CoV-2 infection.

There are greater than 3400 peer reviewed manuscripts in the medical literature concerning fatal and nonfatal COVID-19 vaccine injuries including those recognized by regulatory agencies around the world such as myocarditis, neurologic injury, thrombosis, and immunologic syndromes. Emerging evidence from diverse global datasets indicates patterns of concerning adverse events and mortality trends associated with COVID-19 vaccination campaigns, raising critical questions about risk-benefit balance and long-term safety. Due to these significant concerns, we reviewed the literature for excess mortality, DNA contamination,

and negative efficacy associated with COVID-19

vaccines, along with compiling a comprehensive list of all calls for an immediate moratorium.

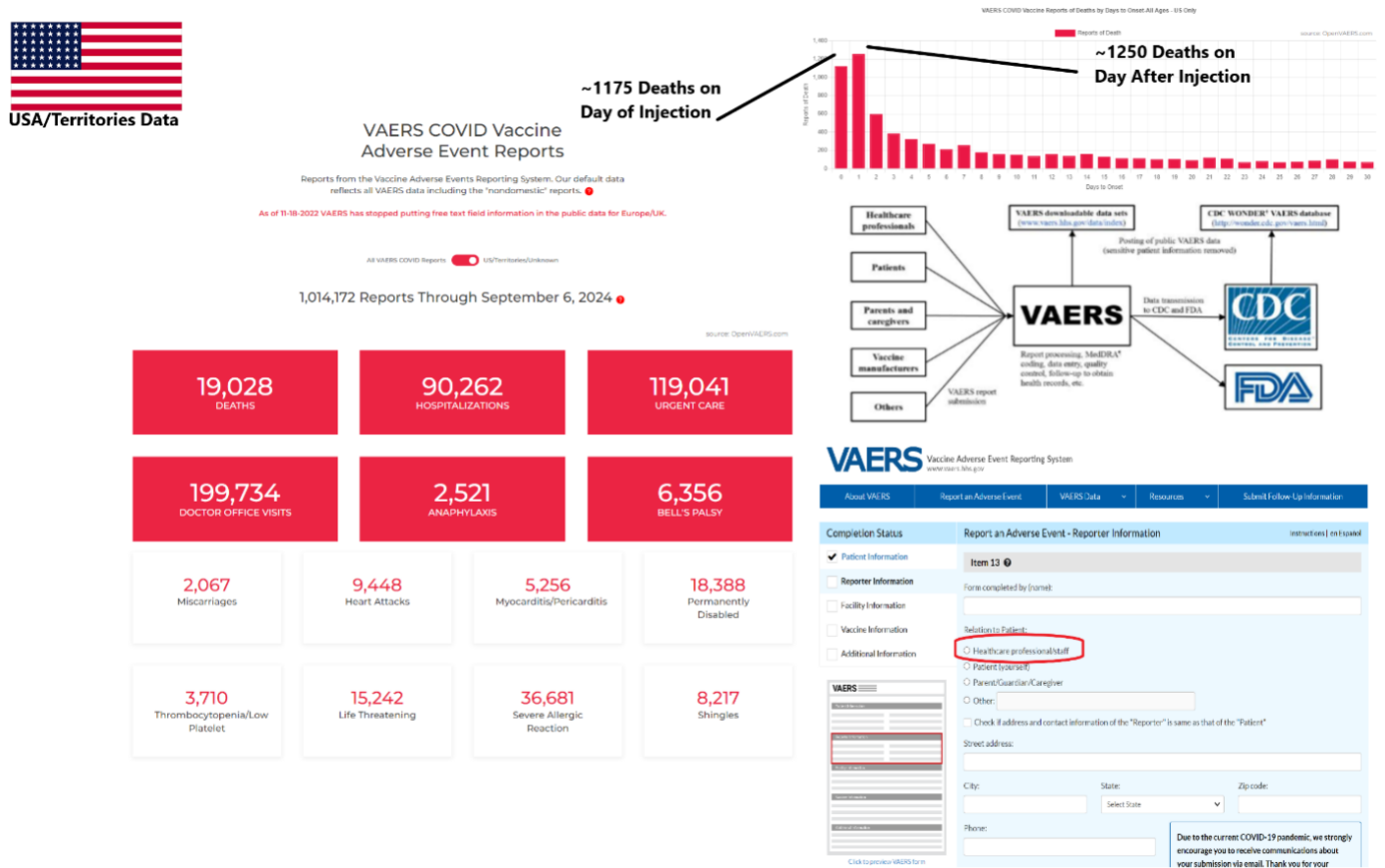


Figure 1. United States COVID-19 Vaccine VAERS Adverse Event Reports. Adapted from OpenVAERS [7].

Excess Mortality

Instead of saving lives, mass COVID-19 vaccination has likely led to increased mortality (Table 1) [9-20]. The largest autopsy study published to date indicates that 73.9% of deaths after vaccination are a direct cause or significantly contributed to by COVID-19 vaccination, demonstrating a high likelihood of a causal link between COVID-19 vaccines and death [9]. By September 2023, Rancourt et al. estimated 17 million COVID-19 vaccine-related deaths worldwide [10]. Mostert et al. reported 3.1 million excess deaths potentially attributed to COVID-19 vaccination and lockdowns across 47 Western countries from 2020 to 2022 [11].

The significant discrepancy in excess mortality figures between Rancourt and Mostert likely arises from the scope and timeframe of their estimates: Rancourt's analysis accounts for 195 countries up to the end of 2023, while Mostert's focuses on 47 Western countries up to 2022. In the United States, Skidmore estimated that 278,000 Americans may have died from COVID-19 vaccines by December 2021 [12], while Pantazatos and Seligmann projected between 146,000 to 187,000 vaccine-associated deaths by August 2021 [13]. Hulscher et al. estimated 49,240 excess cardiac arrest deaths in the U.S. between 2021 and 2023, potentially linked to COVID-19 vaccination [14]. Aarstad and Kvitastein found a significant association between higher

vaccine uptake and increased all-cause mortality [15]. Alessandria et al. revealed that individuals vaccinated with one or two doses faced higher all-cause mortality risks compared to unvaccinated individuals, with those receiving two doses losing 37% of life expectancy during follow-up [16]. Lataster further demonstrated a consistent positive correlation between COVID-19 vaccination rates and excess mortality for every month analyzed [17]. Allen uncovered a significant correlation between Australian excess deaths and COVID-19 booster

injections, whereas no significant correlation was observed with the unvaccinated population [18]. Kuhbandner and Reitzner observed a significant positive correlation between COVID-19 vaccination rates and the rise in excess mortality during the second and third pandemic years in Germany, with this correlation becoming particularly pronounced in the third year [19]. Rodrigues and Andrade found that COVID-19 vaccination nearly doubles the risk of death from all causes after one-year post-COVID infection [20].

Study/Data Source	Key Finding
Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS) [7]	By September 6, 2024, the CDC has recorded 19,028 American COVID-19 vaccine deaths reported to them by healthcare professionals or pharmaceutical companies who believe the product is related to the death. The deaths reported in VAERS are estimated to be underreported by a conservative multiplier of 31 [5]. This means the American death toll from COVID-19 vaccination may be 589,868 (19,028 x 31).
Hulscher et al. [9]	Demonstrated a high likelihood of a causal link between COVID-19 vaccines and death and estimated that 73.9% of deaths after vaccination are directly caused or significantly contributed to by COVID-19 vaccination.
Rancourt et al. [10]	Estimated 17 million COVID-19 vaccine-related deaths worldwide by September 2023.
Mostert et al. [11]	Reported 3.1 million excess deaths potentially attributed to COVID-19 vaccination and lockdowns across 47 Western countries from 2020 to 2022.
Skidmore [12]	Estimated 278,000 Americans may have died from COVID-19 vaccines by December 2021.
Pantazatos and Seligmann [13]	Projected between 146,000 to 187,000 vaccine-associated deaths in the United States by August 2021.
Hulscher et al. [14]	Estimated 49,240 excess cardiac arrest deaths in the U.S. between 2021 and 2023, potentially linked to COVID-19 vaccination.
Aarstad and Kvitastein [15]	Found a significant association between higher vaccine uptake and increased all-cause mortality.
Alessandria et al. [16]	Revealed higher all-cause mortality risks for those vaccinated with one or two doses compared to unvaccinated individuals, with two doses leading to a 37% reduction in life expectancy during follow-up.
Lataster [17]	Demonstrated a consistent positive correlation between COVID-19 vaccination rates and excess mortality for every month analyzed.
Allen [18]	Uncovered a significant correlation between Australian excess deaths and COVID-19 booster injections, whereas no significant correlation was observed with the unvaccinated population.
Kuhbandner and Reitzner [19]	Observed a significant positive correlation between COVID-19 vaccination rates and the rise in excess mortality during the second and third pandemic years in Germany, with this correlation becoming particularly pronounced in the third year [19].
Rodrigues and Andrade [20]	Found that COVID-19 vaccination nearly doubles the risk of death from all causes after one-year post-COVID infection.

Table 1. COVID-19 Vaccine Excess Mortality.

While these studies highlight concerning correlations and potential causative links between

COVID-19 vaccines and death, the calculations and findings reported are subject to several limitations.

Variability in data quality across different studies, reliance on observational data, and potential confounding factors such as underlying health conditions, reporting biases, and incomplete vaccination records may influence the results. Additionally, causation cannot be definitively established from correlations alone, necessitating further investigation through well-controlled longitudinal studies. Nonetheless, these findings raise profound concerns about the safety and public health impacts of COVID-19 vaccination programs.

FDA Class I Recall Indicated

The FDA's threshold for a Class I recall—defined as a situation where the use or exposure to a violative product poses a reasonable probability of causing serious adverse health consequences or death [21]—has been greatly surpassed. This involves completely withdrawing a product from public markets. In most cases, product recalls are initiated by the company itself, either voluntarily or following the FDA's recommendation, with the FDA overseeing the recall process. However, for vaccines, biologics, medical devices, and controlled substances, the FDA holds the authority to mandate a recall if necessary [22]. The FDA recalls thousands of products each year and the number of Class I recalls continues to trend upward [23]. According to Anne Reid, program director of the Office of Medical Devices and Radiological Health Operations (OMDRHO), Office of Regulatory Affairs (ORA) at the FDA, “Medical devices lead the number of recalled products in fiscal years 2012 through 2024, with a total of 32,336 recalls occurring over that time period compared to product types such as food and cosmetics (26,184 recalls), drugs (16,137 recalls), and biologics (11,605 recalls)” [24].

As of April 26, 2024, according to VAERS, the total number of reported COVID-19 vaccine deaths

(37,544 among all countries that use VAERS) have far exceeded the recall limits of past vaccine withdrawals by up to 375,340% (Figure 2) [25, 26]. In 1955, the Cutter polio vaccine was immediately recalled after 10 death reports [27]. The swine flu vaccine of 1976 was recalled after 53 reported fatalities [25]. In 1999, the Rotashield vaccine was suspended after 15 cases of intussusception [28]. The substantial contrast between COVID-19 vaccine death reports and historical vaccine recalls indicates significant shortcomings in data safety monitoring.

Negative Efficacy

Multiple studies have demonstrated that COVID-19 vaccinated individuals may face a higher risk of infection compared to unvaccinated individuals. Eythorsson et al. found that individuals vaccinated with two or more doses had a 42% higher risk of reinfection compared to those with one dose or less [29]. Chemaitelly et al. estimated that the effectiveness of Pfizer-BioNTech (BNT162b2) and Moderna (mRNA-1273) vaccines against Omicron subvariants declined significantly, reaching negative effectiveness levels (-17.8% and -12.1% for Pfizer; -10.2% and -20.4% for Moderna) after seven months [30]. Shrestha et al. found a dose-dependent increased risk of COVID-19 infection, with individuals receiving more than three doses experiencing a 253% higher risk compared to unvaccinated individuals [31]. Similarly, Feldstein et al. revealed that vaccinated children aged 6 months to 4 years without prior infection were 159% more likely to get infected and 257% more likely to develop symptomatic COVID-19 compared to their unvaccinated peers [32]. These findings collectively raise serious concerns about the long-term efficacy and safety of repeated COVID-19 vaccine doses, suggesting that continued reliance on this strategy may inadvertently increase susceptibility to infection and adverse outcomes.

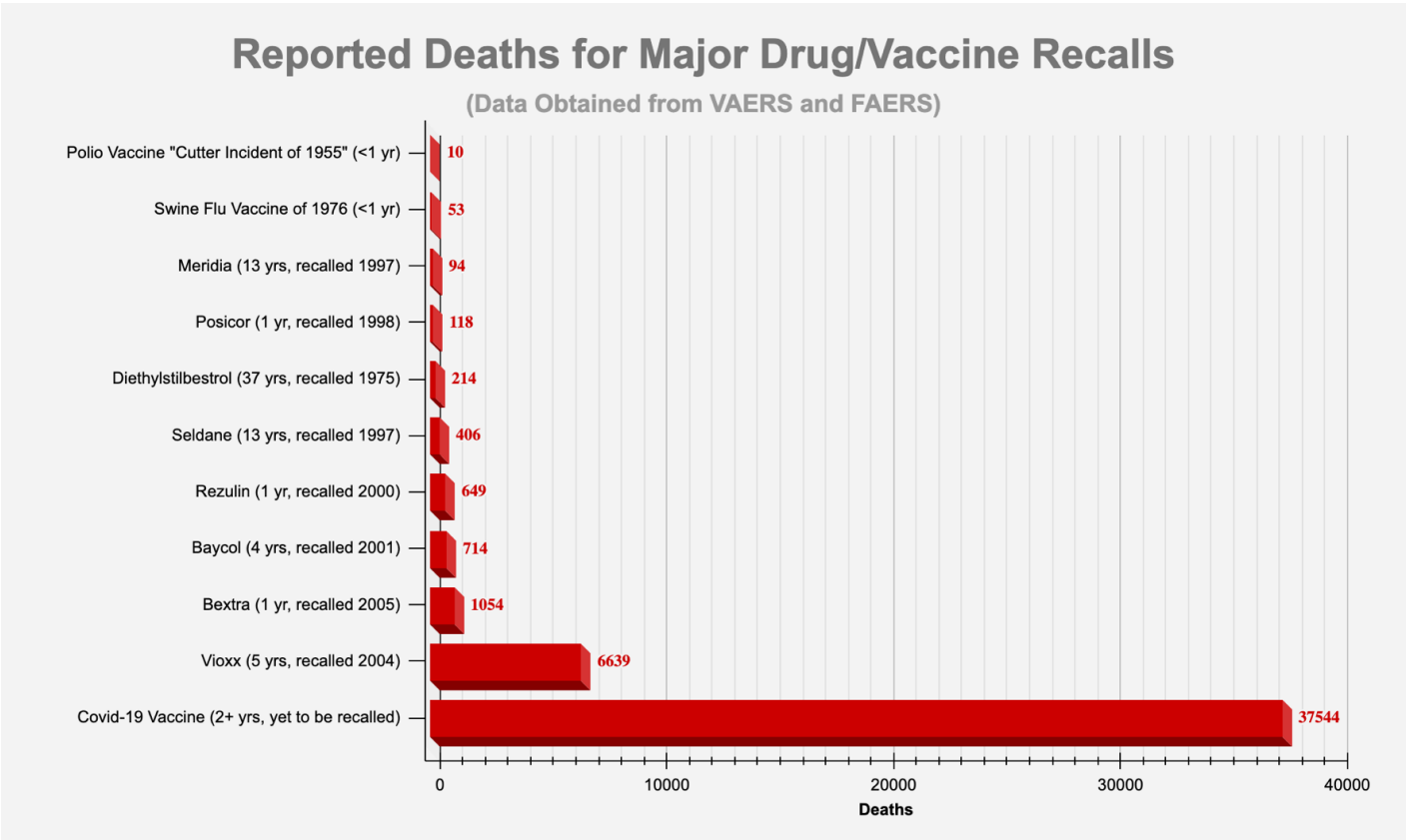


Figure 2. Reported Deaths for Major Drug/Vaccine Recalls Versus Total COVID-19 Vaccine Deaths Reported to VAERS. *Figure reprinted from Rhodes and Parry [25], who obtained permission from VAERS Analysis to use their figure [26]. Permission to use this figure has been granted in accordance with the open access Creative Common CC BY-NC 4.0 license.

DNA Contamination

Studies investigating DNA contamination and potential gene integration from COVID-19 vaccines have revealed concerning findings (Table 2) [33-44]. McKernan et al. from Medicinal Genomics (USA) reported DNA levels far exceeding the safety threshold in Pfizer and Moderna vaccines, with measurements as high as 3,390 ng per dose using electrophoresis and fluorometer methods. Their findings included evidence of gene integration and SV40 sequences in cancer cells, raising concerns that were reported to the FDA and presented at the World Council for Health (WCH) [33-35]. Nitta (Japan) found minimal DNA contamination in Moderna vaccines, measuring 0.1 ng, which was deemed negligible [36]. Buckhaults (USA) demonstrated DNA integration into human epithelial

stem cells, with DNA concentrations ranging from 0.6 to 18.7 ng, emphasizing the potential for adverse events [37, 38]. König and Kirchner (Germany) identified DNA contamination levels between 3,600 and 5,340 ng, with their findings submitted to German health authorities and published in a peer-reviewed journal [39]. Speicher, Rose, and McKernan et al. (Canada) discovered DNA levels up to 5,100 ng across multiple vaccine batches, raising significant concerns and presenting their findings at the WCH [40]. Speicher also reported high DNA contamination in Australian vaccine samples, with total DNA levels ranging from 451 ng to 1,420 ng after RNaseA/DNaseI treatment and up to 14.69 ng of SV40 sequences [41]. These findings were reported to the Therapeutic Goods Administration (TGA). Raoult et al. (France) analyzed Pfizer vaccine

samples, reporting average DNA contamination levels of 216 ng, which further increased to 5,160 ng following treatment with Triton-X-100, raising significant safety concerns [42]. Kämmerer et al. (Germany) examined Pfizer vaccine samples and found DNA contamination levels ranging from 2,712 to 3,683 ng after treatment with Triton-X-100 [43]. Additionally, further analysis using RNaseA showed DNA levels between 32.71 and 42.09 ng, confirming DNA contamination levels exceeded regulatory limits. They demonstrated that vaccine-derived DNA

could transfect HEK293 cells, raising significant concerns about gene integration and potential adverse events [43]. Wang et al. (USA) analyzed six vials from two Pfizer vaccine lots and detected significant residual DNA contamination far exceeding regulatory limits, with amounts ranging from 3,450 to 6,550 ng per dose using UV-Vis spectrophotometry (NanoDrop) and 41.4 to 109.5 ng per dose via fluorometric dsDNA quantification (Qubit) analysis [44].

Researcher	Affiliation, Country	Pharma Company	# of Vials	First reported	Methods	DNA/dose (limit 10 ng)	DNA/RNA ratio (limit 1/3030)	Concerns	Publication
McKernan, K. [33-35]	Medicinal Genomics, US	Pfizer, Moderna	a dozen	2023-04	Electrophoresis (Agilent)	2250 ng – 3390 ng*	1/8 – 1/2	Adverse events, Gene integration	Reported to FDA Presented at FDA Presented at WCH Reported by Epoch times Found gene integration in OvCar3 cancer cells transfected by Kämmerer Found SV40 in tumors
					Fluorometer (Qubit)	312 ng – 843 ng*	1/47 – 1/8		
					qPCR/RT-qPCR	12 ng	1/161 – 1/43		
		Pfizer, Moderna, Daiichi-Sankyo (Japan)	5	2023-11	Fluorometer (Qubit)	17.5 – 61.8 ng (after Triton-X/RnaseA)			
					qPCR	88.8 ng (Pfizer)			
Nitta, T. [36]	Tokyo Univ, Japan	Moderna	1 or 2	2023-06	qPCR/RT-qPCR	0.1 ng**	1/1,000,000	No Problem	No publication
Buckhaults, P. J. [37, 38]	USC, US	Pfizer, Moderna	some	2023-07	qPCR	0.6 ng -- 18.7 ng		Adverse events, Gene integration	Presented in South Carolina Senate Presented gene integration to normal human epithelial stem cells
		Pfizer 2020, Pfizer 2023, Moderna 2020, Moderna 2023	4	2024-04	qPCR	7.7 ng (SV40, Pfizer) 4.5 -- 5.5 ng (Neo/Kan, Pfizer) 1.5 -- 9.0 ng (ORI, Pfizer) 2.5 -- 18.7 ng (Spike, Pfizer) 0.002 -- 0.004ng (ORI, Moderna 2023)			
König, B. Kirchner, J. O. [39]	MMD, Germany Indep., Germany	Pfizer, Moderna	4	2023-09	Fluorometer (Qubit)	3600 ng – 5340 ng	1/12 -- 1/7	Adverse events, Gene integration	Reported to the German Ministry of Health Reported by local public broadcasting MDPI peer-reviewed paper

Table 2. Verifications of mRNA Vaccine DNA Contamination in the World. Red boxes indicate DNA contamination exceeding the regulatory limit of 10 ng per clinical dose. *Multiplied the value by 300 for ul. **From the description of DNA 44x10fg to mRNA 400 ng, the calculation for Moderna 1-dose as mRNA 100 ug. Credit for table creation and data extraction: Dr. Kenji Fujikawa, PhD, Institute of Medical Statistics, Information, and Communications, Japan. (@hudikaha on X)

Researcher	Affiliation, Country	Pharma Company	# of Vials	First reported	Methods	DNA/dose (limit 10 ng)	DNA/RNA ratio (limit 1/3030)	Concerns	Publication
Speicher, D. J.	University of Guelph, Canada	Pfizer, Moderna	27	2023-10	Fluorometer (Qubit)	1896 ng – 5100 ng		Adverse events, Gene integration	Presented at WCH
McKernan, K. [40]	Medicinal Genomics, US				qPCR	0.22 ng -- 2.43 ng (Spike) 0.01 ng -- 4.27 ng (ORI)			
Speicher, D. J. [41]	University of Guelph, Canada	Pfizer, Moderna (Australia)	3	2024-06	Fluorometer (Qubit)	451 ng – 1420 ng (after RNaseA/DNaseI)		Adverse events, Gene integration	Reported to Therapeutic Goods Administration (TGA) Under litigation
					qPCR	6.46 ng -- 163.68 ng (Spike) 0.54 ng -- 12.97 ng (ORI) 3.70 ng -- 14.69 ng (SV40, Pfizer)			
Raoult, D. [42]	Aix-Marseille Univ (Former Prof), France	Pfizer	some	2024-11	Fluorometer (Qubit)	216 ng (Avg) 5160 ng (Avg, after Triton-X-100)		Gene integration	Preprint
Kämmerer, U. [43]	Univ. Hospital of Würzburg, Germany	Pfizer	4	2024-12	Fluorometer (Qubit)	2712 – 3683 ng (after Triton-X-100) 32.71 -- 42.09 ng (after Triton-X-100/RNaseA)		Adverse events, Gene integration	Peer-reviewed paper of Science, public health policy and the law. Transfection to HEK293 cells
Wang [44]	Centreville High School, US	Pfizer	6	2024-12	Spectrometer (Nanodrop), Fluorometer (Qubit)	3450 – 6550 ng (Nanodrop), 41.4 – 109.5 ng (Qubit)		Adverse events, Gene integration	Peer-reviewed paper of the Journal of High School Science. Work performed in FDA lab.

Table 2. Continued.

These findings indicate that DNA contamination, reported across multiple manufacturers, vaccine platforms, and geographic regions, far exceeds the thresholds recommended by regulatory agencies such as the European Medicines Agency (EMA) and the U.S. Food and Drug Administration (FDA), typically set at <10 ng per clinical dose [45]. Moreover, DNA contamination levels below regulatory thresholds may still pose significant health risks. However, mechanistic or epidemiological evidence directly linking this contamination to adverse health outcomes remains limited. The presence of sequences such as SV40 raises possible risks for gene integration and carcinogenicity [46, 47]. Further research is essential to clarify the potential biological implications of such contamination.

Calls for Market Removal of COVID-19 Vaccines

More than 81,000 physicians, scientists, researchers, and concerned citizens, 240 elected government officials, 17 professional public health and physician organizations (Figure 3), 2 State Republican Parties, 17 Republican Party County Committees, and 6 scientific studies from across the world have called for the market withdrawal of COVID-19 vaccines (Table 3). Doctors for COVID Ethics called for global recall of COVID-19 vaccines on March 10, 2021 [48]. In May 2021, Bruno et al. (50 authors) called for a pause in the mass vaccination program if vaccination programs worldwide do not institute independent data safety monitoring boards (DSMB), event adjudication committees (EAC), and enact risk mitigation [49]. The World Council for Health, on November 29, 2021, issued a declaration “demanding that governments and corporations cease and desist from

direct or indirect participation in the manufacturing, distribution, administration or promotion of COVID-19 experimental injections” based on serious safety concerns [50]. In May 2022, the Global COVID Summit, including more than 17,000 physicians and scientists, declared that “the COVID-19 experimental genetic therapy injections must end” [51]. In October 2022, the Association of Health Professionals and Independent Researchers (APSIIN) sent a letter to the Ministry of Health in Chile to request the immediate suspension of inoculation with mRNA platforms [52]. Dr. McCullough concluded with the assent of expert panels, that complete market removal of all COVID-19 vaccines was justified based on the excess risk of death, on December 7, 2022, in the US Senate [53], and on September 13, 2023, in the European Parliament [54]. On March 21, 2023, the Association of American Physicians and Surgeons issued a factual, scientifically grounded, and consensus driven statement calling for all COVID-19 vaccines to be removed from the market based on lack of safety and efficacy [55]. The National Citizens Inquiry, a Canadian citizen-led and citizen-funded organization chartered to investigate governments’ COVID-19 policies, on September 14, 2023, called for market removal of all COVID-19 vaccines [56]. In late 2023, Americans for Health Freedom created a signable pledge calling for COVID-19 shots to be pulled off the market [57]. As of December 1, 2024, 228 elected officials, 17 County Political Committees, 2 State Political Parties, and multiple physician organizations have signed the pledge calling for COVID-19 vaccines to be removed from the market, including but not limited to Sen. Ron Johnson, Rep. Marjorie Taylor Greene, Rep. Thomas Massie, Arizona and Idaho Republican Parties, America’s Frontline Doctors, Frontline COVID-19 Critical Care Alliance, Health Advisory and Recovery Team, the Global Health Project, and the Global COVID Summit [57]. On January 4, 2024, the Florida Surgeon General called

for removal of all mRNA COVID-19 vaccines from human use because of contamination by cDNA fragments and the risk of genotoxicity [58]. On January 12, 2024, again Dr. McCullough called for removal of all COVID-19 booster products from the market in a US House of Representatives Panel on COVID-19 Vaccine Injuries [59]. On February 29, 2024, members from New Zealand Doctors Speaking Out with Science (NZDSOS) presented a comprehensive letter to parliament calling for the immediate withdrawal of COVID-19 vaccines due to significant safety concerns [60]. In 2024, the McCullough Foundation issued several statements on social media platforms calling for an immediate moratorium on COVID-19 vaccines due to excess death and DNA contamination concerns [61]. In July 2024, Mead et al. published a pair of extensively referenced, peer-reviewed manuscripts concluding the COVID-19 vaccines are not safe for human use and should be removed from the market [3, 62]. The HOPE Accord, an international group of healthcare professionals, scientists, academics and concerned citizens called for the immediate suspension of COVID-19 mRNA vaccines and a comprehensive reevaluation of their safety and efficacy on July 3, 2024 [63]. The accord has garnered 64,168 signatures from prominent medical experts, researchers, and concerned citizens who argue that emerging evidence suggests these novel vaccine products may be contributing to increased rates of disability and excess deaths. Legal action was filed on October 11, 2024, by VERITY France, along with scientists, citizens, and victims, before the Administrative Tribunal of Montreuil, seeking the prohibition of the prescription and distribution of the COMIRNATY vaccine by PFIZER-BioNTech and the SPIKEVAX vaccine by MODERNA, as well as their withdrawal from the market by the National Agency for the Safety of Medicines and Health Products (ANSM) [64]. On November 1, 2024, Rogers et al. published a study that found a significant breach in the safety signal threshold concerning cerebral

thrombosis adverse events after COVID-19 vaccines and called for a global moratorium [65]. Also in November 2024, a study by Oldfield et al. recommended a moratorium on COVID-19 mRNA vaccines due to incomplete data, serious safety concerns, and potential long-term risks [66]. On November 25, 2024, the NORTH Group, an international group of politicians and leading medical and other professionals sent a letter of “extreme concern” to the heads of state of 11 European countries (Denmark, Estonia, Finland, Greenland, Iceland, Latvia, Lithuania, Norway, Sweden, the United Kingdom, and Ireland) calling for a suspension of modified mRNA vaccines citing serious health concerns [67]. On December 3, 2024, Kämmerer et al. published an original article that called for an immediate halt of all RNA biologicals

due to DNA contamination [43]. On December 4, 2024, we were able to obtain email confirmation that 4 members of European Parliament want the COVID-19 vaccines removed from the market: Christine Anderson (Germany), Cristian Terhes (Romania), Virginie Joron (France), and Gerald Hauser (Austria). Moreover, we received confirmation that 8 current and former Australian Federal Senators and Federal Members of Parliament have called for the removal of COVID-19 vaccines, including Gerard Rennick, Alex Antic, Malcolm Roberts, Ralph Babet, Matt Canavan, Pauline Hanson, Russell Broadbent, and Craig Kelly. We also obtained confirmation that Children’s Health Defense [68] calls for the COVID-19 vaccines to be immediately removed from the market.



Figure 3. Organizations that Called for COVID-19 Vaccine Market Withdrawal.

Category	Date	Entity	Action/Statement
Manuscripts	May 2021	Bruno et al. [49]	50 authors call for a pause in the mass vaccination program if vaccination programs worldwide do not institute independent data safety monitoring boards (DSMB), event adjudication committees (EAC), and enact risk mitigation.
	July 2024	Mead et al. [3, 62]	Published peer-reviewed manuscripts concluding COVID-19 vaccines are unsafe for human use and should be removed.
	November 2024	Rogers et al. [65]	Found alarming breach in the safety signal threshold concerning cerebral thrombosis AEs after COVID-19 vaccines and called for global moratorium.
	November 2024	Oldfield et al. [66]	Based on incomplete data, serious safety concerns, and potential long-term risks, the authors recommend a moratorium on COVID-19 mRNA vaccines.
	December 2024	Kammerer et al. [43]	Called for an immediate halt of all RNA biologicals due to DNA contamination.
Organizations	March 10, 2021	Doctors for COVID Ethics [48]	Called for the global recall of COVID-19 vaccines.
	November 29, 2021	World Council for Health [50]	Issued a declaration “demanding that governments and corporations cease and desist from direct or indirect participation in the manufacturing, distribution, administration or promotion of COVID-19 experimental injections” based on serious safety concerns.
	May 2022	Global COVID Summit [51]	More than 17,000 physicians and scientists declared that “the COVID-19 experimental genetic therapy injections must end.”
	October 2022	Association of Health Professionals and Independent Researchers (APSIIN) [52]	Sent a letter to the Ministry of Health in Chile to request the immediate suspension of inoculation with mRNA platforms.
	March 21, 2023	Association of American Physicians and Surgeons [55]	Issued a statement calling for the removal of all COVID-19 vaccines due to lack of safety and efficacy.
	September 14, 2023	National Citizens Inquiry [56]	Called for the market removal of all COVID-19 vaccines after investigating government COVID-19 policies.
	November 2023	Americans for Health Freedom [57]	Created signable pledge for elected government officials and others calling for mRNA products to be pulled off the market.
	2023-2024	America’s Frontline Doctors [57]	Signed the Americans for Health Freedom pledge calling for “the COVID shots to be pulled off the market.”
	2023-2024	Frontline COVID-19 Critical Care Alliance [57]	
	2023-2024	Health Advisory and Recovery Team [57]	
	2023-2024	Global Health Project [57]	
	2023-2024	17 County Political Committees [57]	
	2023-2024	Arizona and Idaho State Republican Parties [57]	Presented a comprehensive letter to parliament calling for the immediate withdrawal of COVID-19 vaccines due to significant safety concerns.
	February 29, 2024	New Zealand Doctors Speaking Out with Science (NZDSOS) [60].	
	2024	McCullough Foundation [61]	Issued multiple statements on social media calling for the immediate withdrawal of COVID-19 vaccines from the market.
	July 3, 2024	HOPE Accord [63]	64,168 prominent medical experts, researchers, and concerned citizens called for immediate suspension of COVID-19 mRNA vaccines and reevaluation of their safety and efficacy.
	October 11, 2024	VERITY France, along with scientists, citizens, and victims [64].	Legal action was filed before the Administrative Tribunal of Montreuil, seeking the prohibition of the prescription and distribution of the COMIRNATY vaccine by PFIZER-BioNTech and the SPIKEVAX vaccine by MODERNA, as well as their withdrawal from the market by the National Agency for the Safety of Medicines and Health Products (ANSM).

Table 3. Calls for COVID-19 Vaccine Market Withdrawal.

Public Figures	November 25, 2024	NORTH Group [67]	Sent a letter of “extreme concern” to European heads of state calling for the suspension of modified mRNA vaccines due to serious concerns.
	December 4, 2024 (received email confirmation)	Children’s Health Defense [68]	We obtained email confirmation that Children’s Health Defence calls for the COVID-19 vaccines to be immediately removed from the market.
	December 2022, September 2023, January 2024	Dr. Peter McCullough [53, 54, 59]	Called for the complete market removal of COVID-19 vaccines due to excess risk of death in the US Senate, European Parliament, and US House of Representatives panel on vaccine injuries.
	2023-2024	Sen Ron Johnson, Rep Majorie Taylor Greene, and Rep Thomas Massie, among 228 elected U.S. officials [57]	Signed the Americans for Health Freedom pledge calling for “the COVID shots to be pulled off the market.”
	January 4, 2024	Florida Surgeon General – Dr. Joseph Ladapo [58]	Called for the removal of all mRNA COVID-19 vaccines citing contamination by cDNA fragments and genotoxicity risks.
	December 4, 2024 (received email confirmation)	Christine Anderson among 3 other Members of the European Parliament.	We obtained email confirmation that 4 members of European Parliament want the COVID-19 vaccines removed from the market: Christine Anderson (Germany), Cristian Terhes (Romania), Virginie Joron (France), and Gerald Hauser (Austria).
	December 5, 2024 (received email confirmation)	Gerard Rennick, Russell Broadbent, and Craig Kelly among 8 Australian elected officials.	We received email confirmation that 8 current and former Australian Federal Senators and Federal Members of Parliament have called for the removal of COVID-19 vaccines, including Gerard Rennick, Alex Antic, Malcolm Roberts, Ralph Babet, Matt Canavan, Pauline Hanson, Russell Broadbent, and Craig Kelly.

Table 3. Continued.

Conclusion

We expect that calls for an immediate moratorium on COVID-19 vaccines will continue to increase until a critical mass is reached, and the products are finally removed from the market. Excess mortality, negative efficacy, and widespread DNA contamination associated with COVID-19 vaccines have been sufficiently demonstrated. The FDA's criteria for a Class I recall have been far exceeded. No large-scale, conclusive, randomized, double-blind, placebo-controlled trials have demonstrated reduction in infection transmission, hospitalization, or death as primary endpoints. Thus, the COVID-19 vaccines are not proven to be effective in reducing important clinical outcomes. A position supporting COVID-19 vaccination goes against good medical practice and violates the Hippocratic Oath to above all, do no harm. Immediate removal of COVID-19 vaccines from the market is essential to prevent further loss of life and ensure the next steps for accountability are taken.

Acknowledgments

We want to thank Dr. Kenji Fujikawa, PhD, (Institute of Medical Statistics, Information, and Communications, Japan) for granting us permission to use the table he created, Verifications of mRNA Vaccine DNA Contamination in the World.

Funding: None

Conflicts of Interest: None

Institutional Review Board Statement: The paper did not require ethical approval.

References

1. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. N Engl J Med. 2020;383(27):2603-2615. doi:10.1056/NEJMoa2034577. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2034577>

2. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N Engl J Med*. 2021;384(5):403-416. doi:10.1056/NEJMoa2035389. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2035389>
3. Mead, M. N., Seneff, S., Wolfinger, R., Rose, J., Denhaerynck, K., Kirsch, S., & McCullough, P. A. (2024). COVID-19 Modified mRNA "Vaccines" Part 1: Lessons Learned from Clinical Trials, Mass Vaccination, and the Bio-Pharmaceutical Complex. *International Journal of Vaccine Theory, Practice, and Research*, 3(2), 1112-1178. doi: 10.56098/fdrasy50. <https://doi.org/10.56098/fdrasy50>
4. Jones JM, Manrique IM, Stone MS, et al. Estimates of SARS-CoV-2 Seroprevalence and Incidence of Primary SARS-CoV-2 Infections Among Blood Donors, by COVID-19 Vaccination Status - United States, April 2021-September 2022. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2023;72(22):601-605. Published 2023 Jun 2. doi:10.15585/mmwr.mm7222a3. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7222a3>
5. Centers for Disease Control and Prevention. COVID Data Tracker. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2024, December 01. <https://covid.cdc.gov/covid-data-tracker>
6. Procter, B.C, Ross C, Pickard V, et al. Early Ambulatory Multidrug Therapy Reduces Hospitalization and Death in High-Risk Patients with SARS-CoV-2 (COVID-19). *International Journal of Innovative Research in Medical Science*. 6, 03. (2021). 219-221. doi:10.23958/ijirms/vol06-i03/1100. <https://doi.org/10.23958/ijirms/vol06-i03/1100>
7. VAERS COVID Vaccine Adverse Event Reports. OpenVAERS. Published September 6, 2024. <https://www.openvaers.com/covid-data>
8. Rose J. Critical Appraisal of VAERS Pharmacovigilance: Is the U.S. Vaccine Adverse Events Reporting System (VAERS) a Functioning Pharmacovigilance System?. *Science, Public Health Policy and the Law*. 2021 Oct 01; v3.2019-2024.
9. Hulscher N, Alexander P E., Amerling R, et al. A Systematic Review Of Autopsy Findings In Deaths After COVID-19 Vaccination. *Science, Public Health Policy and the Law*. 2024 Nov 17; v5.2019-2024.
10. Rancourt DG, Baudin M, Hickey J, et al. COVID-19 Vaccine Associated Mortality in the Southern Hemisphere. *Journal of Research and Applied Medicine*. 2023. doi: 10.55634/2.2.10. <https://doi.org/10.55634/2.2.10>
11. Mostert S, Hoogland M, Huibers M, et al. Excess mortality across countries in the Western World since the COVID-19 pandemic: 'Our World in Data' estimates of January 2020 to December 2022: *BMJ Public Health* 2024;2:e000282. doi: 10.1136/bmjph-2023-000282. <https://doi.org/10.1136/bmjph-2023-000282>
12. Skidmore M. COVID-19 Illness and Vaccination Experiences in Social Circles Affect COVID-19 Vaccination Decisions. *Science, Public Health Policy and the Law*. 2023 Oct 02; v4.2019-2024.
13. Pantazatos S, Seligmann H. COVID vaccination and age-stratified all-cause mortality risk. *Research Gate* 2021 Oct 26. Epub Oct 26. DOI: 10.13140/RG.2.2.28257.43366. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.28257.43366>
14. Hulscher, N., Cook, M. J., Stricker, R. B., McCullough, P. A. (2024). Excess Cardiopulmonary Arrest and Mortality after COVID-19 Vaccination in King County, Washington. *J Emerg Med OA*, 2(1), 01-11. doi: 10.33140/JEMOA.02.01.12. <https://doi.org/10.33140/JEMOA.02.01.12>
15. Aarstad J, Kvitastein OA. Is There a Link between the 2021 COVID-19 Vaccination Uptake in Europe and 2022 Excess All-Cause Mortality? *Asian*

- Pac. J. Health Sci., 2023;10(1):25-31.
doi:10.21276/apjhs.2023.10.1.6.
<https://doi.org/10.21276/apjhs.2023.10.1.6>
- 16.** Alessandria M, Malatesta GM, Berrino F, Donzelli A. A Critical Analysis of All-Cause Deaths during COVID-19 Vaccination in an Italian Province. *Microorganisms*. 2024;12(7):1343. Published 2024 Jun 30. doi:10.3390/microorganisms12071343.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms12071343>
- 17.** Lataster R. European Excess Mortality Correlates with COVID-19 Vaccination into 2024. *Bulgarian Medicine*. vol. 13 no. 2/2023.
https://basa.bg/en/images/Br_02_2023_bulgarska_medicina.pdf
- 18.** Allen DE. The correlation between Australian excess deaths by state and booster vaccinations. *Med Res Arch*. 2024;12(7).
doi:10.18103/mra.v12i7.5485.
<https://doi.org/10.18103/mra.v12i7.5485>
- 19.** Kuhbandner C, Reitzner M. Differential increases in excess mortality in the German federal states during the COVID-19 pandemic. *ResearchGate*. 2024.
doi:10.13140/RG.2.2.13098.18880.
<https://doi.org/10.13140/RG.2.2.13098.18880>
- 20.** Rodrigues NCP, Andrade MK de N. Evaluation of post-COVID mortality risk in cases classified as severe acute respiratory syndrome in Brazil: a longitudinal study for medium and long term. *Front Med (Lausanne)*. 2024;11.
doi:10.3389/fmed.2024.1495428.
<https://doi.org/10.3389/fmed.2024.1495428>
- 21.** Recalls Background and Definitions. FDA. Published July 31, 2014. Accessed December 2, 2024.
<https://www.fda.gov/safety/industry-guidance-recalls/recalls-background-and-definitions>
- 22.** Regulatory Procedures Manual, Chapter 7: RECALL PROCEDURES. FDA. Published July 2021. Accessed January 2, 2024.
<https://www.fda.gov/media/71814/download>
- 23.** Enforcement Report. FDA. Accessed January 2 2024.
<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/ires/index.cfm>
- 24.** FDA medical device Class 1 recalls trend upward. *ORManager*. Published April 29, 2024. Accessed January 2, 2024.
<https://www.ormanager.com/briefs/fda-expert-express-concern-about-prevalence-of-medical-device-class-1-recalls/>
- 25.** Rhodes P, Parry PI. Pharmaceutical product recall and educated hesitancy towards new drugs and novel vaccines. *International Journal of Risk & Safety in Medicine*. 2024;0(0).
doi:10.1177/09246479241292008.
<https://doi.org/10.1177/09246479241292008>
- 26.** VAERS Analysis. VAERS summary for COVID-19 vaccines through 4/26/2024.
<https://vaersanalysis.info/2024/05/03/vaers-summary-for-covid-19-vaccines-through-4-26-2024/>
- 27.** Fitzpatrick M. The Cutter Incident: How America's First Polio Vaccine Led to a Growing Vaccine Crisis. *J R Soc Med*. 2006;99(3):156.
- 28.** Delage G. Rotavirus vaccine withdrawal in the United states; the role of postmarketing surveillance. *Can J Infect Dis*. 2000;11(1):10-12.
doi:10.1155/2000/414396.
<https://doi.org/10.1155/2000/414396>
- 29.** Eythorsson E, Runolfsson HL, Ingvarsson RF, Sigurdsson MI, Palsson R. Rate of SARS-CoV-2 Reinfection During an Omicron Wave in Iceland. *JAMA Netw Open*. 2022;5(8):e2225320. Published 2022 Aug 1.
doi:10.1001/jamanetworkopen.2022.25320.
<https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2022.25320>

[0](#)

- 30.** Chemaitelly H, Ayoub HH, AlMukdad S, et al. Duration of mRNA vaccine protection against SARS-CoV-2 Omicron BA.1 and BA.2 subvariants in Qatar. *Nat Commun.* 2022;13(1):3082. Published 2022 Jun 2. doi:10.1038/s41467-022-30895-3.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-30895-3>
- 31.** Shrestha NK, Burke PC, Nowacki AS, Simon JF, Hagen A, Gordon SM. Effectiveness of the Coronavirus Disease 2019 Bivalent Vaccine. *Open Forum Infect Dis.* 2023;10(6):ofad209. Published 2023 Apr 19. doi:10.1093/ofid/ofad209.
<https://doi.org/10.1093/ofid/ofad209>
- 32.** Feldstein LR, Ruffin J, Wiegand R, et al. Protection from COVID-19 vaccination and prior SARS-CoV-2 infection among children aged 6 months - 4 years, United States, September 2022-April 2023. *J Pediatric Infect Dis Soc.* Published online December 5, 2024. doi:10.1093/jpids/piae121.
<https://doi.org/10.1093/jpids/piae121>
- 33.** McKernan, Kevin, Yvonne Helbert, Liam T. Kane, and Stephen McLaughlin. 2023. "Sequencing of Bivalent Moderna and Pfizer Mrna Vaccines Reveals Nanogram to Microgram Quantities of Expression Vector Dsdna Per Dose." *OSF Preprints.* April 10. doi:10.31219/osf.io/b9t7m.
<https://doi.org/10.31219/osf.io/b9t7m>
- 34.** Anandamide. Vaccine targeted qPCR of Cancer Cell Lines treated with BNT162b2. Substack. Published February 25, 2024. Accessed December 4, 2024.
<https://anandamide.substack.com/p/vaccine-targeted-qpcr-of-cancer-cell>
- 35.** Anandamide. Fluorometry Deep Dive. Substack. Published November 25, 2023. Accessed December 4, 2024.
<https://anandamide.substack.com/p/fluorometry-dee-p-dive>
- 36.** Isn't Nitta's qPCR calibration curve off by a factor of 1,000? Institute of Medical Statistics and Information Communication. Published June 16, 2023. Accessed December 4, 2024.
<https://medicalstats.net/med/dna-stdcurves-20230616.html>
- 37.** Phillip Buckhaults - Pfizer vaccine contains pieces of the DNA plasmid. X (formerly Twitter). Published 2024. Accessed December 4, 2024.
https://x.com/P_J_Buckhaults/status/1684569351998038017
- 38.** Phillip Buckhaults - Plasmid DNA copy number quantification. protocols, reagents, and a thread of new results. X (formerly Twitter). Published 2024. Accessed December 4, 2024.
https://x.com/P_J_Buckhaults/status/1782551861083685223
- 39.** König B, Kirchner JO. Methodological Considerations Regarding the Quantification of DNA Impurities in the COVID-19 mRNA Vaccine Comirnaty®. *Methods and Protocols.* 2024; 7(3):41. Doi: 10.3390/mps7030041.
<https://doi.org/10.3390/mps7030041>
- 40.** Speicher, David J., Jessica Rose, L. M. Gutschi, David M. Wiseman, PhD, and Kevin McKernan. 2023. "DNA Fragments Detected in Monovalent and Bivalent Pfizer/biontech and Moderna Moderna COVID-19 Vaccines from Ontario, Canada: Exploratory Dose Response Relationship with Serious Adverse Events." *OSF Preprints.* October 19. doi:10.31219/osf.io/mjc97.
<https://doi.org/10.31219/osf.io/mjc97>
- 41.** Australian DNA CONTAMINATION Confirmed .. in Australian vials of Pfizer and Moderna .. NOT safe for Humans. Substack.com. Published June 6, 2024. Accessed December 4, 2024.
<https://julesonthebeach.substack.com/p/australian-dna-contamination-confirmed>
- 42.** Didier Raoult. Confirmation of the presence of

vaccine DNA in the Pfizer anti-COVID-19 vaccine. 2024. HAL. <https://hal.science/hal-04778576v1>

43. Kämmerer U, Schulz V, Steger K. BioNTech RNA-Based COVID-19 Injections Contain Large Amounts Of Residual DNA Including An SV40 Promoter/Enhancer Sequence. *Science, Public Health Policy and the Law*. 2024 Dec 03; v5.2019-2024.

44. Wang TJ, Kim A, Kim K. A rapid detection method of replication-competent plasmid DNA from COVID-19 mRNA vaccines for quality control. *J High Sch Sci*. 2024;8(4):427-439.

45. Yang H. Establishing acceptable limits of residual DNA. *PDA J Pharm Sci Technol*. 2013;67(2):155-163.
doi:10.5731/pdajpst.2013.00910
<https://doi.org/10.5731/pdajpst.2013.00910>

46. Rotondo JC, Mazzoni E, Bononi I, Tognon M, Martini F. Association Between Simian Virus 40 and Human Tumors. *Front Oncol*. 2019;9:670. Published 2019 Jul 25. doi:10.3389/fonc.2019.00670.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00670>

47. Institute of Medicine (US) Immunization Safety Review Committee, Stratton K, Almarino DA, McCormick MC, eds. *Immunization Safety Review: SV40 Contamination of Polio Vaccine and Cancer*. Washington (DC): National Academies Press (US); 2002.

48. Urgent Open Letter from Doctors and Scientists to the European Medicines Agency regarding COVID-19 Vaccine Safety Concerns. *Doctors for COVID Ethics*. Published March 10, 2021. Accessed December 2, 2024.
<https://doctors4covidethics.org/urgent-open-letter-from-doctors-and-scientists-to-the-european-medicines-agency-regarding-covid-19-vaccine-safety-concerns/>

49. Bruno R, McCullough PA, Vila T, et al. SARS-

CoV-2 mass vaccination: Urgent questions on vaccine safety that demand answers from international health agencies, regulatory authorities, governments and vaccine developers. *Authorea*. May 24, 2021. doi: 10.22541/au.162136772.22862058/v2.
<https://doi.org/10.22541/au.162136772.22862058/v2>

50. DECLARATION, CEASE AND DESIST AND NOTICE OF LIABILITY - WORLD COUNCIL FOR HEALTH CALLS FOR AN IMMEDIATE STOP TO THE COVID-19 EXPERIMENTAL "VACCINES". *World Council For Health*. Published November 29, 2021. Accessed December 2, 2024.
<https://wchweb.b-cdn.net/web/downloads/Article-Files/cease-and-desist/cease-and-desist-1-2.pdf>

51. 17,000 doctors call for end to COVID-19 emergency. *Clark County Today*. Published May 17, 2022. Accessed December 2, 2024.
<https://www.clarkcountytoday.com/news/17000-doctors-call-for-end-to-covid-19-emergency/>

52. Request to stop the vaccination campaign in children and adolescents with vaccine platforms based on synthetic mRNA. *APSIIN*. Published October 2022. Accessed December 4, 2024.
<https://apsiin.cl/apsiin/solicitud-detencion-inoculacion-arnms-nna/>

53. Dr. McCullough US Senate: to Save Lives Pull the COVID-19 Vaccines off the Market. *Rumble*. Published 2022. Accessed December 2, 2024.
<https://rumble.com/v1zkz94-dr.-mccullough-us-senate-to-save-lives-pull-the-covid-19-vaccines-off-the-m.html>

54. Peter A. McCullough, MD, MPH testifies in the European Parliament to end all COVID vaccinations. *Rumble*. Published 2023. Accessed December 2, 2024.
<https://rumble.com/v3ho9hg-peter-a.-mccullough-md-mph-testifies-in-the-european-parliament-to-end-all.html>

55. COVID-19: Doctors' Group Says to Recall

Vaccine. Association of American Physicians and Surgeons. Published March 21, 2023. Accessed December 2, 2024.

<https://aapsonline.org/covid-19-doctors-group-says-to-recall-vaccine/>

56. National Citizens Inquiry Recommends Immediate Halt to COVID-19 Vaccinations. National Citizen's Inquiry. Published September 14, 2023. Accessed December 2, 2024.

<https://nationalcitizensinquiry.ca/national-citizens-inquiry-recommends-immediate-halt-to-covid-19-vaccinations/>

57. Foundational Project. Americans for Health Freedom. Published 2024. Accessed December 2, 2024. <https://www.americansforhealthfreedom.org/>

58. Florida State Surgeon General Calls for Halt in the Use of COVID-19 mRNA Vaccines. Florida Department of Health. Published January 3, 2024. Accessed December 2, 2024. <https://content.govdelivery.com/accounts/FLDOH/bulletins/3816863>

59. US Congress Learns about Long-Term Harms from COVID-19 Vaccination. Rumble. Published 2024. Accessed December 2, 2024. <https://rumble.com/v46tcwn-us-congress-learns-about-long-term-harms-from-covid-19-vaccination.html>

60. NZDSOS Comprehensive Letter to Parliament . New Zealand Doctors Speaking Out With Science. Published February 29, 2024. Accessed December 4, 2024. <https://nzdsos.com/2024/03/07/nzdsos-comprehensive-letter-to-parliament/>

61. McCullough Foundation. X (formerly Twitter). Accessed December 2, 2024. <https://x.com/McCulloughFund>

62. Mead, M. N., Seneff, S., Rose, J., Wolfinger, R., Hulscher, N., & McCullough, P. A. (2024). COVID-19

Modified mRNA "Vaccines": Lessons Learned from Clinical Trials, Mass Vaccination, and the Bio-Pharmaceutical Complex, Part 2. International Journal of Vaccine Theory, Practice, and Research, 3(2), 1246-1315. doi: 10.56098/w66wjg87.

<https://doi.org/10.56098/w66wjg87>

63. The Hope Accord. Published July 3, 2024. Accessed December 2, 2024. <https://thehopeaccord.org/>

64. Legal Action for the Withdrawal of Comirnaty and Spikevax Vaccines from the Market by the ANSM (French regulator). X (formerly Twitter). Published October 11, 2024. Accessed December 4, 2024. <https://x.com/StatChrisCotton/status/1851185139935588639>

65. Rogers, C., Thorp, J., Cosgrove, K., & McCullough, P. (2024). COVID-19 Vaccines: A Risk Factor for Cerebral Thrombotic Syndromes. International Journal of Innovative Research in Medical Science, 9(11), 621-627. doi: 10.23958/ijirms/vol09-i11/1982. <https://doi.org/10.23958/ijirms/vol09-i11/1982>

66. Oldfield P, Gutschi M, McCullough PA, et al. (2024). Pfizer/BioNTech's COVID-19 modRNA Vaccines: Dangerous Genetic Mechanism of Action Released before Sufficient Preclinical Testing. Journal of American Physicians and Surgeons, 29(4), 118-126.

67. Notice of Extreme Concern about COVID-19 Modified MRNA Vaccine Safety and Quality to Prime Ministers and Governing Bodies of the Nordic and Baltic Countries and the United Kingdom.; 2024. Accessed December 2, 2024. https://northgroup.info/pdfs/NORTH_Group_Letter-2024-11-25.pdf

68. Children's Health Defense. Accessed December 4, 2024. <https://childrenshealthdefense.org/>

Recensione: Si intensificano le richieste di ritiro dal mercato dei vaccini contro il COVID-19, poiché i rischi superano di gran lunga i benefici teorici

Nicolas Hulscher^{1*}, Mary T. Bowden², Peter A. McCullough¹

Abstract

Le campagne di vaccinazione contro il COVID-19 in tutto il mondo non hanno soddisfatto gli standard fondamentali di sicurezza ed efficacia, portando a prove crescenti di danni significativi. Oltre 81.000 medici, scienziati, ricercatori e cittadini preoccupati, 240 funzionari governativi eletti, 17 organizzazioni professionali di sanità pubblica e medici, 2 partiti repubblicani statali, 17 comitati repubblicani di contea e 6 studi scientifici provenienti da tutto il mondo hanno chiesto il ritiro dal mercato dei vaccini contro il COVID-19. Al 6 settembre 2024, il CDC ha documentato 19.028 decessi negli Stati Uniti segnalati al Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS) da operatori sanitari o aziende farmaceutiche che ritengono che il prodotto sia correlato al decesso. Il numero totale di decessi correlati al vaccino COVID-19 segnalati al VAERS (37.544 in tutti i paesi partecipanti) ha superato di gran lunga i limiti di richiamo dei precedenti ritiri di vaccini, fino al 375.340%. I criteri per un richiamo di Classe I della FDA, che si applica ai prodotti con una probabilità ragionevole di causare gravi conseguenze negative per la salute o la morte, sono stati ampiamente superati. L'eccesso di mortalità, l'efficacia negativa, la contaminazione diffusa del DNA e la mancanza di una riduzione dimostrata della trasmissione, dell'ospedalizzazione o della mortalità hanno minato le ragioni alla base della continuazione della somministrazione. Queste richieste unificate di intervento normativo sottolineano le gravi carenze nel monitoraggio della sicurezza dei dati e nella mitigazione dei rischi. La rimozione immediata dei vaccini COVID-19 dal mercato è essenziale per prevenire ulteriori perdite di vite umane e garantire che vengano adottate le misure necessarie per garantire la responsabilità dei danni subiti.

*Corrispondenza: nichulscher@gmail.com

1. McCullough Foundation, Dallas, TX

2. Americans for Health Freedom, Houston, TX

Parole chiave

Vaccino COVID-19, contaminazione da DNA, mortalità in eccesso, ritiro dal mercato, efficacia negativa, richiami farmaceutici

Introduzione

L'approvazione dei vaccini contro il COVID-19 si è basata su procedure accelerate di autorizzazione all'uso di emergenza (EUA) che hanno dato priorità alla gestione dell'urgente crisi sanitaria causata dal SARS-CoV-2. I primi studi randomizzati controllati (RCT) hanno dimostrato una riduzione del rischio relativo del 95% di COVID-19 sintomatico, un parametro che ha sostenuto la decisione di una diffusione su larga scala [1, 2]. Tuttavia, questi studi presentano gravi problemi metodologici [3]. Gli studi sono stati interrotti prematuramente e i gruppi placebo sono stati svelati, eliminando di fatto la possibilità di valutare la sicurezza a lungo termine e gli eventi avversi. Sono stati esclusi sottogruppi chiave, come bambini, donne in gravidanza e individui immunocompromessi, e gli endpoint degli studi si sono concentrati sulla riduzione dei sintomi lievi piuttosto che sulla malattia grave o sulla mortalità. Questo bias di progettazione ha limitato la capacità di valutare il vero profilo rischio-beneficio dei vaccini [3].

Il CDC ha stimato che il 70,3% degli americani di età ≥ 16 anni avevano contratto il COVID-19 entro settembre 2022, utilizzando gli anticorpi SARS-CoV-2 come parametro di misurazione [4]. Al 1° dicembre 2024, stimiamo che almeno il 90% dell'intera popolazione statunitense abbia contratto il COVID-19 e abbia sviluppato un'immunità naturale al SARS-CoV-2. Il CDC ha riportato 1.212.008 decessi avvenuti tra il 1° gennaio 2020 e il 23 novembre 2024, con un test positivo al COVID-19 in un momento precedente alla morte [5]. Tra questi, il 94% aveva più di 50 anni. Se la valutazione fosse stata effettuata da medici esperti, stimiamo che circa il 10% del numero totale delle vittime, ovvero 121.200 decessi, potrebbe avere come causa primaria la polmonite da COVID-19.

morte. Procter et al. hanno pubblicato che l'85% di questi decessi avrebbe potuto essere evitato con protocolli multidrug iniziati il primo giorno a casa [6]. La figura 1 mostra che, al 6 settembre 2024, il CDC ha registrato 19.028 decessi americani da vaccino COVID-19 segnalati al Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS) da operatori sanitari o aziende farmaceutiche che ritengono che il prodotto sia correlato al decesso [7]. Circa 1175 decessi si sono verificati lo stesso giorno della vaccinazione e 1250 il giorno successivo. Si stima che i decessi segnalati nel VAERS siano sottostimati di un fattore conservativo di 31, sulla base di un confronto tra i tassi di eventi avversi gravi (SAE) attesi dagli studi clinici e le segnalazioni osservate nel VAERS [8]. I dati degli studi clinici di Pfizer indicavano un tasso di SAE dello 0,7%, che, applicato ai 197 milioni di dosi di vaccini COVID-19 somministrate negli Stati Uniti fino ad agosto 2021, suggerirebbe circa 1,4 milioni di SAE previsti. Tuttavia, il VAERS ha documentato un numero molto inferiore di casi, portando alla conclusione che solo 1 decesso o evento avverso grave su 31 viene registrato nel sistema VAERS a causa della sua natura passiva e delle note difficoltà di segnalazione [8]. Ciò significa che il bilancio delle vittime americane della vaccinazione contro il COVID-19 potrebbe essere di 589.868 (19.028×31). Pertanto, è nostra opinione che più americani potrebbero essere morti a causa della vaccinazione contro il COVID-19 che a causa dell'infezione da SARS-CoV-2.

Esistono oltre 3400 articoli sottoposti a revisione paritaria nella letteratura medica riguardanti lesioni mortali e non mortali causate dal vaccino COVID-19, comprese quelle riconosciute dalle agenzie regolatorie di tutto il mondo, quali miocardite, lesioni neurologiche, trombosi e sindromi immunologiche. Nuove evidenze provenienti da diversi set di dati globali indicano modelli di eventi avversi preoccupanti e tendenze di mortalità associate alle campagne di vaccinazione contro il COVID-19, sollevando questioni critiche sul rapporto rischio-beneficio e sulla sicurezza a lungo termine. A causa di queste significative preoccupazioni, abbiamo esaminato la letteratura scientifica alla ricerca di casi di mortalità in eccesso, contaminazione del DNA

e l'efficacia negativa associati ai vaccini contro il COVID-19

, oltre a compilare un elenco completo
elenco di tutte le richieste di moratoria immediata.

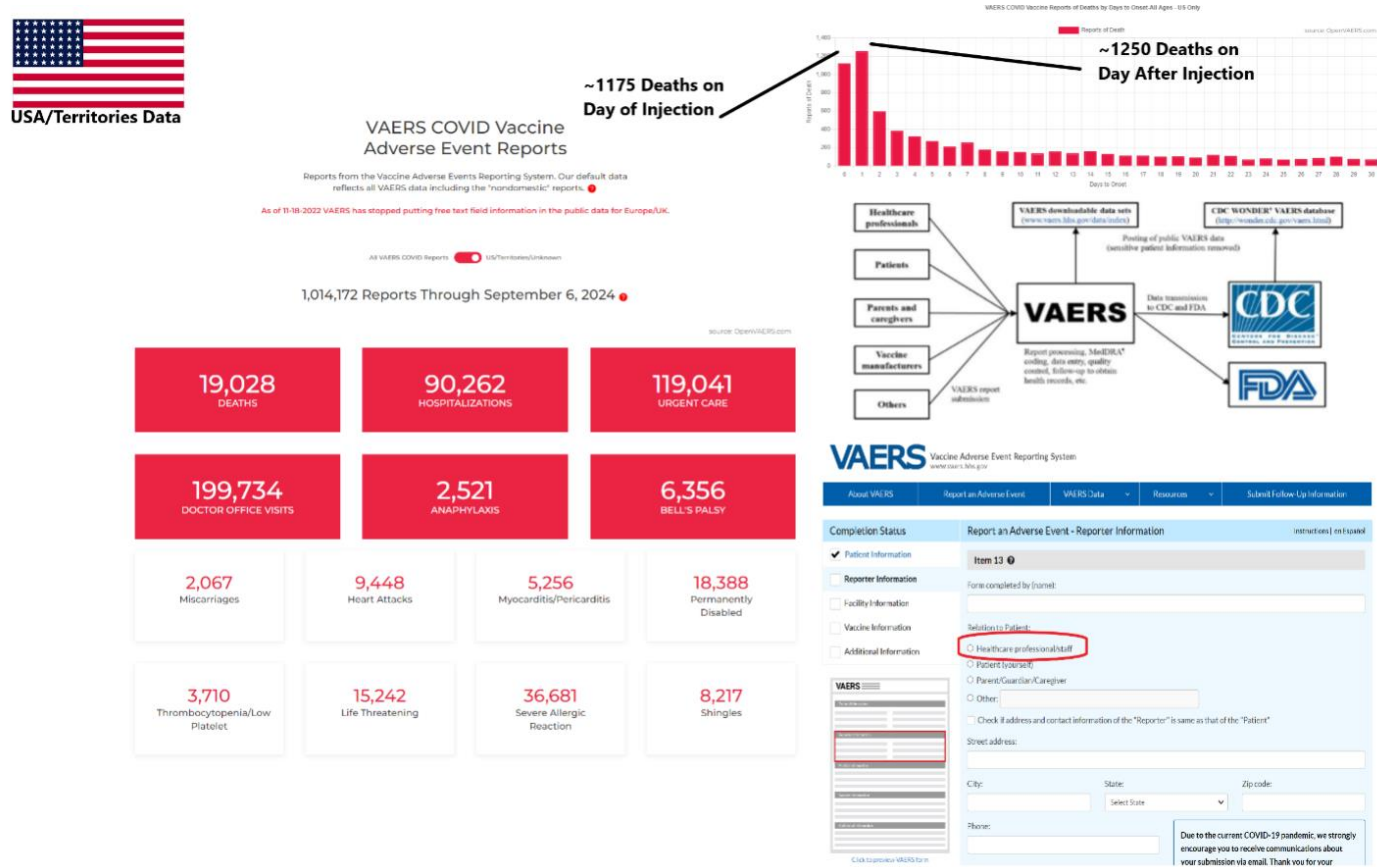


Figura 1. Segnalazioni di eventi avversi relativi al vaccino COVID-19 negli Stati Uniti (VAERS). Adattato da OpenVAERS [7].

Mortalità in eccesso

Anziché salvare vite umane, la vaccinazione di massa contro il COVID-19 ha probabilmente portato ad un aumento della mortalità (Tabella 1) [9-20]. Il più ampio studio autoptico pubblicato fino ad oggi indica che il 73,9% dei decessi dopo la vaccinazione sono una causa diretta o hanno contribuito in modo significativo alla vaccinazione contro il COVID-19, dimostrando un'alta probabilità di un nesso causale tra i vaccini contro il COVID-19 e la morte [9]. Entro settembre 2023, Rancourt et al. hanno stimato 17 milioni di decessi correlati al vaccino COVID-19 in tutto il mondo [10]. Mostert et al. hanno riportato 3,1 milioni di decessi in eccesso potenzialmente attribuibili alla vaccinazione COVID-19 e ai lockdown in 47 paesi occidentali dal 2020 al 2022 [11].

La significativa discrepanza nei dati sulla mortalità in eccesso tra Rancourt e Mostert deriva probabilmente dall'ambito e dal periodo di riferimento delle loro stime: l'analisi di Rancourt prende in considerazione 195 paesi fino alla fine del 2023, mentre quella di Mostert si concentra su 47 paesi occidentali fino al 2022. Negli Stati Uniti, Skidmore ha stimato che entro dicembre 2021 potrebbero morire 278.000 americani a causa dei vaccini contro il COVID-19 [12], mentre Pantazatos e Seligmann prevede tra 146.000 e 187.000 decessi associati al vaccino entro agosto 2021 [13]. Hulscher et al. hanno stimato 49.240 decessi per arresto cardiaco in eccesso negli Stati Uniti tra il 2021 e il 2023, potenzialmente collegati alla vaccinazione contro il COVID-19 [14]. Aarstad e Kvitastein hanno riscontrato un'associazione significativa tra una maggiore

somministrazione del vaccino e un aumento della mortalità per tutte le cause [15]. Alessandria et al. hanno rivelato che le persone vaccinate con una o due dosi erano esposte a un rischio di mortalità per tutte le cause più elevato rispetto alle persone non vaccinate, con una perdita del 37% dell'aspettativa di vita durante il follow-up per coloro che avevano ricevuto due dosi [16]. Lataster ha inoltre dimostrato una correlazione positiva costante tra i tassi di vaccinazione contro il COVID-19 e la mortalità in eccesso per ogni mese analizzato [17]. Allen ha scoperto una correlazione significativa tra i decessi in eccesso in Australia e il richiamo del vaccino contro il COVID-19.

iniezioni, mentre non è stata osservata alcuna correlazione significativa con la popolazione non vaccinata [18]. Kuhbandner e Reitzner hanno osservato una correlazione positiva significativa tra i tassi di vaccinazione contro il COVID-19 e l'aumento della mortalità in eccesso durante il secondo e il terzo anno della pandemia in Germania, con questa correlazione che è diventata particolarmente pronunciata nel terzo anno [19]. Rodrigues e Andrade hanno scoperto che la vaccinazione contro il COVID-19 quasi raddoppia il rischio di morte per tutte le cause dopo un anno dall'infezione da COVID [20].

Study/Data Source	Key Finding
Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS) [7]	By September 6, 2024, the CDC has recorded 19,028 American COVID-19 vaccine deaths reported to them by healthcare professionals or pharmaceutical companies who believe the product is related to the death. The deaths reported in VAERS are estimated to be underreported by a conservative multiplier of 31 [5]. This means the American death toll from COVID-19 vaccination may be 589,868 (19,028 x 31).
Hulscher et al. [9]	Demonstrated a high likelihood of a causal link between COVID-19 vaccines and death and estimated that 73.9% of deaths after vaccination are directly caused or significantly contributed to by COVID-19 vaccination.
Rancourt et al. [10]	Estimated 17 million COVID-19 vaccine-related deaths worldwide by September 2023.
Mostert et al. [11]	Reported 3.1 million excess deaths potentially attributed to COVID-19 vaccination and lockdowns across 47 Western countries from 2020 to 2022.
Skidmore [12]	Estimated 278,000 Americans may have died from COVID-19 vaccines by December 2021.
Pantazatos and Seligmann [13]	Projected between 146,000 to 187,000 vaccine-associated deaths in the United States by August 2021.
Hulscher et al. [14]	Estimated 49,240 excess cardiac arrest deaths in the U.S. between 2021 and 2023, potentially linked to COVID-19 vaccination.
Aarstad and Kvitastein [15]	Found a significant association between higher vaccine uptake and increased all-cause mortality.
Alessandria et al. [16]	Revealed higher all-cause mortality risks for those vaccinated with one or two doses compared to unvaccinated individuals, with two doses leading to a 37% reduction in life expectancy during follow-up.
Lataster [17]	Demonstrated a consistent positive correlation between COVID-19 vaccination rates and excess mortality for every month analyzed.
Allen [18]	Uncovered a significant correlation between Australian excess deaths and COVID-19 booster injections, whereas no significant correlation was observed with the unvaccinated population.
Kuhbandner and Reitzner [19]	Observed a significant positive correlation between COVID-19 vaccination rates and the rise in excess mortality during the second and third pandemic years in Germany, with this correlation becoming particularly pronounced in the third year [19].
Rodrigues and Andrade [20]	Found that COVID-19 vaccination nearly doubles the risk of death from all causes after one-year post-COVID infection.

Tabella 1. Mortalità in eccesso dovuta al vaccino contro il COVID-19.

Mentre questi studi evidenziano correlazioni preoccupanti e potenziali nessi causali tra

vaccini COVID-19 e la morte, i calcoli e i risultati riportati sono soggetti a diverse limitazioni.

La variabilità nella qualità dei dati tra i diversi studi, l'affidabilità dei dati osservazionali e potenziali fattori di confondimento quali condizioni di salute preesistenti, distorsioni nella segnalazione e registrazioni incomplete delle vaccinazioni possono influenzare i risultati. Inoltre, la causalità non può essere stabilita in modo definitivo sulla base delle sole correlazioni, rendendo necessarie ulteriori indagini attraverso studi longitudinali ben controllati. Ciononostante, questi risultati sollevano profonde preoccupazioni circa la sicurezza e l'impatto sulla salute pubblica dei programmi di vaccinazione contro il COVID-19.

Richiamo di classe I indicato dalla FDA

La soglia della FDA per un richiamo di Classe I, definita come una situazione in cui l'uso o l'esposizione a un prodotto non conforme comporta una probabilità ragionevole di causare gravi conseguenze negative per la salute o la morte.

[21]—è stato ampiamente superato. Ciò comporta il ritiro completo di un prodotto dai mercati pubblici. Nella maggior parte dei casi, i richiami di prodotti sono avviati dalla società stessa, volontariamente o su raccomandazione della FDA, con la FDA che supervisiona il processo di richiamo. Tuttavia, per i vaccini, i prodotti biologici, i dispositivi medici e le sostanze controllate, la FDA ha l'autorità di imporre un richiamo se necessario [22]. La FDA ritira migliaia di prodotti ogni anno e il numero di ritiri di Classe I continua a crescere [23]. Secondo Anne Reid, direttrice del programma dell'Ufficio per i dispositivi medici e le operazioni di salute radiologica (OMDRHO), Ufficio per gli affari regolatori (ORA) della FDA, "I dispositivi medici sono in testa alla classifica dei prodotti richiamati negli anni fiscali dal 2012 al 2024, con un totale di 32.336 richiami in quel periodo rispetto ad altri tipi di prodotti come alimenti e cosmetici (26.184 richiami), farmaci (16.137 richiami) e prodotti biologici (11.605 richiami)" [24].

Al 26 aprile 2024, secondo il VAERS, il numero totale di decessi segnalati in seguito alla somministrazione del vaccino COVID-19

(37.544 tra tutti i paesi che utilizzano il VAERS) hanno superato di gran lunga i limiti di richiamo dei precedenti ritiri di vaccini fino al 375.340% (Figura 2) [25, 26]. Nel 1955, il vaccino contro la poliomielite Cutter fu immediatamente ritirato dopo 10 segnalazioni di decessi [27]. Il vaccino contro l'influenza suina del 1976 è stato ritirato dopo 53 decessi segnalati [25]. Nel 1999, il vaccino Rotashield è stato sospeso dopo 15 casi di intussuscezione [28]. Il notevole contrasto tra le segnalazioni di decessi causati dal vaccino COVID-19 e i ritiri storici dei vaccini indica significative carenze nel monitoraggio della sicurezza dei dati.

Efficacia negativa

Diversi studi hanno dimostrato che le persone vaccinate contro il COVID-19 possono essere esposte a un rischio maggiore di infezione rispetto alle persone non vaccinate. Eythorsson et al. hanno scoperto che le persone vaccinate con due o più dosi avevano un rischio di reinfezione superiore del 42% rispetto a quelle con una dose o meno [29]. Chemaitelly et al. hanno stimato che l'efficacia dei vaccini Pfizer-BioNTech (BNT162b2) e Moderna (mRNA-1273) contro le sottovarianti di Omicron è diminuita in modo significativo, raggiungendo livelli di efficacia negativi (-17,8% e -12,1% per Pfizer; -10,2% e -20,4% per Moderna) dopo sette mesi [30]. Shrestha et al. hanno riscontrato un aumento del rischio di infezione da COVID-19 dipendente dalla dose, con un rischio maggiore del 253% nelle persone che avevano ricevuto più di tre dosi rispetto a quelle non vaccinate [31]. Analogamente, Feldstein et al. hanno rivelato che i bambini vaccinati di età compresa tra 6 mesi e 4 anni senza precedente infezione avevano il 159% in più di probabilità di contrarre l'infezione e il 257% in più di probabilità di sviluppare COVID-19 sintomatico rispetto ai loro coetanei non vaccinati [32]. Questi risultati sollevano seri dubbi sull'efficacia e la sicurezza a lungo termine delle dosi ripetute di vaccino contro il COVID-19, suggerendo che continuare a fare affidamento su questa strategia potrebbe inavvertitamente aumentare la suscettibilità all'infezione e gli esiti avversi.

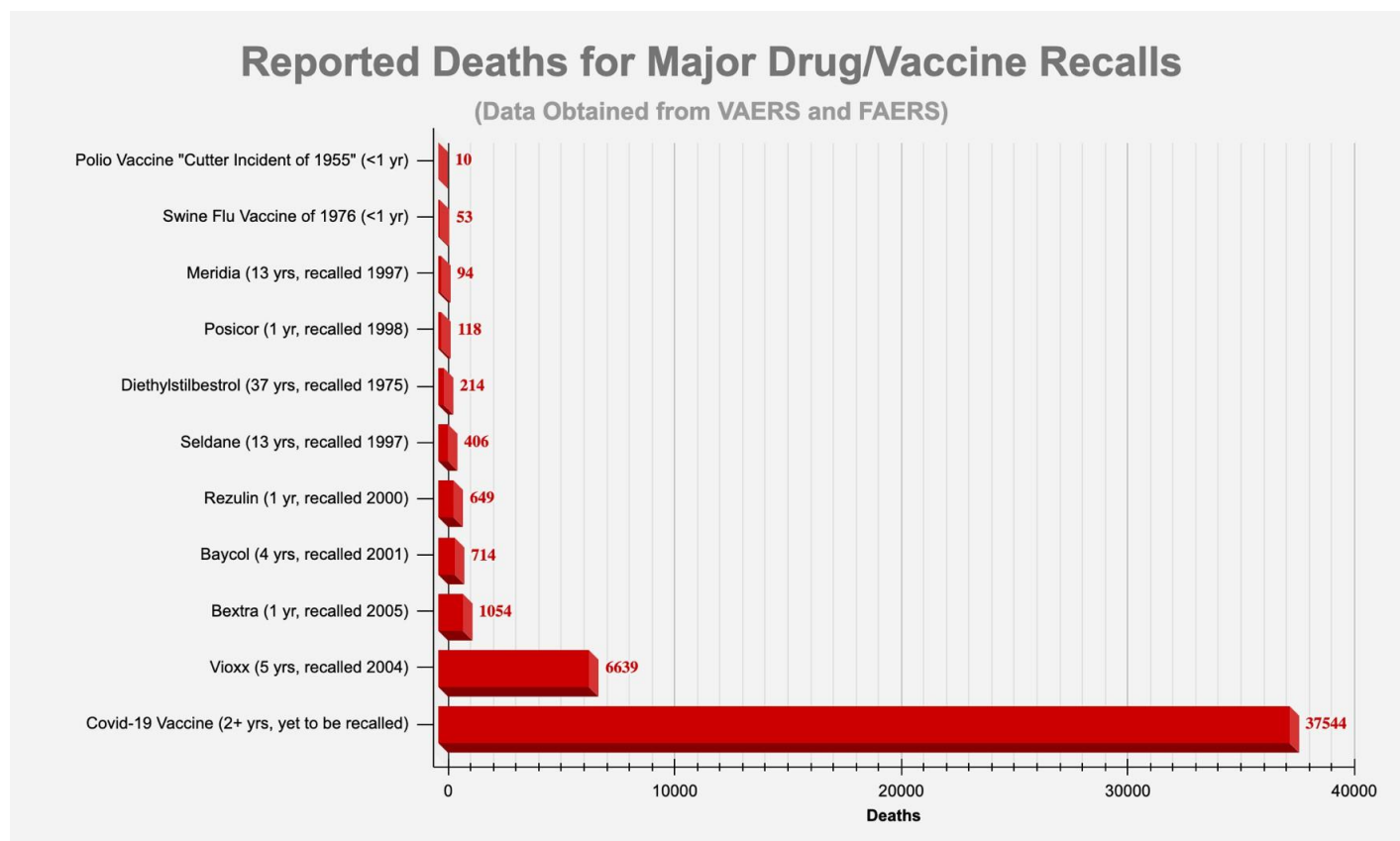


Figura 2. Decessi segnalati per i principali richiami di farmaci/vaccini rispetto al totale dei decessi da vaccino COVID-19 segnalati al VAERS. *Figura riprodotta da Rhodes e Parry [25], che hanno ottenuto l'autorizzazione dall'analisi VAERS per utilizzare la loro figura [26]. L'autorizzazione all'uso di questa figura è stata concessa in conformità con la licenza Creative Common CC BY-NC 4.0 ad accesso libero.

Contaminazione del DNA

Gli studi che hanno esaminato la contaminazione del DNA e la potenziale integrazione genica dei vaccini contro il COVID-19 hanno rivelato risultati preoccupanti (Tabella 2) [33-44]. McKernan et al. della Medicinal Genomics (USA) hanno riportato livelli di DNA che superano di gran lunga la soglia di sicurezza nei vaccini Pfizer e Moderna, con misurazioni che raggiungono i 3.390 ng per dose utilizzando metodi di elettroforesi e fluorimetria. I loro risultati includevano prove di integrazione genica e sequenze SV40 nelle cellule tumorali, sollevando preoccupazioni che sono state segnalate alla FDA e presentate al World Council for Health (WCH) [33-35]. Nitta (Giappone) ha riscontrato una contaminazione minima di DNA nei vaccini Moderna, pari a 0,1 ng, ritenuta trascurabile [36]. Buckhaults (USA) ha dimostrato l'integrazione del DNA nelle cellule epiteliali umane

, con concentrazioni di DNA comprese tra

Da 0,6 a 18,7 ng, sottolineando il potenziale di eventi avversi [37, 38]. König e Kirchner (Germania) hanno identificato livelli di contaminazione da DNA compresi tra 3.600 e 5.340 ng, sottoponendo i loro risultati alle autorità sanitarie tedesche e pubblicandoli su una rivista sottoposta a revisione paritaria [39]. Speicher, Rose e McKernan et al. (Canada) hanno scoperto livelli di DNA fino a 5.100 ng in diversi lotti di vaccini, sollevando notevoli preoccupazioni e presentando i loro risultati al WCH [40]. Speicher ha anche segnalato un'elevata contaminazione da DNA in campioni di vaccini australiani, con livelli totali di DNA compresi tra 451 ng e 1.420 ng dopo trattamento con RNaseA/DNaseI e fino a 14,69 ng di sequenze SV40 [41]. Questi risultati sono stati segnalati alla Therapeutic Goods Administration (TGA). Raoult et al. (Francia) hanno analizzato il vaccino Pfizer

campioni, riportando livelli medi di contaminazione da DNA pari a 216 ng, che sono ulteriormente aumentati a 5.160 ng dopo il trattamento con Triton-X-100, sollevando significative preoccupazioni in materia di sicurezza [42]. Kämmerer et al. (Germania) hanno esaminato campioni del vaccino Pfizer e hanno riscontrato livelli di contaminazione da DNA compresi tra 2.712 e 3.683 ng dopo il trattamento con Triton-X-100 [43]. Inoltre, ulteriori analisi con RNaseA hanno mostrato livelli di DNA compresi tra 32,71 e 42,09 ng, confermando che i livelli di contaminazione da DNA superavano i limiti normativi. Hanno dimostrato che il DNA derivato dal vaccino

potesse trasfettare le cellule HEK293, sollevando notevoli preoccupazioni circa l'integrazione genica e potenziali eventi avversi [43]. Wang et al. (USA) hanno analizzato sei fiale provenienti da due lotti di vaccini Pfizer e hanno rilevato una significativa contaminazione residua da DNA che superava di gran lunga i limiti normativi, con quantità comprese tra 3.450 e 6.550 ng per dose utilizzando la spettrofotometria UV-Vis (NanoDrop) e tra 41,4 e 109,5 ng per dose tramite analisi fluorometrica di quantificazione del dsDNA (Qubit) [44].

Researcher	Affiliation, Country	Pharma Company	# of Vials	First reported	Methods	DNA/dose (limit 10 ng)	DNA/RNA ratio (limit 1/3030)	Concerns	Publication
McKernan, K. [33-35]	Medicinal Genomics, US	Pfizer, Moderna	a dozen	2023-04	Electrophoresis (Agilent)	2250 ng – 3390 ng*	1/8 – ½	Adverse events, Gene integration	Reported to FDA Presented at FDA Presented at WCH Reported by Epoch times Found gene integration in OvCar3 cancer cells transfected by Kämmerer Found SV40 in tumors
					Fluorometer (Qubit)	312 ng – 843 ng*	1/47 – 1/8		
					qPCR/RT-qPCR	12 ng	1/161 – 1/43		
		Pfizer, Moderna, Daiichi-Sankyo (Japan)	5	2023-11	Fluorometer (Qubit)	17.5 – 61.8 ng (after Triton-X/RnaseA)			
					qPCR	88.8 ng (Pfizer)			
Nitta, T. [36]	Tokyo Univ, Japan	Moderna	1 or 2	2023-06	qPCR/RT-qPCR	0.1 ng**	1/1,000,000	No Problem	No publication
Buckhaults, P. J. [37, 38]	USC, US	Pfizer, Moderna	some	2023-07	qPCR	0.6 ng -- 18.7 ng		Adverse events, Gene integration	Presented in South Carolina Senate Presented gene integration to normal human epithelial stem cells
		Pfizer 2020, Pfizer 2023, Moderna 2020, Moderna 2023	4	2024-04	qPCR	7.7 ng (SV40, Pfizer) 4.5 -- 5.5 ng (Neo/Kan, Pfizer) 1.5 -- 9.0 ng (ORI, Pfizer) 2.5 -- 18.7 ng (Spike, Pfizer) 0.002 -- 0.004ng (ORI, Moderna 2023)			
König, B. Kirchner, J. O. [39]	MMD, Germany Indep., Germany	Pfizer, Moderna	4	2023-09	Fluorometer (Qubit)	3600 ng – 5340 ng	1/12 -- 1/7	Adverse events, Gene integration	Reported to the German Ministry of Health Reported by local public broadcasting MDPI peer-reviewed paper

Tabella 2. Verifiche della contaminazione da DNA del vaccino mRNA nel mondo. I riquadri rossi indicano una contaminazione da DNA superiore al limite normativo di 10 ng per dose clinica. *Valore moltiplicato per 300 per ul. **Dalla descrizione di DNA 44x10fg a mRNA 400 ng, il calcolo per Moderna 1 dose come mRNA 100 ug. Crediti per la creazione della tabella e l'estrazione dei dati: Dr. Kenji Fujikawa, PhD, Istituto di Statistica Medica, Informazione e Comunicazione, Giappone. (@hudikaha su X)

Researcher	Affiliation, Country	Pharma Company	# of Vials	First reported	Methods	DNA/dose (limit 10 ng)	DNA/RNA ratio (limit 1/3030)	Concerns	Publication
Speicher, D. J.	University of Guelph, Canada	Pfizer, Moderna	27	2023-10	Fluorometer (Qubit)	1896 ng – 5100 ng		Adverse events, Gene integration	Presented at WCH
McKernan, K. [40]	Medicinal Genomics, US				qPCR	0.22 ng -- 2.43 ng (Spike) 0.01 ng -- 4.27 ng (ORI)			
Speicher, D. J. [41]	University of Guelph, Canada	Pfizer, Moderna (Australia)	3	2024-06	Fluorometer (Qubit)	451 ng – 1420 ng (after RNaseA/DNaseI)		Adverse events, Gene integration	Reported to Therapeutic Goods Administration (TGA) Under litigation
					qPCR	6.46 ng -- 163.68 ng (Spike) 0.54 ng -- 12.97 ng (ORI) 3.70 ng -- 14.69 ng (SV40, Pfizer)			
Raoult, D. [42]	Aix-Marseille Univ (Former Prof), France	Pfizer	some	2024-11	Fluorometer (Qubit)	216 ng (Avg) 5160 ng (Avg, after Triton-X-100)		Gene integration	Preprint
Kämmerer, U. [43]	Univ. Hospital of Würzburg, Germany	Pfizer	4	2024-12	Fluorometer (Qubit)	2712 – 3683 ng (after Triton-X-100) 32.71 -- 42.09 ng (after Triton-X-100/RNaseA)		Adverse events, Gene integration	Peer-reviewed paper of Science, public health policy and the law. Transfection to HEK293 cells
Wang [44]	Centreville High School, US	Pfizer	6	2024-12	Spectrometer (Nanodrop), Fluorometer (Qubit)	3450 – 6550 ng (Nanodrop), 41.4 – 109.5 ng (Qubit)		Adverse events, Gene integration	Peer-reviewed paper of the Journal of High School Science. Work performed in FDA lab.

Tabella 2. Continua.

Questi risultati indicano che la contaminazione da DNA, segnalata da diversi produttori, piattaforme vaccinali e aree geografiche, supera di gran lunga i limiti raccomandati dalle agenzie regolatorie quali l'Agenzia europea per i medicinali (EMA) e la Food and Drug Administration (FDA) statunitense, fissati in genere a <10 ng per dose clinica [45]. Inoltre, livelli di contaminazione da DNA inferiori alle soglie normative possono comunque comportare rischi significativi per la salute. Tuttavia, le prove meccanicistiche o epidemiologiche che collegano direttamente questa contaminazione a esiti negativi per la salute rimangono limitate. La presenza di sequenze come SV40 aumenta i possibili rischi di integrazione genica e carcinogenicità [46, 47]. Sono necessarie ulteriori ricerche per chiarire le potenziali implicazioni biologiche di tale contaminazione.

Richieste di ritiro dal mercato dei vaccini contro il COVID-19

Oltre 81.000 medici, scienziati, ricercatori e cittadini preoccupati, 240 funzionari governativi eletti, 17 organizzazioni professionali di sanità pubblica e medici (Figura 3), 2 partiti repubblicani statali, 17 comitati repubblicani di contea e 6 studi scientifici provenienti da tutto il mondo hanno chiesto il ritiro dal mercato dei vaccini COVID-19 (Tabella 3). Il 10 marzo 2021, Doctors for COVID Ethics ha chiesto il ritiro globale dei vaccini contro il COVID-19 [48]. Nel maggio 2021, Bruno et al. (50 autori) hanno chiesto una sospensione del programma di vaccinazione di massa se i programmi di vaccinazione in tutto il mondo non istituiranno comitati indipendenti di monitoraggio della sicurezza dei dati (DSMB), comitati di valutazione degli eventi (EAC) e non adotteranno misure di mitigazione del rischio [49]. Il 29 novembre 2021, il World Council for Health ha rilasciato una dichiarazione in cui "chiede ai governi e alle aziende di cessare e desistere da

partecipazione diretta o indiretta alla produzione, distribuzione, somministrazione o promozione delle iniezioni sperimentali contro il COVID-19" sulla base di gravi preoccupazioni in materia di sicurezza [50]. Nel maggio 2022, il Global COVID Summit, che ha riunito oltre 17.000 medici e scienziati, ha dichiarato che "le iniezioni sperimentali di terapia genetica contro il COVID-19 devono cessare" [51]. Nell'ottobre 2022, l'Associazione dei professionisti sanitari e dei ricercatori indipendenti (APSIIN) ha inviato una lettera al Ministero della Salute cileno per chiedere la sospensione immediata della vaccinazione con piattaforme a mRNA [52]. Il dottor McCullough ha concluso, con l'assenso di gruppi di esperti, che la completa rimozione dal mercato di tutti i vaccini COVID-19 era giustificata in base al rischio eccessivo di morte, il 7 dicembre 2022, al Senato degli Stati Uniti [53], e il 13 settembre 2023, al Parlamento europeo [54]. Il 21 marzo 2023, l'Associazione dei medici e chirurghi americani ha rilasciato una dichiarazione fattuale, scientificamente fondata e basata sul consenso, in cui si chiede che tutti i vaccini COVID-19 siano ritirati dal mercato a causa della loro mancanza di sicurezza ed efficacia [55]. Il 14 settembre 2023, la National Citizens Inquiry, un'organizzazione canadese guidata e finanziata dai cittadini con lo scopo di indagare sulle politiche dei governi in materia di COVID-19, ha chiesto il ritiro dal mercato di tutti i vaccini contro il COVID-19 [56]. Alla fine del 2023, Americans for Health Freedom ha creato un impegno firmabile che chiede il ritiro dal mercato dei vaccini contro il COVID-19 [57]. Al 1° dicembre 2024, 228 funzionari eletti, 17 comitati politici di contea, 2 partiti politici statali e diverse organizzazioni di medici hanno firmato l'impegno che chiede il ritiro dal mercato dei vaccini contro il COVID-19, tra cui, ma non solo, il senatore Ron Johnson, la deputata Marjorie Taylor Greene, il deputato Thomas Massie, i partiti repubblicani dell'Arizona e dell'Idaho, America's Frontline Doctors, Frontline COVID-19 Critical Care Alliance, Health Advisory and Recovery Team, Global Health Project e Global COVID Summit [57]. Il 4 gennaio 2024, il chirurgo generale della Florida ha dichiarato

per la rimozione di tutti i vaccini mRNA COVID-19 dall'uso umano a causa della contaminazione da frammenti di cDNA e del rischio di genotossicità [58]. Il 12 gennaio 2024, ancora una volta il dottor McCullough ha chiesto la rimozione dal mercato di tutti i prodotti di richiamo COVID-19 in una commissione della Camera dei Rappresentanti degli Stati Uniti sulle lesioni da vaccino COVID-19 [59]. Il 29 febbraio 2024, i membri dell'associazione New Zealand Doctors Speaking Out with Science (NZDSOS) hanno presentato al Parlamento una lettera dettagliata in cui chiedevano l'immediata sospensione dei vaccini COVID-19 a causa di gravi preoccupazioni in materia di sicurezza [60]. Nel 2024, la McCullough Foundation ha rilasciato diverse dichiarazioni sui social media chiedendo una moratoria immediata sui vaccini COVID-19 a causa dei decessi in eccesso e delle preoccupazioni relative alla contaminazione del DNA [61]. Nel luglio 2024, Mead et al. hanno pubblicato una coppia di manoscritti ampiamente referenziati e sottoposti a revisione paritaria che concludono che i vaccini COVID-19 non sono sicuri per l'uso umano e dovrebbero essere ritirati dal mercato [3, 62]. L'HOPE Accord, un gruppo internazionale di professionisti sanitari, scienziati, accademici e cittadini preoccupati, ha chiesto la sospensione immediata dei vaccini a mRNA contro il COVID-19 e una rivalutazione completa della loro sicurezza ed efficacia il 3 luglio 2024 [63]. L'accordo ha raccolto 64.168 firme di eminenti esperti medici, ricercatori e cittadini preoccupati che sostengono che le prove emergenti suggeriscono che questi nuovi prodotti vaccinali potrebbero contribuire all'aumento dei tassi di disabilità e di mortalità in eccesso. L'11 ottobre 2024, VERITY France, insieme a scienziati, cittadini e vittime, dinanzi al Tribunale amministrativo di Montreuil, chiedendo il divieto di prescrizione e distribuzione del vaccino COMIRNATY da parte di PFIZER-BioNTech e del vaccino SPIKEVAX da parte di MODERNA, nonché il loro ritiro dal mercato da parte dell'Agenzia nazionale per la sicurezza dei medicinali e dei prodotti sanitari (ANSM) [64]. Il 1° novembre 2024, Rogers et al. hanno pubblicato uno studio che ha riscontrato una significativa violazione della soglia di sicurezza relativa al segnale di sicurezza cerebrale.

eventi avversi trombotici dopo i vaccini COVID-19 e ha chiesto una moratoria globale [65]. Sempre nel novembre 2024, uno studio di Oldfield et al. ha raccomandato una moratoria sui vaccini a mRNA contro il COVID-19 a causa di dati incompleti, gravi preoccupazioni di sicurezza e potenziali rischi a lungo termine [66]. Il 25 novembre 2024, il NORTH Group, un gruppo internazionale di politici e professionisti di spicco del settore medico e di altri settori, ha inviato una lettera di "estrema preoccupazione" ai capi di Stato di 11 paesi europei (Danimarca, Estonia, Finlandia, Groenlandia, Islanda, Lettonia, Lituania, Norvegia, Svezia, Regno Unito e Irlanda) chiedendo la sospensione dei vaccini a mRNA modificati, citando gravi preoccupazioni per la salute [67]. Il 3 dicembre 2024, Kämmerer et al. hanno pubblicato un articolo originale che chiedeva l'immediata sospensione di tutti i prodotti biologici a base di RNA.

a causa della contaminazione del DNA [43]. Il 4 dicembre 2024 abbiamo ricevuto conferma via e-mail che

4 membri del Parlamento europeo vogliono che i vaccini COVID-19 siano ritirati dal mercato: Christine Anderson (Germania), Cristian Terhes (Romania), Virginie Joron (Francia) e Gerald Hauser (Austria). Inoltre, abbiamo ricevuto conferma che 8 senatori federali australiani attuali ed ex senatori federali e membri del Parlamento federale hanno chiesto la rimozione dei vaccini COVID-19, tra cui Gerard Rennick, Alex Antic, Malcolm Roberts, Ralph Babet, Matt Canavan, Pauline Hanson, Russell Broadbent e Craig Kelly. Abbiamo anche ottenuto la conferma che Children's Health Defense [68] chiede che i vaccini COVID-19 siano immediatamente ritirati dal mercato.



Figura 3. Organizzazioni che hanno chiesto il ritiro dal mercato dei vaccini COVID-19.

Category	Date	Entity	Action/Statement
Manuscripts	May 2021	Bruno et al. [49]	50 authors call for a pause in the mass vaccination program if vaccination programs worldwide do not institute independent data safety monitoring boards (DSMB), event adjudication committees (EAC), and enact risk mitigation.
	July 2024	Mead et al. [3, 62]	Published peer-reviewed manuscripts concluding COVID-19 vaccines are unsafe for human use and should be removed.
	November 2024	Rogers et al. [65]	Found alarming breach in the safety signal threshold concerning cerebral thrombosis AEs after COVID-19 vaccines and called for global moratorium.
	November 2024	Oldfield et al. [66]	Based on incomplete data, serious safety concerns, and potential long-term risks, the authors recommend a moratorium on COVID-19 mRNA vaccines.
	December 2024	Kammerer et al. [43]	Called for an immediate halt of all RNA biologicals due to DNA contamination.
Organizations	March 10, 2021	Doctors for COVID Ethics [48]	Called for the global recall of COVID-19 vaccines.
	November 29, 2021	World Council for Health [50]	Issued a declaration “demanding that governments and corporations cease and desist from direct or indirect participation in the manufacturing, distribution, administration or promotion of COVID-19 experimental injections” based on serious safety concerns.
	May 2022	Global COVID Summit [51]	More than 17,000 physicians and scientists declared that “the COVID-19 experimental genetic therapy injections must end.”
	October 2022	Association of Health Professionals and Independent Researchers (APSIIN) [52]	Sent a letter to the Ministry of Health in Chile to request the immediate suspension of inoculation with mRNA platforms.
	March 21, 2023	Association of American Physicians and Surgeons [55]	Issued a statement calling for the removal of all COVID-19 vaccines due to lack of safety and efficacy.
	September 14, 2023	National Citizens Inquiry [56]	Called for the market removal of all COVID-19 vaccines after investigating government COVID-19 policies.
	November 2023	Americans for Health Freedom [57]	Created signable pledge for elected government officials and others calling for mRNA products to be pulled off the market.
	2023-2024	America’s Frontline Doctors [57]	Signed the Americans for Health Freedom pledge calling for “the COVID shots to be pulled off the market.”
	2023-2024	Frontline COVID-19 Critical Care Alliance [57]	
	2023-2024	Health Advisory and Recovery Team [57]	
	2023-2024	Global Health Project [57]	
	2023-2024	17 County Political Committees [57]	
	2023-2024	Arizona and Idaho State Republican Parties [57]	Presented a comprehensive letter to parliament calling for the immediate withdrawal of COVID-19 vaccines due to significant safety concerns.
	February 29, 2024	New Zealand Doctors Speaking Out with Science (NZDSOS) [60].	
	2024	McCullough Foundation [61]	Issued multiple statements on social media calling for the immediate withdrawal of COVID-19 vaccines from the market.
	July 3, 2024	HOPE Accord [63]	64,168 prominent medical experts, researchers, and concerned citizens called for immediate suspension of COVID-19 mRNA vaccines and reevaluation of their safety and efficacy.
	October 11, 2024	VERITY France, along with scientists, citizens, and victims [64].	Legal action was filed before the Administrative Tribunal of Montreuil, seeking the prohibition of the prescription and distribution of the COMIRNATY vaccine by PFIZER-BioNTech and the SPIKEVAX vaccine by MODERNA, as well as their withdrawal from the market by the National Agency for the Safety of Medicines and Health Products (ANSM).

Tabella 3. Richieste di ritiro dal mercato dei vaccini contro il COVID-19.

Public Figures	November 25, 2024	NORTH Group [67]	Sent a letter of “extreme concern” to European heads of state calling for the suspension of modified mRNA vaccines due to serious concerns.
	December 4, 2024 (received email confirmation)	Children’s Health Defense [68]	We obtained email confirmation that Children’s Health Defence calls for the COVID-19 vaccines to be immediately removed from the market.
	December 2022, September 2023, January 2024	Dr. Peter McCullough [53, 54, 59]	Called for the complete market removal of COVID-19 vaccines due to excess risk of death in the US Senate, European Parliament, and US House of Representatives panel on vaccine injuries.
	2023-2024	Sen Ron Johnson, Rep Majorie Taylor Greene, and Rep Thomas Massie, among 228 elected U.S. officials [57]	Signed the Americans for Health Freedom pledge calling for “the COVID shots to be pulled off the market.”
	January 4, 2024	Florida Surgeon General – Dr. Joseph Ladapo [58]	Called for the removal of all mRNA COVID-19 vaccines citing contamination by cDNA fragments and genotoxicity risks.
	December 4, 2024 (received email confirmation)	Christine Anderson among 3 other Members of the European Parliament.	We obtained email confirmation that 4 members of European Parliament want the COVID-19 vaccines removed from the market: Christine Anderson (Germany), Cristian Terhes (Romania), Virginie Joron (France), and Gerald Hauser (Austria).
	December 5, 2024 (received email confirmation)	Gerard Rennick, Russell Broadbent, and Craig Kelly among 8 Australian elected officials.	We received email confirmation that 8 current and former Australian Federal Senators and Federal Members of Parliament have called for the removal of COVID-19 vaccines, including Gerard Rennick, Alex Antic, Malcolm Roberts, Ralph Babet, Matt Canavan, Pauline Hanson, Russell Broadbent, and Craig Kelly.

Tabella 3. Continua.

Conclusione

Prevediamo che le richieste di una moratoria immediata sui vaccini contro il COVID-19 continueranno ad aumentare fino al raggiungimento di una massa critica e alla definitiva rimozione dei prodotti dal mercato. L'eccesso di mortalità, l'efficacia negativa e la contaminazione diffusa del DNA associata ai vaccini contro il COVID-19 sono stati sufficientemente dimostrati. I criteri della FDA per un richiamo di Classe I sono stati ampiamente superati. Nessuno studio clinico su larga scala, conclusivo, randomizzato, in doppio cieco e controllato con placebo ha dimostrato una riduzione della trasmissione dell'infezione, dei ricoveri ospedalieri o dei decessi come endpoint primari. Pertanto, i vaccini contro il COVID-19 non hanno dimostrato di essere efficaci nel ridurre importanti esiti clinici. Una posizione a favore della vaccinazione contro il COVID-19 è contraria alla buona pratica medica e viola il giuramento di Ippocrate di non nuocere. L'immediata rimozione dei vaccini contro il COVID-19 dal mercato è essenziale per prevenire ulteriori perdite di vite umane e garantire che vengano intrapresi i prossimi passi per garantire la responsabilità.

Ringraziamenti

Desideriamo ringraziare il dottor Kenji Fujikawa, PhD, (Istituto di Statistica Medica, Informazione e Comunicazione, Giappone) per averci concesso il permesso di utilizzare la tabella da lui creata, Verifiche della contaminazione del DNA dei vaccini a mRNA nel mondo.

Finanziamenti: Nessuno

Conflitti di interesse: Nessuno

Dichiarazione del Comitato di revisione istituzionale: il documento non ha richiesto l'approvazione etica.

Riferimenti

1. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, et al. Sicurezza ed efficacia del vaccino BNT162b2 mRNA Covid-19. N Engl J Med. 2020;383(27):2603-2615. doi:10.1056/NEJMoa2034577. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2034577>

2. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, et al. Efficacia e sicurezza del vaccino mRNA-1273 SARS-CoV-2. *N Engl J Med.* 2021;384(5):403-416. doi:10.1056/NEJMoa2035389.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2035389>
3. Mead, M. N., Seneff, S., Wolfinger, R., Rose, J., Denhaerynck, K., Kirsch, S., & McCullough, P. A. (2024). "Vaccini" a mRNA modificati per COVID-19 Parte 1: Lezioni apprese dalle sperimentazioni cliniche, dalla vaccinazione di massa e dal complesso biofarmaceutico. *International Journal of Vaccine Theory, Practice, and Research*, 3(2), 1112-1178. doi: 10.56098/fdrasy50.
<https://doi.org/10.56098/fdrasy50>
4. Jones JM, Manrique IM, Stone MS, et al. Stime della sieroprevalenza del SARS-CoV-2 e dell'incidenza delle infezioni primarie da SARS-CoV-2 tra i donatori di sangue, in base allo stato di vaccinazione contro il COVID-19 - Stati Uniti, aprile 2021-settembre 2022. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2023;72(22):601-605. Pubblicato il 2 giugno 2023. doi:10.15585/mmwr.mm7222a3.
<https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7222a3>
5. Centri per il controllo e la prevenzione delle malattie. COVID Data Tracker. Atlanta, GA: Dipartimento della Salute e dei Servizi Umani degli Stati Uniti, CDC; 1 dicembre 2024.
<https://covid.cdc.gov/covid-data-tracker>
6. Procter, B.C, Ross C, Pickard V, et al. La terapia ambulatoriale multifarmacologica precoce riduce l'ospedalizzazione e la mortalità nei pazienti ad alto rischio con SARS-CoV-2 (COVID-19). *International Journal of Innovative Research in Medical Science.* 6, 03. (2021). 219-221. doi:10.23958/ijirms/vol06-i03/1100.
<https://doi.org/10.23958/ijirms/vol06-i03/1100>
7. VAERS COVID Vaccine Adverse Event Reports. OpenVAERS. Pubblicato il 6 settembre 2024. <https://www.openvaers.com/covid-data>
8. Rose J. Valutazione critica del VAERS
- Farmacovigilanza: il sistema statunitense di segnalazione degli eventi avversi da vaccino (VAERS) è un sistema di farmacovigilanza funzionante? *Scienza, politica sanitaria pubblica e diritto.* 1 ottobre 2021; v3.2019-2024.
9. Hulscher N, Alexander P E., Amerling R, et al. Una revisione sistematica dei risultati autoptici nei decessi dopo la vaccinazione contro il COVID-19. *Scienza, politica sanitaria pubblica e diritto.* 17 novembre 2024; v5.2019-2024.
10. Rancourt DG, Baudin M, Hickey J, et al. Mortalità associata al vaccino COVID-19 nell'emisfero meridionale. *Journal of Research and Applied Medicine.* 2023. doi: 10.55634/2.2.10.
<https://doi.org/10.55634/2.2.10>
11. Mostert S, Hoogland M, Huibers M, et al. Mortalità in eccesso nei paesi del mondo occidentale dall'inizio della pandemia di COVID-19: stime di "Our World in Data" da gennaio 2020 a dicembre 2022: *BMJ Public Health* 2024;2:e000282. doi:
12. Skidmore M. COVID-19 Illness and Vaccination Experiences in Social Circles Affect COVID-19 Vaccination Decisions. *Science, Public Health Policy and the Law.* 2 ottobre 2023; v4.2019-2024.
13. Pantazatos S, Seligmann H. Vaccinazione contro il COVID e rischio di mortalità per tutte le cause stratificato per età. *Research Gate* 26 ottobre 2021. Pubblicazione elettronica 26 ottobre. DOI: 10.13140/RG.2.2.28257.43366.
<https://doi.org/10.13140/RG.2.2.28257.43366>
14. Hulscher, N., Cook, M. J., Stricker, R. B., McCullough, P. A. (2024). Eccesso di arresti cardiopolmonari e mortalità dopo la vaccinazione contro il COVID-19 nella contea di King, Washington. *J Emerg Med OA*, 2(1), 01-11. doi: 10.33140/JEMOA.02.01.12.
<https://doi.org/10.33140/JEMOA.02.01.12>
15. Aarstad J, Kvitastein OA. Esiste un legame tra la diffusione della vaccinazione contro il COVID-19 nel 2021 in Europa e l'eccesso di mortalità per tutte le cause nel 2022? *Asian*

Pac. J. Health Sci., 2023;10(1):25-31. doi:10.21276/apjhs.2023.10.1.6.
<https://doi.org/10.21276/apjhs.2023.10.1.6>

16. Alessandria M, Malatesta GM, Berrino F, Donzelli A. Analisi critica dei decessi per tutte le cause durante la vaccinazione contro il COVID-19 in una provincia italiana. *Microorganisms*. 2024;12(7):1343. Pubblicato nel 2024

30 giugno. doi:10.3390/microorganisms12071343.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms12071343>

17. Lataster R. L'eccesso di mortalità in Europa è correlato alla vaccinazione contro il COVID-19 nel 2024. *Bulgarian Medicine*. vol. 13 n. 2/2023. https://basa.bg/en/images/Br_02_2023_bulgarska_medicina.pdf

18. Allen DE. La correlazione tra i decessi in eccesso in Australia per stato e le vaccinazioni di richiamo. *Med Res Arch*. 2024;12(7). doi:10.18103/mra.v12i7.5485.
<https://doi.org/10.18103/mra.v12i7.5485>

19. Kuhbandner C, Reitzner M. Aumenti differenziali della mortalità in eccesso negli Stati federali tedeschi durante la pandemia di COVID-19. *ResearchGate*. 2024. doi:10.13140/RG.2.2.13098.18880.
<https://doi.org/10.13140/RG.2.2.13098.18880>

20. Rodrigues NCP, Andrade MK de N. Valutazione del rischio di mortalità post-COVID nei casi classificati come sindrome respiratoria acuta grave in Brasile: uno studio longitudinale a medio e lungo termine. *Front Med (Losanna)*. 2024;11. doi:10.3389/fmed.2024.1495428.
<https://doi.org/10.3389/fmed.2024.1495428>

21. Richiami, contesto e definizioni. FDA. Pubblicato il 31 luglio 2014. Accesso effettuato il 2 dicembre 2024.
<https://www.fda.gov/safety/industry-guidance-recalls/recalls-background-and-definitions>

22. Manuale delle procedure normative, Capitolo 7:

PROCEDURE DI RITIRO. FDA. Pubblicato nel luglio 2021. Consultato il 2 gennaio 2024.
<https://www.fda.gov/media/71814/download>

23. Relazione sull'applicazione. FDA. Accesso effettuato il 2 gennaio 2024.
<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/ires/index.cfm>

24. Tendenza al rialzo dei richiami di dispositivi medici di classe 1 da parte della FDA. ORManager. Pubblicato il 29 aprile 2024. Consultato il 2 gennaio 2024. <https://www.ormanager.com/briefs/fda-expert-express-concern-about-prevalence-of-medical-device-class-1-recalls/>

25. Rhodes P, Parry PI. Richiamo di prodotti farmaceutici ed esitazione informata nei confronti di nuovi farmaci e vaccini innovativi. *International Journal of Risk & Safety in Medicine*. 2024;0(0). doi:10.1177/09246479241292008.
<https://doi.org/10.1177/09246479241292008>

26. Analisi VAERS. Riepilogo VAERS per i vaccini COVID-19 fino al 26/04/2024. <https://vaersanalysis.info/2024/05/03/vaers-summary>

27. Fitzpatrick M. L'incidente Cutter: come il primo vaccino contro la poliomielite in America ha portato a una crescente crisi dei vaccini. *J R Soc Med*. 2006;99(3):156.

28. Delage G. Ritiro del vaccino contro il rotavirus negli Stati Uniti; il ruolo della sorveglianza post-commercializzazione. *Can J Infect Dis*. 2000;11(1):10-12. doi:10.1155/2000/414396.
<https://doi.org/10.1155/2000/414396>

29. Eythorsson E, Runolfsson HL, Ingvarsson RF, Sigurdsson MI, Pálsson R. Tasso di reinfezione da SARS-CoV-2 durante un'ondata di Omicron in Islanda. *JAMA Netw Open*. 2022;5(8):e2225320. Pubblicato il 1° agosto 2022.

[Q](#)

30. Chemaitelly H, Ayoub HH, AlMukdad S, et al. Durata della protezione del vaccino a mRNA contro le sottovarianti SARS-CoV-2 Omicron BA.1 e BA.2 in Qatar. *Nat Commun.* 2022;13(1):3082. Pubblicato nel giugno 2022

31. Shrestha NK, Burke PC, Nowacki AS, Simon JF, Hagen A, Gordon SM. Efficacia del vaccino bivalente contro la malattia da coronavirus 2019. *Open Forum Infect Dis.* 2023;10(6):ofad209. Pubblicato il 19 aprile 2023. doi:10.1093/ofid/ofad209. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofad209>

32. Feldstein LR, Ruffin J, Wiegand R, et al. Protezione dalla vaccinazione contro il COVID-19 e precedente infezione da SARS-CoV-2 nei bambini di età compresa tra 6 mesi - 4 anni, Stati Uniti, settembre 2022-aprile 2023. *J Pediatric Infect Dis Soc.* Pubblicato online il 5 dicembre 2024. doi:10.1093/jpids/piae121. <https://doi.org/10.1093/jpids/piae121>

33. McKernan, Kevin, Yvonne Helbert, Liam T. Kane e Stephen McLaughlin. 2023. "Il sequenziamento dei vaccini bivalenti Moderna e Pfizer Mrna rivela quantità da nanogrammi a microgrammi di vettore di espressione Dsdna per dose". *OSF Preprints*. 10 aprile. doi:10.31219/osf.io/b9t7m. <https://doi.org/10.31219/osf.io/b9t7m>

34. Anandamide. qPCR mirato al vaccino su linee cellulari tumorali trattate con BNT162b2. *Substack*. Pubblicato il 25 febbraio 2024. Accesso effettuato il 4 dicembre 2024. <https://anandamide.substack.com/p/vaccine-targeted-qpcr-of-cancer-cell>

35. Anandamide. Approfondimento sulla fluorimetria. *Substack*. Pubblicato il 25 novembre 2023. Accesso il 4, 2024. <https://anandamide.substack.com/p/fluorometry-dee-p-dive>

36. La curva di calibrazione qPCR di Nitta non presenta uno scarto di un fattore 1.000? Istituto di Statistica Medica e Comunicazione dell'Informazione. Pubblicato il 16 giugno 2023. Consultato il 4 dicembre 2024. <https://medicalstats.net/med/dna-stdcurves-20230616.html>

37. Phillip Buckhaults - Il vaccino Pfizer contiene frammenti di DNA plasmidico. X (precedentemente Twitter). Pubblicato nel 2024. Accesso effettuato il 4 dicembre 2024. https://x.com/P_J_Buckhaults/status/1684569351998038017

38. Phillip Buckhaults - Quantificazione del numero di copie del DNA plasmidico. Protocolli, reagenti e una serie di nuovi risultati. X (precedentemente Twitter). Pubblicato nel 2024. Accesso effettuato il 4 dicembre 2024. https://x.com/P_J_Buckhaults/status/1782551861083685223

39. König B, Kirchner JO. Considerazioni metodologiche relative alla quantificazione delle impurità del DNA nel vaccino a mRNA Comirnaty® contro il COVID-19. *Metodi e protocolli.* 2024; 7(3):41. Doi: 10.3390/mps7030041. <https://doi.org/10.3390/mps7030041>

40. Speicher, David J., Jessica Rose, L. M. Gutschi, David M. Wiseman, PhD, e Kevin McKernan. 2023. "Frammenti di DNA rilevati nei vaccini monovalenti e bivalenti Pfizer/biontech e Moderna Moderna COVID-19 provenienti dall'Ontario, Canada: relazione esplorativa tra dose e risposta con eventi avversi gravi". *OSF Preprints*. 19 ottobre. doi:10.31219/osf.io/mjc97. <https://doi.org/10.31219/osf.io/mjc97>

41. CONTATTO CON DNA AUSTRALIANO CONFERMATO ... in fiale australiane di Pfizer e Moderna ... NON sicuro per l'uomo. *Substack.com*. Pubblicato il 6 giugno 2024. Accesso effettuato il 4 dicembre 2024. <https://julesonthebeach.substack.com/p/australian-d-na-contamination-confirmed>

42. Didier Raoult. Conferma della presenza di

DNA vaccinale nel vaccino anti-COVID-19 della Pfizer. 2024. HAL. <https://hal.science/hal-04778576v1>

43. Kämmerer U, Schulz V, Steger K. Le iniezioni a base di RNA BioNTech contro il COVID-19 contengono grandi quantità di DNA residuo, compresa una sequenza promotrice/potenziatrice SV40. Scienza, politica sanitaria pubblica e diritto. 3 dicembre 2024; v5.2019-2024.

44. Wang TJ, Kim A, Kim K. Un metodo di rilevamento rapido del DNA plasmidico replicabile dai vaccini a mRNA contro il COVID-19 per il controllo di qualità. J High Sch Sci. 2024;8(4):427-439.

45. Yang H. Stabilire limiti accettabili di DNA residuo. PDA J Pharm Sci Technol. 2013;67(2):155-163.

46. Rotondo JC, Mazzoni E, Bononi I, Tognon M, Martini F. Associazione tra il virus simiano 40 e i tumori umani. Front Oncol. 2019;9:670. Pubblicato il 25 luglio 2019. doi:10.3389/fonc.2019.00670. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00670>

47. Comitato per la revisione della sicurezza delle vaccinazioni dell'Istituto di Medicina (USA), Stratton K, Almario DA, McCormick MC, eds. Revisione della sicurezza delle vaccinazioni: contaminazione da SV40 del vaccino contro la poliomielite e cancro. Washington (DC): National Academies Press (USA); 2002.

48. Lettera aperta urgente di medici e scienziati all'Agenzia europea per i medicinali in merito alle preoccupazioni sulla sicurezza dei vaccini contro il COVID-19. Medici per l'etica COVID. Pubblicata il 10 marzo 2021. Consultata il 2 dicembre 2024. <https://doctors4covidethics.org/urgent-open-letter-from-doctors-and-scientists-to-the-european-medicines-agency-regarding-covid-19-vaccine-safety-concerns/>

49. Bruno R, McCullough PA, Vila T, et al. SARS-

CoV-2 mass vaccination: Urgent questions on vaccine safety that demand answers from international health agencies, regulatory authorities, governments and vaccine developers. Authorea. 24 maggio 2021. doi: 10.22541/au.162136772.22862058/v2.

<https://doi.org/10.22541/au.162136772.22862058/v2>

50. DICHIARAZIONE, CESSAZIONE E DESISTENZA E NOTIFICA DI RESPONSABILITÀ - IL CONSIGLIO MONDIALE PER LA SALUTE CHIEDE L'IMMEDIATA SOSPENSIONE DEI "VACCINI" SPERIMENTALI CONTRO IL COVID-19.

Consiglio Mondiale per la Salute. Pubblicato il 29 novembre 2021. Consultato il 2 dicembre 2024.

<https://wchweb.b-cdn.net/web/downloads/Article-Files/cease-and-desist/cease-and-desist-1-2.pdf>

51. 17.000 medici chiedono la fine dell'emergenza COVID-19. Clark County Today. Pubblicato il 17 maggio 2022. Consultato il 2 dicembre 2024. <https://www.clarkcountytoday.com/news/17000-doctors-call-for-end-to-covid-19-emergency/>

52. Richiesta di interrompere la campagna di vaccinazione nei bambini e negli adolescenti con piattaforme vaccinali basate su mRNA sintetico. APSIIN. Pubblicato nell'ottobre 2022. Consultato il 4 dicembre 2024. <https://apsiin.cl/apsiin/solicitud-detencion-inoculacion-arnms-nna/>

53. Dr. McCullough Senato degli Stati Uniti: per salvare vite umane, ritirare dal mercato i vaccini contro il COVID-19. Rumble. Pubblicato nel 2022. Accesso effettuato il 2 dicembre 2024. <https://rumble.com/v1zkz94-dr.-mccullough-us-senate-to-save-lives-pull-the-covid-19-vaccines-off-the-market.html>

54. Peter A. McCullough, MD, MPH testimonia al Parlamento europeo per porre fine a tutte le vaccinazioni COVID. Rumble. Pubblicato nel 2023. Accesso effettuato il 2 dicembre 2024.

<https://rumble.com/v3ho9hg-peter-a.-mccullough-md-mph-testifies-in-the-european-parliament-to-end-all-.html>

55. COVID-19: un gruppo di medici chiede il ritiro

Vaccino. Associazione dei medici e chirurghi americani. Pubblicato il 21 marzo 2023. Accesso effettuato il

il 2 dicembre 2024.

<https://aapsonline.org/covid-19-doctors-group-says-to-recall-vaccine/>

56. L'inchiesta nazionale dei cittadini raccomanda l'immediata sospensione delle vaccinazioni contro il COVID-19. Inchiesta nazionale dei cittadini. Pubblicato il 14 settembre 2023.

Consultato il 2 dicembre 2024.

<https://nationalcitizensinquiry.ca/national-citizens-inquiry-recommends-immediate-halt-to-covid-19-vaccinations/>

57. Progetto Fondazionale. Americani per la Libertà di Salute.

Pubblicato nel 2024. Accesso effettuato il 2 dicembre

<https://www.americansforhealthfreedom.org/>

58. Il chirurgo generale dello Stato della Florida chiede la sospensione dell'uso dei vaccini a mRNA contro il COVID-19. Dipartimento della Salute della Florida. Pubblicato il 3 gennaio 2024. Accesso effettuato il 2 dicembre 2024. <https://content.govdelivery.com/accounts/FLDOH/bulletins/3816863>

59. Il Congresso degli Stati Uniti viene a conoscenza dei danni a lungo termine causati dalla vaccinazione contro il COVID-19. Rumble.

Pubblicato nel 2024. Accesso effettuato il 2 dicembre 2024.

<https://rumble.com/v46tcwn-us-congress-learns-about-long-term-harms-from-covid-19-vaccination.html>

60. Lettera completa al Parlamento della NZDSOS. Medici neozelandesi che parlano con la scienza. Pubblicata il 29 febbraio 2024. Consultata il 4 dicembre

2024.

<https://nzdsos.com/2024/03/07/nzdsos-comprehensive-letter-to-parliament/>

61. McCullough Foundation. X (precedentemente Twitter).

Consultato il 2 dicembre 2024. <https://x.com/McCulloughFund>

62. Mead, M. N., Seneff, S., Rose, J., Wolfinger, R., Hulscher, N., & McCullough, P. A. (2024). COVID-19

"Vaccini" a mRNA modificato: lezioni apprese dalle sperimentazioni cliniche, dalla vaccinazione di massa e dal complesso biofarmaceutico, parte 2. *International Journal of Vaccine Theory, Practice, and Research*, 3(2), 1246–1315. doi: 10.56098/w66wjg87.

<https://doi.org/10.56098/w66wjg87>

63. L'Accordo della Speranza. Pubblicato il 3 luglio 2024.

Consultato il 2 dicembre 2024. <https://thehopeaccord.org/>

64. Azione legale per il ritiro dal mercato dei vaccini Comirnaty e Spikevax da parte dell'ANSM (autorità di regolamentazione francese). X (precedentemente Twitter). Pubblicato l'11 ottobre 2024. Accesso effettuato il 4 dicembre 2024.

65. Rogers, C., Thorp, J., Cosgrove, K., & McCullough, P. (2024).

Vaccini COVID-19: un fattore di rischio per le sindromi trombotiche cerebrali. *International Journal of Innovative Research in Medical Science*, 9(11), 621–627. doi: 10.23958/ijirms/vol09-i11/1982.

<https://doi.org/10.23958/ijirms/vol09-i11/1982>

66. Oldfield P, Gutschi M, McCullough PA, et al. (2024). Vaccini modRNA COVID-19 di Pfizer/BioNTech: pericoloso meccanismo d'azione genetico rilasciato prima di test preclinici sufficienti. *Journal of American Physicians and Surgeons*, 29(4), 118–126.

67. Avviso di estrema preoccupazione sulla sicurezza e la qualità dei vaccini a mRNA modificati contro il COVID-19 ai primi ministri e agli organi di governo dei paesi nordici e baltici e del Regno Unito; 2024. Consultato il 2 dicembre 2024.

https://northgroup.info/pdfs/NORTH_Group_Letter-2024-11-25.pdf

68. Children's Health Defense. Consultato il 4 dicembre 2024.

<https://childrenshealthdefense.org/>

Observed-to-Expected Fetal Losses Following mRNA COVID-19 Vaccination in Early Pregnancy

Josh Guetzkow, PhD*
 Department of Sociology & Anthropology
 Institute of Criminology
 Hebrew University of Jerusalem
 Jerusalem, Israel 91905
joshua.guetzkow@mail.huji.ac.il

Tal Patalon, MD, MBA
 Maccabi Research and Innovation Center, Maccabi Healthcare Services
 Tel Aviv-Yafo, Israel 68012
 Arison School of Business, Reichman University
 Herzliya, Israel 46101

Sivan Gazit, MD, MA
 Maccabi Research and Innovation Center, Maccabi Healthcare Services
 Tel Aviv, Israel 68012

Tracy Beth Høeg, MD, PhD
 Sloan School of Management, Massachusetts Institute of Technology
 Department of Emergency Medicine, University of California - San Francisco
 Department of Clinical Research, University of Southern Denmark
 Cambridge, MA USA 02142

Joseph Fraiman, MD
 Baromedical Research Institute
 Harvey, LA USA 70058

Yaakov Segal, MD
 Health Division, Maccabi Healthcare Services
 Tel Aviv, Israel 68012

Retsef Levi, PhD
 Sloan School of Management, Massachusetts Institute of Technology
 Cambridge, MA USA 02142

* Corresponding author

Observed-to-Expected Fetal Losses Following mRNA COVID-19 Vaccination in Early Pregnancy

ABSTRACT

Background

The clinical trials used to approve COVID-19 vaccines excluded pregnant women, and existing safety assessments of COVID-19 vaccination, particularly during early stages of pregnancy, are limited to observational studies prone to various types of potential bias, including healthy vaccinee bias.

Methods

The study includes pregnancies in Israel with last menstruation period (LMP) between March 1, 2016 and February 28, 2022. The main analysis presents observed-to-expected comparisons of the number of eventual fetal losses among pregnant women exposed to mRNA COVID-19 vaccination (almost all Pfizer) during gestational weeks 8-13 and 14-27, respectively. Women vaccinated for influenza during gestational weeks 8-27, as well as women vaccinated prior to pregnancy for COVID-19 or influenza, were used as comparative controls. Cohort-specific expected number of fetal losses are established based on estimates from a regression model trained on historical data from 2016-2018 that incorporates individual-level risk factors and gestational week of each pregnant woman included in the cohort.

Results

Analysis of 226,395 singleton pregnancies in Israel from 2016 to 2022 indicates that COVID-19 vaccination with dose 1 during weeks 8-13 was associated with *higher-than-expected* observed number of fetal losses of approximately 13 versus 9 expected for every 100 exposed pregnancies, i.e., nearly 3.9 (95% CI: [2.55-5.14]) additional fetal losses above expected per 100 pregnancies. Most of the excess fetal losses occurred after gestational week 20 and nearly half occurred after gestational week 25. Similarly, women vaccinated with dose 3 during weeks 8-13 exhibited a *higher-than-expected* number of fetal losses with nearly 1.9 (95% CI: 0.39-3.42) additional fetal losses above expected per 100 pregnancies. In contrast, pregnant women vaccinated for influenza during weeks 8-27 exhibited a consistently *lower-than-expected* observed number of fetal losses, likely the result of healthy vaccinee bias. Women vaccinated for COVID-19 or influenza prior to pregnancy exhibited *according-to-expected* or *lower-than-expected* numbers of fetal losses.

Conclusion

The results provide evidence for a substantially *higher-than-expected* number of eventual fetal losses associated with COVID-19 vaccination during gestational weeks 8-13.

INTRODUCTION

Pregnant women were excluded from the pivotal randomized clinical trials used for the initial regulatory approvals of the COVID-19 vaccines. The one subsequent randomized clinical trial in pregnant women was conducted by Pfizer and only included 173 women who were vaccinated in relatively advanced stages of pregnancy (gestational weeks 24-34) (Pfizer 2023).

Observational studies on COVID-19 vaccination during pregnancy predominantly compare outcomes between vaccinated and unvaccinated pregnant women during active vaccination campaigns using various regression models (Fell, Dhinsa, et al. 2022, Magnus, et al. 2022, Calvert, Carruthers, et al. 2022, Velez, et al. 2023, Calvert, Carruthers, et al. 2023, Goldshtein, Steinberg, et al. 2022, Hui, et al. 2023, Rimmer, et al. 2023). Among these studies, only a few have considered the impact of COVID-19 vaccination in early stages of pregnancy, when the risk of teratogenicity is likely the highest (Calvert, Carruthers, et al. 2022, Velez, et al. 2023, Shimabukuro, et al. 2021). Additional studies of the association between COVID-19 vaccination in early pregnancy and spontaneous abortions (prior to week 20) used a case control method. (Kharbanda, Haapala and DeSilva, et al. 2021, Kharbanda, Haapala and Lipkind, et al. 2023)

With a few exceptions (Aharon, et al. 2022, Kuhbandner and Reitzner 2023, Velez, et al. 2023), studies on COVID-19 vaccination during pregnancy have not reported on any statistically significant association of adverse pregnancy outcomes with COVID-19 vaccination during pregnancy. (Rimmer, et al. 2023, Prasad, et al. 2022)

However, these observational studies have known methodological limitations related to controlling for gestational timing of vaccination, the inclusion and exclusion criteria applied, and potential confounding biases that are not controlled for. (Fell, Dimitris, et al. 2021) In particular, observed and unobserved differences in health status between vaccinated and unvaccinated women could affect the studied outcomes and be a source of methodological bias, referred to as *healthy (or unhealthy) vaccinee bias*. (Høeg, Duriseti and Prasad 2023, Remschmidt, Wichmann and Harder 2015)

The present study aimed to assess the impact of COVID-19 vaccination during gestational weeks 8-27 by leveraging anonymized data from Maccabi Healthcare Services (MHS), the second largest health fund in Israel. The main analysis considered different exposed cohorts of pregnant women, defined

based on the timing and dose of vaccination, and using historical data, analyzed the respective observed-to-expected difference in the number of fetal losses within each cohort.

Israel was the first country in the world to launch a nationwide COVID-19 vaccination campaign, starting in December 2020, using almost exclusively the Pfizer BNT162b2 mRNA vaccine. In August 2021, Israel was again the first country to vaccinate the population with a booster dose. A recommendation to vaccinate pregnant women was published by the Israeli Ministry of Health on January 19, 2021, and was initially restricted to the 2nd and 3rd trimesters before being extended to all stages of pregnancy on February 1, 2021. There are several studies on the association between COVID-19 vaccination and various pregnancy outcomes based on data from Israel, but they share similar methodological limitations to those mentioned above. (Wainstock, Yoles and Sergienko 2021, Lipschuetz, et al. 2023, Dick, et al. 2022, Rottenstreich, et al. 2022, Goldshtein, Steinberg, et al. 2022)

MATERIALS AND METHODS

Data Sources

This study relies on the centralized electronic health record (EHR) database maintained by MHS since the 1990's, comprised of a longitudinal database on 2.7 million patients (26% of Israel's population) with minimal turnover (~1% annually). Anonymized data from the MHS pregnancy registry were extracted on May 6, 2023, at which point the registry contained information on 1,330,845 pregnancies since 1990. This study used 226,395 pregnancies with complete and reliable data and LMP between March 1, 2016 and February 28, 2022. The registry includes information routinely recorded by obstetricians, including pregnancy outcomes and the date on which they occurred, date of last menstrual period (LMP), number of embryos, and whether the pregnancy was considered high risk, along with the date on which the pregnancy entered the high-risk category. Data from the pregnancy registry were joined with other EHR data pertaining to diagnosed clinical conditions, claims for medical services and procedures, and a specialized COVID-19 registry that included information on COVID-19 vaccination records and laboratory findings from a central laboratory. MHS' institutional review board approved the study, which was exempt from informed consent due to its retrospective nature and the use of routinely collected anonymized information.

Exposures

The primary analysis included cohorts of pregnant women exposed to dose 1 or 3 of any COVID-19 vaccination during pregnancy, with separate cohorts for exposure during gestational weeks 8-13 and weeks 14-27, respectively. Dose 2 was included only as a supplementary analysis, since the vast majority of women who received dose 1 continued to receive dose 2. The dose 3 cohorts include only women who received two doses prior to pregnancy. The study also included single-week cohorts for gestational weeks $W=8, \dots, 27$, each composed of women who vaccinated on the specific gestational week W for COVID-19 (dose 1 or 3), respectively. The prospective risk of each woman included in these COVID-19 vaccination cohorts is assessed prospectively from a *risk week* defined as the gestational week of vaccination. (See the discussion regarding the outcomes below.)

Women vaccinated during gestational weeks 1-7 were excluded, because identification and follow-up of pregnancies during these weeks is partial and inconsistent, raising concerns about reporting biases; for example, vaccinated women might be more prone to report early fetal loss. By week 8 or 9, almost all pregnancies are already under follow-up and documentation is substantially more consistent.

To address, at least partially, bias from potentially unobserved confounding covariates, the analysis considered two types of comparative control cohorts. First, control cohorts were similarly defined for exposure to influenza vaccination during gestational weeks 8-13 and 14-27, as well as single-weeks $W=8, \dots, 27$. Second, exposure to vaccination prior to pregnancy was considered as another control with single-week cohorts for gestational weeks $W=8, \dots, 27$, each including women still pregnant at the start of week W , who received doses 1 and 2, dose 3 or influenza vaccination prior to pregnancy. In these latter cohorts, the risk week is defined as the respective gestational week W .

Exploratory analysis included exposure to SARS-CoV-2 infection during pregnancy (confirmed by positive PCR test), with cohorts corresponding to infection occurring during gestational weeks 8-13 and 17-24 with and without prior COVID-19 vaccination, respectively.

Outcomes

The main outcome of the study was eventual fetal loss throughout pregnancy, which is a composite measure that includes spontaneous and induced abortions and stillbirths. The composite outcome was determined based on the pregnancy registry, diagnosis and procedural codes. (See Table S1 in the

Supplementary Appendix for detailed description.) While spontaneous abortions and stillbirths occur involuntarily and are driven by biological mechanisms, induced abortions can be either elective or therapeutic (i.e., driven by medical reasons). Elective abortions are typically driven by personal considerations or reasons such as the age of the mother and the circumstances of the pregnancy (e.g., outside marriage or the result of relationships prohibited by criminal law). Medical reasons for induced abortions (e.g., fetal defects and malformation) involve biological mechanisms, overlapping with those of spontaneous abortions and stillbirths. Diagnosis and claims data related to induced abortions often do not include clear documentation of the underlying rationale and many are driven by fetal health concerns.

To assess the plausibility that the findings regarding the eventual fetal loss rates were not entirely driven by elective decisions of women, late fetal losses from gestational weeks 14, 20 and 25, respectively, were considered as additional outcomes. In Israel, all induced abortions must be pre-approved by special committees that are appointed within healthcare institutions. A recent report by the Israeli Ministry of Health on temporal trends of induced abortions during 1990-2022 indicates that elective abortions after gestational week 14 have become increasingly rare, and induced abortions after week 24 are rare and only granted for medical reasons. (Israel Ministry of Health 2023)

Observed-to-Expected Numbers of Eventual Fetal Loss

The primary analyses in this study followed a commonly used approach in vaccine safety studies where the observed incidence of adverse events among vaccinated individuals is compared to the expected incidence based on background rates in the general population. (Gordillo-Marañón, et al. 2024, Mahaux, Bauchau and Holle 2015) Unlike existing studies on the safety of vaccination during pregnancy that have used expected background incidence rates that are not specific to the study's population (Shimabukuro, et al. 2021), the current study estimated the cohort-specific expected number of fetal losses adjusted for the individual-level characteristics of the vaccinated women.

The adjusted estimates of the expected number of fetal losses were calculated based on an individual-level *baseline reference model* obtained by training a pooled logistic regression model on pregnancies with LMPs between March 1, 2016 and February 28, 2018. This model took as an input a pregnancy on a given gestational risk week. It then estimated the prospective risk of eventual fetal loss from that

week throughout the pregnancy, adjusting for the gestational age and calendar month of the pregnancy, age of the woman, as well as multiple covariates that capture the woman's health status, health-seeking behavior and other socioeconomic factors. For a detailed description of the baseline reference model, covariates and model results see Supplementary Appendix Section S1 and Tables S1 and S2.

The cohort-specific expected number of eventual fetal losses was calculated by summing the predicted individual risk probabilities of all the women in the cohort, which were calculated based on the week in which each of them were exposed (i.e., the risk week). The expected number was then compared to the observed number of fetal losses in the cohort. Figure S1 in the Supplementary Appendix illustrates how the analysis was conducted on the vaccination cohorts for gestational weeks 8-13. The cohort-specific expected and observed numbers of fetal losses are reported (as number of fetal losses per 100 pregnancies), together with the observed-to-expected difference, the 95% confidence interval (CI), and the number of pregnancies included in each cohort. The ratios of observed-to-expected fetal losses with corresponding 95% CI's are reported separately in the Supplementary Appendix. For a description of how the expected values and CI's were calculated, see section S2 in the Supplementary Appendix.

The analysis can be interpreted as a simulated trial, where each vaccinated pregnant woman included in the cohort was 'matched' with a '*synthetic* unvaccinated control' with similar individual and pregnancy characteristics. The outcomes of the synthetic controls were 'simulated' based on the baseline reference model and compared to the observed outcomes. By comparing vaccinated women to historical (synthetic) controls rather than controls within the vaccination period, the observed-to-expected analysis allowed maximal 'matching' on observed covariates and uncensored follow-up time.

Late fetal losses. To address the potential concern that women vaccinated for COVID-19 (dose 1 or 3) or influenza in early gestational weeks (8-13) could have been more (or less) prone to have purely elective induced abortions, the observed-to-expected difference in the number of eventual fetal losses was calculated from weeks 14, 20 and 25 for women vaccinated in weeks 8-13. Notably, the individual risk of eventual fetal loss, for each woman in these cohorts, was estimated prospectively at gestational weeks 14, 20 and 25, separately, for all the women who were still pregnant at the beginning of the respective week. In addition, the percentage of women experiencing fetal loss from gestational week

25 onward was calculated for women receiving COVID-19 vaccination (dose 1 or 3) or influenza vaccination, in each of the weeks $W=8, \dots, 13$. These were then compared to the same percentage among all women still pregnant at the start of each week W .

Validation and Robustness Analyses

To obtain out-of-sample validation of the baseline reference estimates and assess how consistent they were between different analysis periods, the observed-to-expected analysis was conducted for influenza vaccination cohorts with LMPs from March 1, 2018 to February 28, 2019. These included the cohorts of gestational weeks 8-13, weeks 14-27, as well as single-week cohorts $W=8, \dots, 27$ with influenza vaccination prior to pregnancy but in the same influenza season as the LMP.

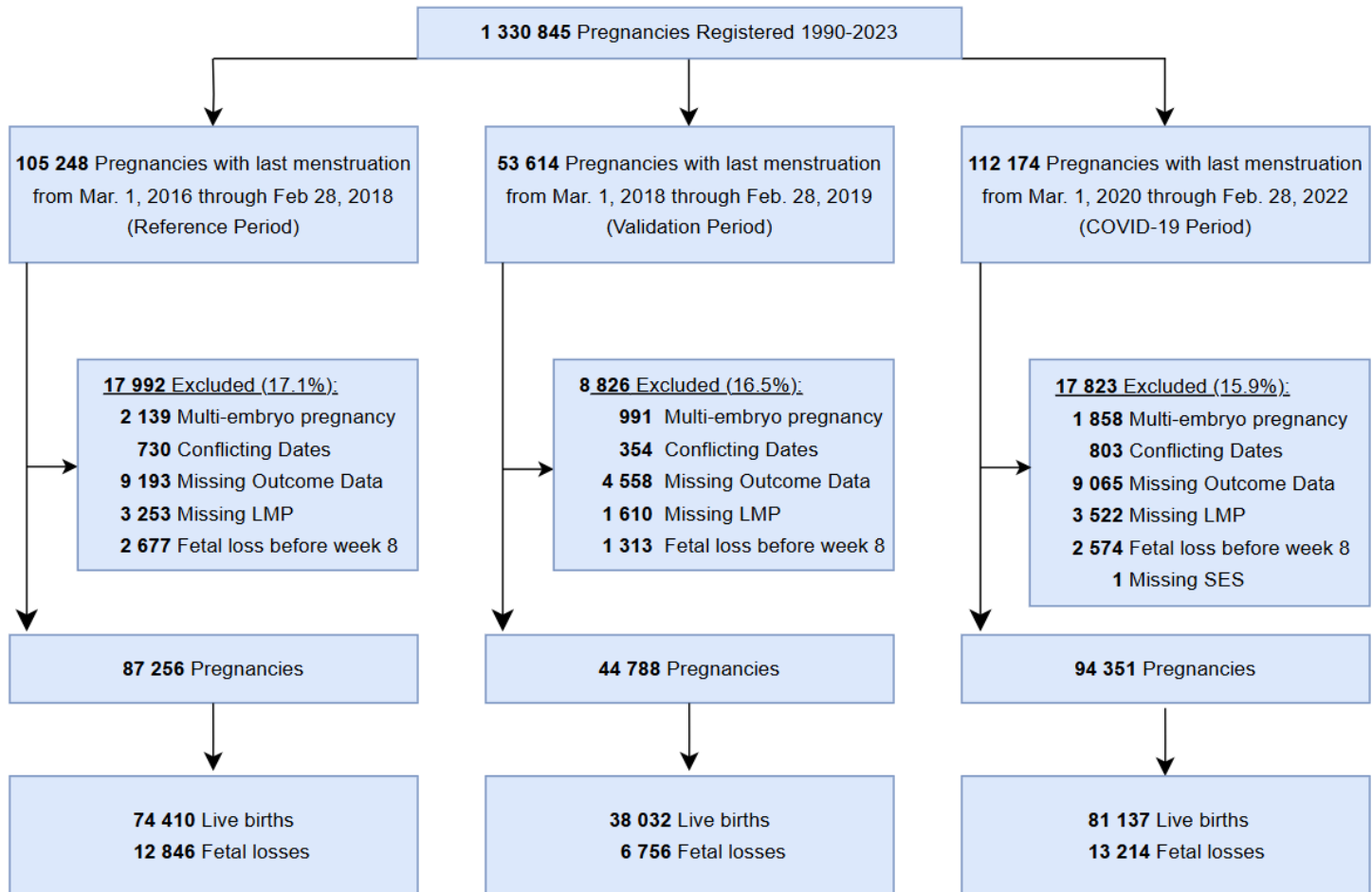
Several additional robustness analyses were conducted. First, the main observed-to-expected analyses were repeated using a baseline reference model that was estimated on data from March 1, 2016 through February 28, 2019. Second, to assess the sensitivity of the results to the choice of the follow-up start time (week 8), the observed-to-expected analysis was repeated when pregnancies were followed from week 10.

Complementary analyses were conducted to compare both the risk score and covariate distributions of the cohort of women vaccinated for COVID-19 in weeks 18-13 with the corresponding influenza vaccination cohort, as well as women exposed to influenza or COVID-19 vaccination prior to pregnancy. To assess the correlation between influenza and COVID-19 vaccination in early stages of pregnancy, the women whose pregnancy's timing allowed them to receive dose 1 of the COVID-19 vaccine during gestational weeks 8-13 and 8-27, respectively, were identified. Within these groups, women who received influenza vaccines in the same season were compared to women who did not.

RESULTS

Figure 1 presents the pregnancies included and excluded from the analysis, along with the reasons for exclusion. Table S3 presents descriptive statistics on the covariates for women included in each of the three analysis periods (Reference, Validation and COVID-19). It shows small differences in the mean value of some covariates, which were adjusted for in the observed-to-expected analyses. The rates of COVID-19 vaccination during pregnancy and their calendar timing are described in the Supplementary Appendix section S4 and Figure S5.

Figure 1. Pregnancies Included and Excluded from Analyses



Observed-to-Expected Analysis

Vaccination during pregnancy. Table 1 shows the results of the observed-to-expected analysis for women vaccinated during weeks 8-13 and 14-27. Women vaccinated for COVID-19 with doses 1 or 3 during weeks 8-13 exhibited *higher-than-expected* numbers of observed fetal losses throughout pregnancy. The observed-to-expected differences were 3.85 (95% CI: [2.55-5.14]) for dose 1, and 1.9 (95% CI: 0.39-3.42]) for dose 3, i.e., an additional 3.85 and 1.9 observed fetal losses above expected per 100 pregnancies, respectively. For COVID-19 vaccination during weeks 14-27, the observed numbers of fetal losses were *lower-than-expected*, with observed-to-expected differences of -0.79 (95% CI: [-1.07 - -0.51]) for dose 1 and -0.85 (95% CI: [-0.48 - -0.37]) for dose 3.

In marked contrast, the corresponding influenza vaccination cohorts exhibited *lower-than-expected* numbers of observed fetal losses with observed-to-expected differences of -5.11 (95% CI: [-6.06 - -4.16]) and -1.24 (95% CI: [-1.61 - -0.98]) for weeks 8-13 and 14-27, i.e., 5.11 and 1.24 fewer fetal losses per 100 pregnancies compared to expected, respectively. The results for COVID-19 vaccine dose 2 are similar to dose 1 and are shown in Table S4 in the Supplementary Appendix. The observed-to-expected fetal loss ratios are reported in Table S6.

Figure 2 shows the observed-to-expected results for each individual week-level cohort $W=8, \dots, 27$, for COVID-19 dose 1 and influenza vaccination. These exhibited patterns consistent with the results in Table 1 for cohorts of women who vaccinated during weeks 8-13 and 14-27. Figure 2(a) shows that, for each of the weeks $W=8, \dots, 13$, women who were vaccinated with dose 1 during week W , exhibited *higher-than-expected* numbers of observed fetal losses with observed-to-expected differences as high as an additional 9 fetal losses over expected per 100 pregnancies. The observed-to-expected difference remained positive but decreased from week 9 through week 13, and in weeks $W=14, \dots, 27$, the pattern was reversed with a *lower-than-expected* number of observed fetal losses. In contrast, the corresponding influenza vaccination cohorts shown in Fig. 2(b) exhibited substantially *lower-than-expected* observed numbers of fetal loss rates throughout all weeks $W=8, \dots, 27$. The results for COVID-19 vaccination doses 2 and 3 are presented in Figure S2 in the Supplementary Appendix.

Table 1. Observed-to-Expected Eventual Fetal Losses among Women Vaccinated for COVID-19 or Influenza in Gestational Weeks 8-13 and 14-27

Cohort	Observed Fetal Losses per 100 Pregnancies (n)	Expected Fetal Losses per 100 Pregnancies ^a (n)	Observed-to- Expected Difference per 100 Pregnancies (n)	95% C.I. Observed-to- Expected Difference per 100 Pregnancies	Cohort Size N
<u>COVID-19 Dose 1</u>^b					
During weeks 8-13	13.06 (240)	9.22 (169)	3.85 (71)	[2.55 - 5.14]	1 837
During weeks 14-27	1.74 (214)	2.53 (309)	-0.79 (-95)	[-1.07 - -0.51]	12 274
<u>COVID-19 Dose 3</u>^b					
During weeks 8-13	12.04 (175)	10.14 (147)	1.90 (28)	[0.39 - 3.42]	1 454
During weeks 14-27	1.92 (145)	2.77 (209)	-0.85 (-64)	[-0.48 - -0.37]	7 546
<u>Influenza Vaccine</u>^c					
During weeks 8-13	6.13 (248)	11.24 (455)	-5.11 (-207)	[-6.06 - -4.16]	4 048
During weeks 14-27	1.31 (126)	2.60 (250)	-1.29 (-124)	[-1.61 - -0.98]	9 586

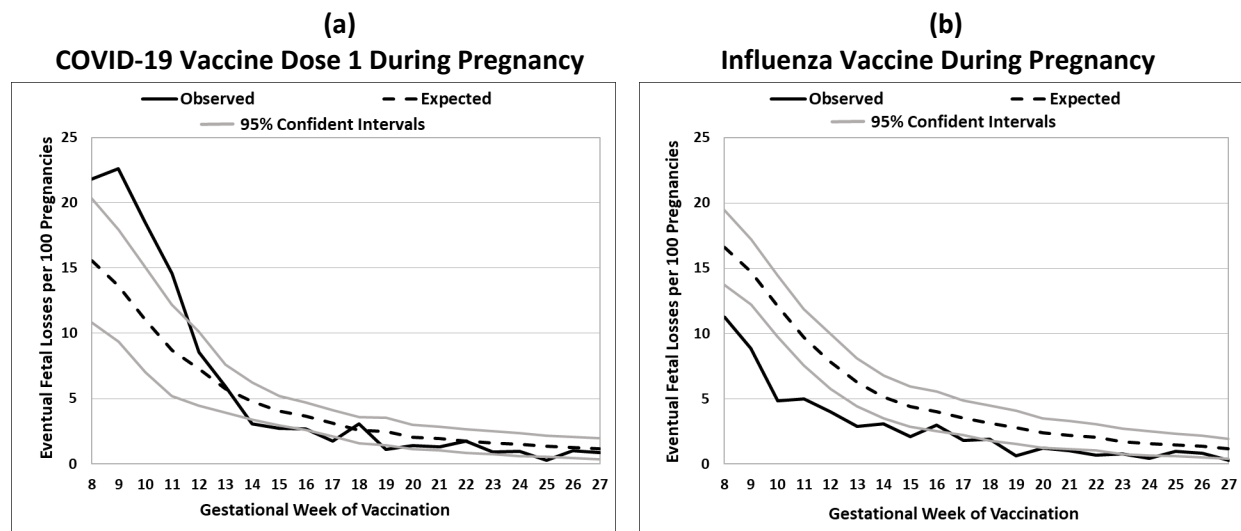
Notes: Table 1 shows observed-to-expected fetal losses (per 100 pregnancies) among women vaccinated for COVID-19 (dose 1 or 3) or influenza with LMP from Mar. 1, 2020 – Feb. 28, 2022. Numbers (n) in parentheses report the corresponding total (observed/expected) number of fetal losses in the cohort.

a. The number of expected fetal losses was obtained by summing the predicted probabilities of eventual fetal loss of women vaccinated in each gestational week, which were estimated from the baseline reference model for each woman, based on her covariate values and gestational week of vaccination (see Table S2 in Supplementary Appendix for full list of covariates and model results).

b. Of women vaccinated with dose 1 during weeks 8-13 and 14-27, 97% and 96% received BNT162b2. For dose 3, nearly 100% of women vaccinated during weeks 8-13 and 14-27 received BNT162b2.

c. The influenza vaccination cohort corresponds to two influenza seasons during Mar. 1, 2020 – Feb. 28,

Figure 2. Observed-to-Expected Eventual Fetal Losses by Gestational Week of Vaccination among Women Vaccinated for COVID-19 or Influenza



Legend:

- Panel (a) shows results for women who received dose 1 of COVID-19 vaccination in pregnancy during the respective gestational week indicated on the X axis; panel (b) shows results for women who received an influenza vaccination during the respective gestational week. Cohort sizes for each gestational week are reported in Table S9 in the Supplementary Appendix.
- For each panel, the Y-axis indicates the observed (solid black) and expected (dashed black) number of eventual fetal losses (per 100 pregnancies) among women with LMP from Mar. 1, 2020 – Feb. 28, 2022 who were vaccinated on the gestational week indicated on the X-axis. The grey solid lines show the 95% confidence interval of the expected fetal losses per 100 pregnancies in each week. See section S2 in the supplementary Appendix for a description of how the CI's were calculated.
- The number of expected fetal losses was obtained by summing the predicted probabilities of eventual fetal loss of women vaccinated in each gestational week, which were estimated from the baseline reference model for each woman, based on her covariate values and gestational week of vaccination (see Table S2 in Supplementary Appendix for full list of covariates and model results).

Late fetal losses. Table 2 shows the results of the observed-to-expected eventual fetal loss analysis of the women who vaccinated for COVID-19 (dose 1 or 3) or influenza during gestational weeks 8-13 and were still pregnant at the beginning of gestational weeks 14, 20 and 25, respectively. Both the dose 1 and 3 cohorts continued to exhibit substantial residual *higher-than-expected* numbers of eventual fetal losses through gestational week 25. For dose 1, the observed-to-expected difference in week 14 was 3.05 (95% CI: [2.06 – 4.05]), i.e., more than 3 additional fetal losses per 100 pregnancies over expected,

which was very close to the 3.85 observed-to-expected difference reported in Table 1. The observed-to-expected differences in weeks 20 and 25 were 2.47 (95% CI: [1.78 – 3.16]) and 1.66 (95% CI: [1.11 – 2.]) fetal losses above expected per 100 pregnancies, respectively. For dose 3, the observed-to-expected difference in week 14 was 2.73 (95% CI: [1.57 – 3.89]) fetal losses above expected per 100 pregnancies, which was higher than the 1.9 reported in Table 1, and in weeks 20 and 25, it was 1.52 (95% CI: [0.71 – 2.54]) and 0.95 (95% CI: [0.30 – 1.]) fetal losses above expected per 100 pregnancies, respectively. In contrast, the *lower-than-expected* observed number of eventual fetal losses of the influenza cohort exhibited rapidly shrinking negative observed-to-expected differences with -2.27 (95% CI: [-2.96 - -1.58]), -0.91 (95% CI: [-1.39 - -0.44]) and -0.78 (95% CI: [-1.16 - -0.39]) fetal losses per 100 pregnancies in weeks 14, 20 and 25, respectively, compared to the -5.11 fetal losses per 100 pregnancies reported in Table 1. (See Table S6 for the corresponding observed-to-expected fetal loss ratios.) Furthermore, Table 3 shows that 2.72%, 1.79% and 0.72% of the women who vaccinated during gestational weeks 8-13, with dose 1, dose 3 and influenza, respectively, had a fetal loss from gestational week 25 onward, compared to 0.99% and 1.09% for all women who were still pregnant in weeks 8 and 13, respectively.

Vaccination prior to pregnancy. Figure 3(a) shows observed-to-expected results for each week $W=8,\dots,27$ among women who received two doses prior to pregnancy, whose pregnancies survived to the start of the respective week W and who had not vaccinated with a third dose by the start of the week. Figure 3(b) shows the same for women vaccinated for influenza in the same season as their LMP but prior to pregnancy. Unlike results for vaccination during pregnancy, both COVID-19 and influenza cohorts had similar observed and expected numbers of fetal losses, and the observed numbers were *according-to-expected* or slightly *lower-than-expected*. Figure S3 in the Supplementary Appendix shows similar results for women vaccinated with 3 doses prior to pregnancy.

SARS-CoV-2 infections. The observed numbers of fetal losses were slightly *lower-than-expected* for women with SARS-CoV-2 infections during gestational weeks 8-13 and 14-27 before and after COVID-19 vaccination, except for SARS-CoV-2 infections in gestational weeks 8-13 among unvaccinated women, but all the 95% CIs of the respective observed-to-expected differences included 0 (Table S8). SARS-CoV-2 infection rates before and during pregnancy are described in the Supplementary Appendix section S4.

Table 2. Observed-to-Expected Eventual Late Fetal Losses from Weeks 14, 20 and 25 among Women Vaccinated for COVID-19 or Influenza in Gestational Weeks 8-13

Cohort	Observed Fetal Losses per 100 Pregnancies (n)	Expected Fetal Losses per 100 Pregnancies ^a (n)	Observed-to- Expected Difference per 100 Pregnancies (n)	95% C.I. Observed-to- Expected Difference per 100 Pregnancies	Cohort Size N
<u>COVID-19 Dose 1^b</u>					
<i>From Week 14</i>	7.85 (136)	4.79 (83)	3.05 (53)	[2.06 - 4.05]	1 733
<i>From Week 20</i>	4.60 (77)	2.13 (36)	2.47 (41)	[1.78 - 3.16]	1 674
<i>From Week 25</i>	3.04 (50)	1.37 (23)	1.66 (27)	[1.11 - 2.23]	1 646
<u>COVID-19 Dose 3^b</u>					
<i>From Week 14</i>	7.92 (110)	5.19 (72)	2.73 (38)	[1.57 - 3.89]	1 389
<i>From Week 20</i>	3.83 (51)	2.31 (31)	1.52 (20)	[0.71 - 2.54]	1 330
<i>From Week 25</i>	2.44 (32)	1.49 (19)	0.95 (13)	[0.30 - 1.61]	1 311
<u>Influenza Vaccine^c</u>					
<i>From Week 14</i>	3.01 (118)	5.28 (207)	-2.27 (-89)	[-2.96 - -1.58]	3 918
<i>From Week 20</i>	1.45 (56)	2.36 (91)	-0.91 (-35)	[-1.39 - -0.44]	3 856
<i>From Week 25</i>	0.76 (29)	1.53 (59)	-0.78 (-30)	[-1.16 - -0.39]	3 828

Notes: Table 2 shows the number of observed-to-expected eventual fetal losses (per 100 pregnancies) for women with LMP from Mar. 1, 2020 – Feb. 28, 2022 who were vaccinated for COVID-19 (dose 1 or 3) or influenza during gestational weeks 8-13. Numbers (n) in parentheses report the corresponding total number of (observed/expected) fetal losses in the cohort.

a. The number of expected fetal losses was obtained by summing the predicted probability of eventual fetal loss of women in each vaccination cohort from the respective gestational week (14, 20, 25), which were estimated for each woman from the reference baseline model, based on her covariate values and gestational week of pregnancy (14, 20, 25) (see Table S2 in Supplementary Appendix for list of covariates and model results). Women who experienced fetal loss prior to the respective week (14, 20, 25) were not included in the calculation.

b. Of women vaccinated with dose 1 during weeks 8-13, 97% received BNT162b2. For dose 3, nearly 100% of women vaccinated during weeks 8-13 received BNT162b2.

c. The influenza vaccination cohort corresponds to two seasons from Mar. 1, 2020 – Feb. 28, 2022.

Table 3. Observed Fetal Losses from Week 25 among Women Vaccinated for COVID-19 or Influenza and All Women in Gestational Weeks 8-13

Week	Cohort Size (N)	Fetal Losses from Week 25 (n)	Fetal Losses from Week 25 (%)
DOSE 1			
8	211	5	2.37%
9	239	9	3.77%
10	227	5	2.20%
11	240	8	3.33%
12	315	8	2.54%
13	605	15	2.48%
8-13	1837	50	2.72%
DOSE 3			
8	205	2	0.98%
9	231	4	1.73%
10	218	7	3.21%
11	230	8	3.48%
12	309	3	0.97%
13	590	8	1.36%
8-13	1783	32	1.79%
INFLUENZA			
8	621	3	0.48%
9	736	6	0.82%
10	706	2	0.28%
11	700	10	1.43%
12	621	4	0.64%
13	664	4	0.60%
8-13	4048	29	0.72%
ALL WOMEN			
8	94351	935	0.99%
9	92492	935	1.01%
10	90096	935	1.04%
11	88093	935	1.06%
12	86677	935	1.08%
13	85567	935	1.09%

Notes: Table 3 panels show the rate of eventual fetal loss beginning from week 25 for women vaccinated for COVID-19 dose 1, dose 3, influenza and for all women with LMP from Mar. 1, 2020 – Feb. 28, 2022. For vaccination cohorts, the N is the number of women vaccinated in the given week, and for all women the N is the number of women still pregnant at the start of the given week. The vaccination cohorts also show combined calculations for all women in the 8-13 week cohorts, which can be compared to week 13 for all women.

Figure 3. Observed-to-Expected Eventual Fetal Losses among Women Vaccinated for COVID-19 or Influenza Prior to Pregnancy

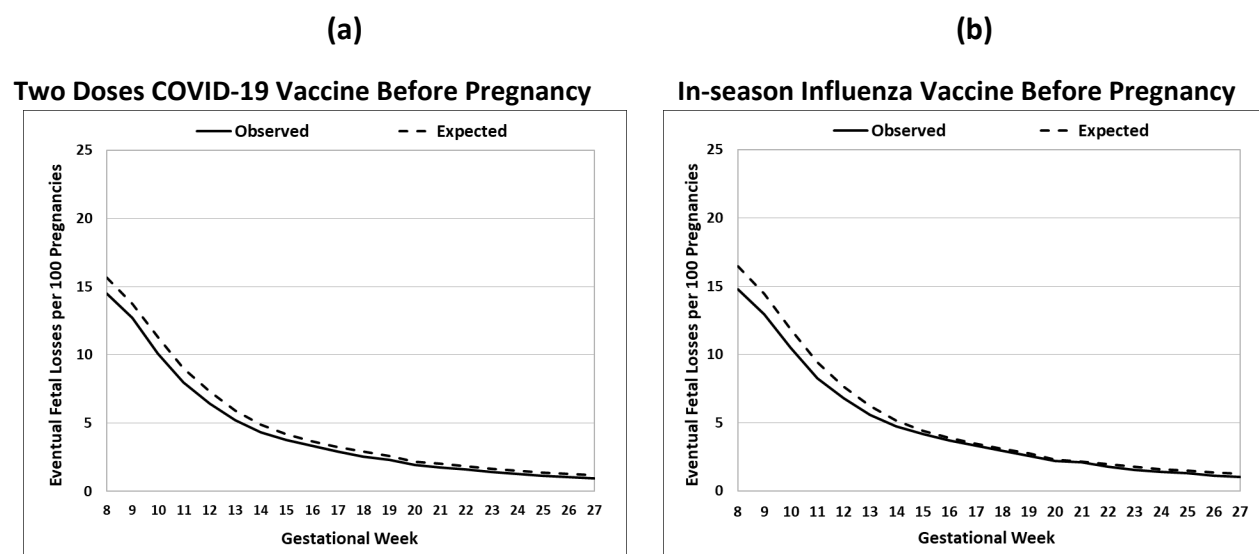


Figure 3 Legend:

- Panel (a) shows results for women who received 2 doses of COVID-19 vaccination prior to LMP and whose pregnancies were ongoing at the start of the respective gestational week indicated on the X axis; panel (b) shows similar results for women who received an influenza vaccination prior to LMP. Cohort sizes for each week are reported in Table S9 in the Supplementary Appendix.
- For each panel, the Y-axis indicates the observed (solid black) and expected (dashed black) number of eventual fetal losses per 100 pregnancies among women with LMP from Mar. 1, 2020 – Feb. 28, 2022 who were still pregnant at the beginning of each gestational week (8-27) indicated on the X-axis.
- The number of expected eventual fetal losses was obtained by summing the predicted probabilities of eventual fetal loss of women in each cohort, which were estimated from the reference baseline model for each woman, based on her covariate values and the respective gestational week of pregnancy indicated on the X axis (see Table S2 in Supplementary Appendix for full list of covariates and model results). Women experiencing fetal loss prior to the respective gestational week on the X-axis were not included in the calculation.

Validation and Robustness Results

The results of the observed-to-expected analysis for influenza vaccination during the pre-pandemic period from March 1, 2018 – February 28, 2019 were very similar to the results of the primary analysis, suggesting that year-to-year changes in patterns of the observed-to-expected differences in the numbers of eventual fetal losses were relatively low (Table S5, Figure S4).

Comparison between women in the dose 1 during gestational weeks 8-13 cohort to the control cohorts (influenza vaccination during weeks 8-13 and COVID-19 and influenza vaccination prior to pregnancy) indicates that the risk scores of women in the control cohorts were relatively higher (Table S7). This could be explained by differences in covariate distributions, where the control cohorts had a higher fraction of women with comorbidities and risk factors.

Most women (89%) who vaccinated with dose 1 during gestational weeks 8-27 had an LMP from Oct. 2020 – Jan. 2021 (see Figure S5 for monthly distribution). Overall, 20,383 pregnancies with LMPs during these months had an opportunity to receive dose 1 of COVID-19 vaccination in gestational weeks 8-27. Of those, 2,984 had received an influenza vaccine during the 2020-2021 influenza season. Women who received influenza vaccine were about 2-fold more likely to receive dose 1 of the COVID-19 vaccine than women who did not (15.08% vs. 7.25% for weeks 8-13 and 71.31% vs. 37.94% for weeks 8-27).

Results with the baseline reference model estimated on data from March 2016 through February 2019 were very similar to the results of the primary analysis. The results also remained very similar when pregnancies were followed from week 10.

DISCUSSION

The main finding of this study is that COVID-19 vaccination with any dose during gestational weeks 8-13 of pregnancy was associated with *higher-than-expected* observed number of fetal losses (Tables 1, S4). For dose 1, this amounted to close to 4 (3.85) additional fetal losses above expected for every 100 pregnancies that were exposed to dose 1 of COVID-19 vaccination during weeks 8-13, or approximately 13 observed fetal losses per 100 pregnancies versus 9 expected. Similarly, women vaccinated with dose 3 during weeks 8-13 exhibited nearly 1.9 additional fetal losses per 100 pregnancies over expected.

Women who were vaccinated during weeks 8-13 sustained *higher-than-expected* observed numbers of eventual fetal losses over the course of their pregnancy. Out of the 3.85 additional fetal losses per 100 pregnancies above expected for dose 1 (Table 1), over 3 occurred from week 14 onward, and slightly under half, or 1.66 fetal losses, occurred from gestational week 25 onward (Table 2). Moreover, 2.72% of women vaccinated with dose 1 and 1.79% of women vaccinated with dose 3 during weeks 8-13 had a fetal loss from week 25 onward, which was substantially higher than the rate of 1% for all pregnant women and 0.79% of women vaccinated for influenza during (Table 3). This indicates that a large part of the *higher-than-expected* observed number of fetal losses associated with COVID-19 vaccination during gestational weeks 8-13 unambiguously stemmed from late fetal losses, i.e., stillbirths and spontaneous or therapeutic abortions driven by biological mechanisms and medical reasons, rather than to behavioral patterns that typically drive purely elective abortions.

Comparing the observed-to-expected patterns of COVID-19 vaccination during weeks 8-13 to the corresponding patterns during weeks 14-27 as well as to the comparative control cohorts provides important context to their interpretation. The *higher-than-expected* observed number of fetal losses for COVID-19 vaccination during weeks 8-13 changed rapidly, and gestational weeks 14-27 exhibited *lower-than-expected* observed numbers. Additionally, in contrast to COVID-19 vaccination, influenza vaccination during pregnancy exhibited substantial *lower-than-expected* numbers of observed fetal losses throughout gestational weeks 8-27, with 5.11 fewer fetal losses compared to expected per 100 pregnancies for influenza vaccination during weeks 8-13 (Tables 1 and Figure 2(b)). The comparative control cohorts, corresponding to vaccination prior to pregnancy, also exhibited observed-to-expected patterns that were very different from COVID-19 vaccination during weeks 8-13, with women vaccinated prior to pregnancy exhibiting either slightly *lower-than-expected* or *according-to-expected* observed numbers (Figures 3 and S3).

There is a marked difference in observed-to-expected patterns of COVID-19 vaccinations between gestational weeks 8-13 and weeks 14-27 or prior to pregnancy. This difference, coupled with the *higher-than-expected* number of late fetal losses associated with vaccination during weeks 8-13 (including from week 25 onward), may be consistent with underlying biological mechanisms that depend on the timing of exposure during pregnancy. Indeed, exposure to teratogens, especially in early phases of pregnancy, is a known risk for adverse pregnancy outcomes and has been discussed in

the context of vaccination, including influenza vaccines. (Bednarczyk and Adjaye-Gbewonyo 2012, Skowronski 2009) The critical period for the development of many congenital abnormalities overlaps with the early stages of pregnancy and specifically the 1st trimester. (Czeizel 2008) Moreover, recent evidence suggests that transplacental transmission of COVID-19 mRNA vaccines occurs (Lin, et al. 2024, Chen, et al. 2025), and an in-vitro study shows suppression of embryo-fetal globin genes in human erythroleukemia K562 cells following exposure to the BNT162b2 vaccine. (Zurlo, et al. 2023) Additionally, mRNA COVID-19 vaccines are associated with thrombotic adverse events, which is another known inciting mechanism of spontaneous abortions. (Berild, et al. 2022)

Notably, the observed-to-expected differences for women receiving doses 1 and 2 during weeks 8-13 (87% of all women who received dose 1 continued to receive dose 2 during pregnancy) were 2-fold higher compared to those for women who received two doses prior to pregnancy and a single dose 3 during weeks 8-13 (3.85 vs. 1.9, respectively). This potential dose-response relationship may also be consistent with biological mechanisms, because the observed-to-expected difference increases with an additional dose received early in pregnancy.

It is plausible that the *lower-than-expected* observed numbers of fetal losses for both COVID-19 vaccination during gestational weeks 14-27 and influenza vaccination during weeks 8-27 were the result of healthy vaccinee bias, rather than a protective effect via vaccination. There is evidence from multiple countries, including Israel, of healthy vaccinee bias in studies on COVID-19 vaccination and hospitalization and death outcomes. (Høeg, Duriseti and Prasad 2023, Riedmann, et al. 2024, Xu, et al. 2021, Furst and Straka 2024) Healthy vaccinee bias, a type of healthy user bias, has also been highlighted in safety and efficacy studies of influenza vaccination, including during pregnancy. (Remschmidt, Wichmann and Harder 2015, Wolfe, et al. 2023, Dozelli 2018) Moreover, the observed-to-expected results for exposure to SARS-CoV-2 infections during pregnancy (Table S8) did not show any signal of significant increase in the number of fetal losses compared to expected even among unvaccinated women. Similarly, the infection rates during the 2020-2021 influenza season were significantly lower than previous years, including for example the 2018-2019 season. (Fratty, et al. 2022) Since the observed-to-expected differences for influenza vaccination during pregnancy in both periods were largely similar, it is unlikely that influenza vaccination reduced fetal losses significantly.

While the *higher-than-expected* numbers of fetal losses associated with exposure to COVID-19 vaccination during gestational weeks 8-13 raises concern, the observed-to-expected analysis is not sufficient to establish a causal relationship.

Even if COVID-19 vaccination early in pregnancy truly increases the number of fetal losses above what is expected, any cumulative population-level impact would have likely been small and not easily detectable by traditional pharmacovigilance mechanisms. The reason for this is that only a relatively small number of women received vaccination during gestational weeks 8-13. In particular, out of the 20,383 women in this study who could have potentially received dose 1 during gestational weeks 8-27 based on their LMP, only 1,837, about 9%, received dose 1 during gestational weeks 8-13. Notably, these women seem to have had a lower *a priori* risk of fetal loss compared to the population. Moreover, 3.85 additional fetal losses per 100 pregnancies amounts to a total of 71 additional fetal losses above expected, which is less than a 0.35% of the 20,383 women. Such a signal could have been easily masked by random variability and temporal trends like the noted trend of decreasing rates of elective induced abortions in Israel, particularly during 2020-2022. (Israel Ministry of Health 2023) Indeed, as can be calculated from Figure 1, the overall percentage of pregnancies that resulted in fetal loss from gestational week 8 was 14% during 2020-2022, compared to 15.08% and 14.7% in 2018-2019 and 2016-2018, respectively.

This highlights the importance of developing robust pharmacovigilance methods, including prospective ones, to detect weak safety signals in sub-groups of the population. This is especially true for common outcomes such as miscarriage, premature birth and fetal abnormalities, which are unlikely to be reported as suspected adverse events unless there are unusual or pathognomonic characteristics, and where the window of teratogenicity may be narrow.

Much of the findings of this study, particularly the observed-to-expected analyses, cannot be directly compared to prior work, which focused almost entirely on risk-adjusting regression analyses that compare vaccinated to unvaccinated women during vaccination campaigns and mostly studied the impact of vaccination during later stages of pregnancy. (Rimmer, et al. 2023, Prasad, et al. 2022) However, such approaches are often challenged to obtain stable and similar cohorts, even when employing covariate balancing methods, such as inverse probability of treatment weighting (IPTW) and

matching. (McCaffrey, et al. 2013, Austin 2015, Stuart 2010). Two studies on the association between COVID-19 vaccination during pregnancy and the incidence of SARS-CoV-2 infection using data from pregnancy registries in Israel illustrate these limitations. (Goldshtein, Nevo, et al. 2021, Dagan, et al. 2021) The studies were able to successfully match only 63% and 38% of the eligible vaccinated women, respectively. Moreover, 42% and 47% of the matched vaccinated-unvaccinated pairs, respectively, were censored when matched control women were vaccinated, leading to a short follow-up time. In contrast, the observed-to-expected analysis in this study allowed maximal matching of vaccinated women to historical ('synthetic') controls, longer follow up times and assessment of a range of vaccination exposures in terms of doses and timing.

Research from Scotland (Calvert, Carruthers, et al. 2022) is somewhat of an exception in that it matched vaccinated pregnant women to pregnant women with the same maternal age and gestational week from prior years. Although the authors did not report on any significant concerning findings, they did not consider fetal losses after week 20 and their analysis combined exposure starting at 6 weeks preconception with exposure through gestational week 20. Moreover, their matching algorithm was coarse and did not consider many important covariates with known impact on the risk of fetal loss, with the matched cohorts differing significantly. In contrast, the baseline reference model used in the current study relied on all pregnancies with LMP From March 2016 through February 2018 to establish individual adjusted risk scores that consider the specific covariates of the vaccinated women and cohort-specific expected fetal losses throughout the entire pregnancy.

A unique aspect of the current study compared to existing literature on the impact of COVID-19 vaccination during pregnancy was the use of multiple comparative controls. Comparing rates of the same adverse outcomes across different vaccines is commonly used in safety signal detection. (Vellozzi, et al. 2010) While women who were vaccinated for COVID-19 during pregnancy did not have identical characteristics to those who vaccinated for influenza during pregnancy, it is reasonable to assume that the two cohorts shared at least some unobserved confounding factors. Similarly, comparing different timing of vaccination has been previously used to assess potential safety risks of childhood vaccines. (DeStefano, et al. 2001, Velez, et al. 2023)

Limitations. First, the observed-to-expected analysis is appropriate to detect potential safety signals but not to infer a causal relationship between vaccination and increased or decreased fetal loss rates or quantify the magnitude of such potential impact. Like any observational study, there are concerns regarding unobserved confounding covariates. However, if there were, such unobserved confounders would have had to be unique to women who received vaccination for COVID-19 but not for influenza. They also would have needed to be relevant to women who vaccinated during gestational weeks 8-13 but not during weeks 14-27 or prior to pregnancy. Second, this study did not include gestational weeks 1-7 and therefore could not assess the potential impact of vaccination during that period. Third, another general limitation of studies that are based on pregnancy registries stems from the fact that early fetal losses are often not documented, and more generally, the follow up may not be consistent across women. Indeed, there were pregnancies in the registry that were excluded because of lack of appropriate and timely follow-up, and while the analysis did not point to any obvious related biases, it cannot rule them out. Fourth, the Maccabi registry, like most pregnancy registries, did not provide sufficient information to distinguish between purely elective and medically-driven induced abortions. Thus, it is possible that some of the observed-to-expected differences are driven by behavioral mechanisms. For example, women who were vaccinated early in pregnancy may have been more likely to report fetal losses. Finally, this study is based only on data from Israel, and it would be important to conduct studies with similar data from other countries to see whether the results replicate.

Conclusion. Overall, the findings in this paper provided concerning evidence of a *higher-than-expected* fetal loss rate associated with mRNA COVID-19 vaccine doses received during early pregnancy (gestational weeks 8-13). The safety signal should be further investigated by regulatory authorities as part of their risk assessment of vaccination during pregnancy with specific focus on the physiological effects in early pregnancy. There is also a need to conduct pathophysiological studies to better understand the potential biological mechanisms. Additionally, it would be insightful to assess the potential impact of non-mRNA COVID-19 vaccines. The findings also underscore the importance of conducting dedicated and statistically powered prospective clinical trials to study the impact of vaccination for COVID-19 and other pathogens during pregnancy to better inform recommendations to this vulnerable population.

AUTHOR'S ROLES

Conceptualization: JG and RL; Acquisition of data: TP and SG; Data Analysis: JG and RL; Drafting: JG and RL; Interpretation of Results and Critical Review: JG, RL, TP, SG, TBH, JF, YS; Final Approval: JG, RL, TP, SG, TBH, JF, YS; Accountability: JG, RL, TP, SG, TBH, JF, YS

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge helpful feedback and contributions to earlier versions of the paper from Jay Bhattacharya. Additional feedback was provided by Joseph Ladapo, Shoshy Altuvia, Efrat Schur, Alexandra Kalev, Norman Fenton, Clare Craig, Jessica Rose and Sam Saidi.

FUNDING

No authors received funding for this project.

CONFLICTS OF INTEREST

TP, SG, JF and YS declare no conflicts of interest. During this period, RF had active grants from the FDA and the MIT-Takeda Collaboration for projects not connected to the present study. Not connected to the present study, TBH received honoraria and travel reimbursement from the Global Liberty Institute and Heterodox Academy, consulting fees from the Florida Department of Public Health and Real Clear Foundation. JG and TBH received payment from subscribers to their newsletters via Substack, Inc., not connected to the present study. TBH was an unpaid founding member of The Urgency Normal.

REFERENCES

- Abadie, A., S. Athey, and G. W. and Wooldridge, J. M. Imbens. 2023. "When Should You Adjust Standard Errors for Clustering? ." *Q J Econ.* 138 (1): 1-35.
- Aharon, D., M. Lederman, A. Ghofranian, C. Hernandez-Nieto, C. Canon, Hanley W., D. Gounko, J. A. Lee, D. Stein, and E. and Copperman, A. B. Buyuk. 2022. "In Vitro Fertilization and Early Pregnancy Outcomes After Coronavirus Disease 2019 (COVID-19-19) Vaccination." *Obstetrics and Gynecology* 139 (4) : 490-497.
- Austin, P. C. and Stuart E. A. 2015. "Moving towards best practice when using inverse probability of treatment weighting (IPTW) using the propensity score to estimate causal treatment effects in observational studies." *Statistics of Medicine* 34 (28): 3661-3679.
- Bednarczyk, R. A., and D. and Omer, S. B. Adjaye-Gbewonyo. 2012. "Safety of influenza immunization during pregnancy for the fetus and the neonate." *Am J Obstet Gynecol* 270 (3): 38-46.
- Berild, J. D., V. B. Larsen, E. M. Thiesson, T. Lehtonen, M. Grøslund, J. Helgeland, J. Wohlfahrt, J. V. Hansen, and A. A. and Hviid, A. Palmu. 2022. "Analysis of Thromboembolic and Thrombocytopenic Events After the AZD1222, BNT162b2, and mRNA-1273 COVID-19-19 Vaccines in 3 Nordic Countries." *JAMA Network Open* 5 (6): 00-00.
- Bonhoeffer, J., S. Kochhar, S. Hirschfeld, P. Heath, C. E. Jones, J. Bauwens, A. Honrado, et al. 2016. "Global alignment of immunization safety assessment in pregnancy – The GAIA project." *Vaccine* 34 (49): 5993-5997.
- Calvert, C., J. Carruthers, C. Denny, J. Donaghy, S. Hillman, L. E. M. Hopcroft, L. Hopkins, et al. 2022. "A population-based matched cohort study of early pregnancy outcomes following COVID-19-19 vaccination and SARS-CoV-2 infection." *Nature Communications* 13: 6124-6130.
- Calvert, C., J. Carruthers, C. Denny, J. Donaghy, S. Hillman, L. E. M. Hopcroft, L. Hopkins, et al. 2023. "A population-based matched cohort study of major congenital anomalies following COVID-19-19 vaccination and SARS-CoV-2 infection." *Nature Communications* 14: 107.
- Czeizel, A. F. 2008. "Specified critical period of different congenital abnormalities: A new approach for human teratological studies." *Congenital Anomalies* 48 (3): 103-109.
- Dagan, N., N. Barda, T. Biron-Shental, M. Makov-Assif, Key C., I. S. Kohane, M. A. Hernán, M. Lipsitch, S. Hernandez-Diaz, and B. Y. and Balicer, R. D. Reis. 2021. "Effectiveness of the BNT162b2 mRNA COVID-19-19 vaccine in pregnancy." *Nature Medicine* 27: 1693–1695.
- D'Agostino, R. B., M. L. Lee, A. J. Belanger, L. A. Cupples, and K. and Kannel, W. B. Anderson. 1990. "Relation of pooled logistic regression to time dependent Cox regression analysis: the Framingham Heart Study." *Stat Med* 9 (12): 1501-1515.
- D'Agostino, R. B., M. L. Lee, A. J. Belanger, L. A. Cupples, K. Anderson, and W. B. Kannel. 1990. "Relation of pooled logistic regression to time dependent Cox regression analysis: the Framingham Heart Study." *Stat Med.* 9 (12): 1501-1515.
- DeStefano, F., J. P. Mullooly, C. A. Okoro, R. T. Chen, S. M. Marcy, J. I. Ward, C. M. Vadheim, S. B. Black, H. R. Shinefield, and R. L. and Bohlke, K. Davis. 2001. "Childhood Vaccinations, Vaccination Timing, and Risk of Type 1 Diabetes Mellitus." *Pediatrics* 108 (6): 112-.

- Dick, A., J. I. Rosenbloom, E. Gutman-Ido, N. Lessans, and A. and Chill, H. H. Cahen-Peretz. 2022. "Safety of third SARS-CoV-2 vaccine (booster dose) during pregnancy." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 4 (4): 100637.
- Dozelli, A. 2018. "Influenza Vaccinations for All Pregnant Women? Better Evidence Is Needed." *Int J Environ Res Public Health* 15 (9): 2034.
- Fell, D. B., M. C. Dimitris, J. A. Hutcheon, J. R. Ortiz, R. W. Platt, and A. K. and Savitz, D. A. Regan. 2021. "Guidance for design and analysis of observational studies of fetal and newborn outcomes following COVID-19-19 vaccination during pregnancy." *Vaccine* 39 (14): 1882-1886.
- Fell, D. B., T. Dhinsa, G. D. Alton, E. Török, S. Dimanlig-Cruz, A. K. Regan, A. E. Sprague, et al. 2022. "Association of COVID-19-19 Vaccination in Pregnancy With Adverse Peripartum Outcomes." *JAMA* 327 (15): 1478-1487.
- Fratty, I. S., S., Reznik-Balter, I. Nemet, N. Atari, L. Kliker, H. Sherbany, N. Keller, M. Stein, and E. and Mandelboim M. Mendelson. 2022. "Outbreak of Influenza and Other Respiratory Viruses in Hospitalized Patients Alongside the SARS-CoV-2 Pandemic." *Frontier in Microbiology* 13: 00-00.
- Furst, T., and R. and Janosek, J. Straka. 2024. "Healthy vaccinee effect: a bias not to be forgotten in observational studies on COVID-19-19 vaccine effectiveness ." *Pol Arch Intern Med.* 134: 16634.
- Goldshtein, I., D. M. Steinberg, J. Kuint, G. Chodick, Y. Segal, and S. and Ben-Tov, A. Shapiro-Ben-David. 2022. "Association of BNT162b2 COVID-19-19 Vaccination During Pregnancy With Neonatal and Early Infant Outcomes." *JAMA Pediatrics* 176 (5): 470-477.
- Goldshtein, I., D. Nevo, D. M. Steinberg, R. S. Rotem, M. Gorfine, G. Chodick, and Y Segal. 2021. "Association Between BNT162b2 Vaccination and Incidence of SARS-CoV-2 Infection in Pregnant Women." *JAMA* 326 (8): 728-735.
- Gordillo-Marañón, M., G. Candore, K. Hedenmalm, K. Browne, R. Flynn, L. Piccolo, A. Santoro, and C. and Kurz, X. Zaccaria. 2024. "Lessons Learned on Observed-to-Expected Analysis Using Spontaneous Reports During Mass Vaccination." *Drug Safety* 47: 607-615.
- Høeg, T. B., R. Duriseti, and V. Prasad. 2023. "Potential “Healthy Vaccinee Bias” in a Study of BNT162b2 Vaccine against COVID-19-19." *New Journal England of Medicine* 389: 284-286.
- Howards, P. P., and I. and Poole, C. Hertz-Picciotto. 2007. "Conditions for bias from differential left truncation." *Am J Epidemiol* 165 (4): 444-452. doi:10.1093/aje/kwk027.
- Hu, K. and Tong, W. 2021. "Which to select when evaluating risk factors for permanent stoma, COX regression model or logistic regression model?" *Ann Transl Med.* 9 (21): 1634.
- Hui, L., M. B. Marzan, D. L. Rolnik, S. Potenza, N. Pritchard, J. M. Said, K. R. Palmer, and C. L. and Sheehan, P. M. Whitehead. 2023. "Reductions in stillbirths and preterm birth in COVID-19-19–vaccinated women: a multicenter cohort study of vaccination uptake and perinatal outcomes." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 228 (5): 1-16.
- Israel Ministry of Health. 2023. *Pregnancy Termination According to the Law 1990-2022*. Government, Jerusalem, Israel: Israel Ministry of Heal. https://www.gov.il/BlobFolder/reports/abortions-by-law/he/files_publications_info_unit_preg1990_2022.pdf.

- Kharbanda, E. O., J. Haapala, H. S. Lipkind, M. B. DeSilva, J. Zhu, K. K. Vesco, A. L. Naleway, and H. S. and Lipkind. 2023. "COVID-19-19 Booster Vaccination in Early Pregnancy and Surveillance." *JAMA Open* 6 (5): 00-00.
- Kharbanda, E. O., J. Haapala, M. DeSilva, G. Vazquez-Benitez, K. K. Vesco, and A. L. and Lipkind, H. S. Naleway. 2021. "Spontaneous Abortion Following COVID-19-19 Vaccination During Pregnancy." *JAMA* 326 (16): 1629-1631.
- Kuhbandner, C, and M Reitzner. 2023. "Estimation of Excess Mortality in Germany During 2020-2022." *Cureus* 15 (5): 00-00.
- Liang, K.Y. and Zeger, S. L. 1986. "Longitudinal data analysis using generalized linear models." *Biometrika* 73 (1): 13-22. doi:doi:10.1093/biomet/73.1.13.
- Lin, X., B. Botros, M. Hanna, E. Gurzenda, C. M. D. Mejia, and M. and Hanna, N. Chavez. 2024. "Transplacental transmission of the COVID-19-19 vaccine messenger RNA: evidence from placental, maternal, and cord blood analyses postvaccination." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 00: 00-00.
- Lipschuetz, M., J. Guedalia, S. M. Cohen, S. Sompolsky, G. Shefer, E. Melul, Z. Ergaz-Shaltiel, D. Goldman-Wohl, S. Yagel, and O. Calderon-Margalit R. and Beharier. 2023. "Maternal third dose of BNT162b2 mRNA vaccine and risk of infant COVID-19-19 hospitalization." *Nature Medicine* 29: 1155-1163.
- Magnus, M. C., A. K. Örtqvist, E. Dahlqvist, R. Ljung, F. Skår, L. Oakley, F. Macsali, B. Pasternak, H. K. Gjessing, and S. E. and Stephansson, O. Håberg. 2022. "Association of SARS-CoV-2 Vaccination During Pregnancy With Pregnancy Outcomes." *JAMA* 327 (15): 1469-1477.
- Mahaux, O., V. Bauchau, and L V Holle. 2015. "Pharmacoepidemiological considerations in observed-to-expected analyses for vaccines." *Pharmacoepidemiol Drug Safety* 25 (2): 215-222.
- McCaffrey, D. F., B. A. Griffin, D. Almirall, M. E. Slaughter, and R. and Burgette, L. F. Ramchand. 2013. "A Tutorial on Propensity Score Estimation for Multiple Treatments Using Generalized Boosted Models." *Stat Med*. 32 (19): 3388-3414 .
- Pfizer. 2023. *ClinicalTrials.gov: NCT04754594*. US National Library of Medicine. July 13. <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04754594>.
- Prasad, S., E. Kalafat, H. Blakeway, R. Townsend, P. O'Brien, E. Morris, T. Draycott, et al. 2022. "Systematic review and meta-analysis of the effectiveness and perinatal outcomes of COVID-19-19 vaccination in pregnancy." *Nature Communications* 13 (1): 2414.
- Remschmidt, C., O. Wichmann, and T. Harder. 2015. "Frequency and impact of confounding by indication and healthy vaccinee bias in observational studies assessing influenza vaccine effectiveness: a systematic review." *BMC Infectious Diseases* 15: 429.
- Riedmann, U., A. Chalupka, L. Richter, A. Chakeri, Z. El-Khatib, V. Theiler-Schwetz, C. Trummer, et al. 2024. "Effectiveness of a fourth SARS-CoV-2 vaccine dose in previously infected individuals from Austria." *European Journal of Clinical Investigation* 54 (3): 00-00.
- Rimmer, M P, J J Teh, S C Mackenzie, and B H Al Wattar. 2023. "The risk of miscarriage following COVID-19-19 vaccination: a systematic review and meta-analysis." *Human Reproduction* 840-52.
- Rottenstreich, M., H. M. Sela, R. Rotem, E. Kadish, and Y. and Grisaru-Granovsky, S. Wiener-Well. 2022. "COVID-19-19 vaccination during the third trimester of pregnancy: rate of vaccination and maternal and neonatal outcomes, a multicentre retrospective cohort study." *BJOG* 129 (2): 248-255.

- Shimabukuro, T. T., M. Nguyen, and D. and DeStefano, F. Martin. 2015. "Safety monitoring in the Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS)." *Vaccine* 33 (36) : 4398–4405.
- Shimabukuro, T., S. Y. Kim, T. R. Myers, P. L. Moro, T. Oduyebo, L. Panagiotakopoulos, P. L. Marquez, et al. 2021. "Preliminary Findings of mRNA COVID-19-19 Vaccine Safety in Pregnant Persons." *New England Journal of Medicine* 2273-2282.
- Skowronski, D. M and Serres, S. D. 2009. "Is routine influenza immunization warranted in early pregnancy?" *Vaccine* 27 (35): 4754-4770.
- STATA. 2024. "Discrete-time survival analysis." <https://www.stata.com/manuals13/stdiscrete.pdf>.
- Stuart, E. 2010. "Matching methods for causal inference: A review and a look forward." *Stat Sci.* 25 (1): 1-21.
- Suresh, K., C. Severn, and D. Ghosh. 2022. "Survival prediction models: an introduction to discrete-time modeling." *BMC Med Res Methodology* 27: 207.
- Velez, M. P., D. B. Fell, J. P. Shellenberger, and J. C. and Ray, J. G. Kwong. 2023. "Miscarriage after SARS-CoV-2 vaccination: A population-based cohort study." *BJOG* 00: 423.
- Vellozzi, C., K. R. Broder, Haber P., Guh A., Nguyen M., Cano M., Lewis P., et al. 2010. "Adverse events following influenza A (H1N1) 2009 monovalent vaccines reported to the Vaccine Adverse Event Reporting System, United States, October 1, 2009-January 31, 2010." *Vaccine* 28 (45): 7248-55.
- Wainstock, T., I. Yoles, and R. and Sheine, E. Sergienko. 2021. "Prenatal maternal COVID-19-19 vaccination and pregnancy outcomes." *Vaccine* 39 (41): 6037-6040.
- Wolfe, D. M., D. Fell, C. Garritty, C. Hamel, C. Butler, M. Hersi, N. Ahmadzai, et al. 2023. "Safety of influenza vaccination during pregnancy: a systematic review." *Open BMJ* 13 (9): 00-00.
- Xu, S., R. Huang, L. S., Glenn, S. C. Sy, D. S. Ryan, K. Morrisette, D. K. Shay, G. Vazquez-Benitez, et al. 2021. "Vaccination and Non-COVID-19 Mortality Risk — Seven Integrated Health Care Organizations, United States, December 14, 2020–July 31, 2021 ." *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 70: 1520–1524.
- Zurlo, M., J. Gasparello, M. Verona, Papi. C., Cosenza L. C., A. Finotti, and G. and Gambari, R. Marzaro. 2023. "The anti-SARS-CoV-2 BNT162b2 vaccine suppresses mithramycin-induced erythroid differentiation and expression of embryo-fetal globin genes in human erythroleukemia K562 cells." *Exp Cell Res* 433(2): 113853.

Supplementary Appendix

Observed-to-Expected Fetal Losses Following mRNA COVID-19 Vaccination in Early Pregnancy

Table of Contents

Table S1. Dependent and Independent Variable Definitions for Baseline Regression Model in the <i>Reference</i> Period	S1
Section S1. Description of Baseline Reference Regression Model in the <i>Reference</i> period	S2
Table S2. Baseline Pooled Logistic Regression of Eventual Fetal Loss in the <i>Reference</i> Period	S3-S4
Section S2. Formula for Calculating Expected Values and Confidence Intervals for Observed-to-Expected Analysis	S5
Figure S1. Diagram Illustrating Methodological Approach Applied to Cohort of Women Vaccinated in Gestational Weeks 8-13	S6
Table S3. Characteristics of Pregnant Women in the <i>Reference</i> , <i>Validation</i> and <i>COVID-19</i> Periods	S7
Table S4. Observed-to-Expected Eventual Fetal Losses among Women Vaccinated for COVID-19 with Dose 2 in Gestational Weeks 8-13 and 14-27	S8
Figure S2. Observed-to-Expected Eventual Fetal Losses by Gestational Week of Vaccination among Women Vaccinated for COVID-19 with Dose 2 or Dose 3	S9
Figure S3. Observed-to-Expected Eventual Fetal Losses by Gestational Week among Women Vaccinated for COVID-19 with Dose 3 Prior to Pregnancy	S10
Table S5. Observed-to-Expected Eventual Fetal Losses among Women Vaccinated for Influenza in Gestational Weeks 8-13 and 14-27 in the <i>Validation</i> Period	S11
Figure S4. Observed-to-Expected Eventual Fetal Losses by Gestational Week among Women Vaccinated for Influenza Prior to Pregnancy in the <i>Validation</i> Period	S12
Table S6. Observed-to-Expected Eventual Fetal Loss Ratios among All Cohorts of Women Vaccinated in Weeks 8-13 and 14-27	S13
Table S7. Percentile Distribution of Predicted Probability of Eventual Fetal Loss and Mean Values of Covariates for Women Vaccinated for Influenza and COVID-19 with Dose 1 in weeks 8-13 and Vaccination Before LMP in the <i>COVID-19</i> Period	S14
Table S8. Observed-to-Expected Eventual Fetal Losses among Women with SARS-CoV-2 Infections in Gestational Weeks 8-13 and 14-27 by Vaccination Status	S15
Table S9. Size of Week-level Cohorts Shown in Figures	S16
Section S4. Summary of Rates of Vaccination and SARS-CoV-2 Infections in <i>COVID</i> Period	S17
Figure S5. Month of LMP for Women Receiving Dose 1 of COVID-19 Vaccine in Gestational Weeks 8-13	S18

Table S1. Dependent and Independent Variable Definitions for Baseline Regression Model

VARIABLE	DEFINITION	ICD-9 AND CPT CODES (WHERE APPLICABLE)
Fetal Loss	All diagnoses and treatments indicating fetal loss.	ICD-9: 69, 69.09, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 639, 640, 641, 656.4, 656.41, 656.43, 761.4, 779.6 CPT: 410000, 410200, 414200, 598400001, and 598400005
Age at last menstruation	Calculated based on woman's birthdate and date of last menstruation (either recollected or estimated).	N/A
Socio-economic Status	Israel's Central Bureau of Statistics composite measure based on: household income, educational qualifications, household crowding and car ownership. It is measured on a scale from 1 to 10.	N/A
First pregnancy (primigravida)	Indicator variable if the woman had no prior pregnancies listed in the pregnancy registry.	N/A
Any influenza vaccination last 3 seasons	Based on medical records of influenza vaccination in the two influenza seasons prior to date of last menstruation.	CPT: 10200, 906560001, 9079200, 906600001, 9079100, 9065600004, 906600000, 9072900, 9077900, 906560002, 9072400, 9072500
High risk pregnancy	Indicates the week of pregnancy when a pregnancy was first categorized as a high risk pregnancy.	V23
Pre-existing comorbidities	The index of comorbidities is the total number of diagnoses women had received before date of last menstruation that were related to the following disorders and diseases: Antiphospholipid syndrome, arthritis, cardiac disorders, diabetes, hepato-biliary disorders, hypertension, infections, lupus erythematosus, malignant neoplasms, neurological disorders, renal/urinary disorders, and thyroid disorders.	<u>Antiphospholipid syndrome</u> : 286.9 <u>Arthritis</u> : 714, 715, 719 <u>Cardiac</u> : 414, 425, 427 <u>Diabetes</u> : 250, 648-648.03 <u>Hepato-biliary</u> : 51, 571, 574.2 <u>Hypertension</u> : 401, 642 <u>Infections</u> : 52, 54.1, 78.11, 79.4, 112, 127.4, 131 <u>Lupus Erythematosus</u> : 695.4, 710 <u>Malignant neoplasms</u> : 140, 165.99, 170-209 <u>Neurological</u> : 333, 345, 350, 353, 354, 356, 386, 649.4, 722, 729.2, 723.4, 780.4, 780.5, 780.9, 782 <u>Renal/Urinary</u> : 96.49, 590, 592, 595, 788.0, 788.3 <u>Thyroid</u> : 193, 226, 242-246, 376.2, 376.21, 376.22, 648.1, 794.5
Recurrent pregnancy loss	Indicator for any diagnosis indicative of recurrent pregnancy loss prior to date of last menstruation.	629.81, 629.89, 629.9, 646.3, 646.31, 646.33
Infertility/ menstrual/ reproductive organ disorders	Indicator for any diagnosis related to infertility, menstrual disorders or disorders of reproductive organs prior to date of last menstruation.	65, 67, 69, 70.22, 71, 218, 614, 616, 620, 621, 622, 623, 752, 626.1, 626.2, 626.4, 626.6, 628, 654.0-654.13, 654.4-654.94
Psychiatric/ behavioral disorders	Indicator for any diagnosis related to psychiatric or behavioral disorders prior to date of last menstruation.	293, 295, 296, 298, 300, 301, 302, 307.1-307.51, 308, 309, 311, 312, 313, 314, 315, V40, V61, V62
Obesity	Indicator for any diagnosis related to obesity prior to date of last menstruation.	43, 44, 278, 649.1-649.14
Smoking	Indicator for any diagnosis related to smoking prior to date of last menstruation.	305.1-305.13, 649.0-649.04, V15.82, V65.42
Notes. Columns list variable names, definitions and corresponding ICD-9 and CPT codes where applicable. When 3-digit ICD codes are listed, all subcodes are included. Maccabi has developed some specialized CPT codes to differentiate specific procedures; in those cases the first 5 digits correspond to standard CPT code.		

Section S1. Description of Baseline Reference Regression Model in the *Reference* period

The baseline reference model used to estimate the time-dependent conditional risk probability of eventual fetal loss is a pooled logistic regression that includes an observation for every woman and week of pregnancy (R. D'Agostino, et al. 1990). Since this study is concerned with an uncensored binary clinical outcome (fetal loss or live birth) and not with time-to-event, a logistic regression model is a natural modeling choice (Hu and Tong 2021). The model is trained on all pregnancies within the *Reference* period (March 1, 2016 – February 28, 2018) that survived to the start of gestational week 8, had a documented birth outcome and include complete information on the covariates. Pregnancies that ended prior to the start of week 8 were excluded, because a significant number of them end without appropriate and consistent documentation, which is a known source of bias in estimating miscarriage rates (Howards and Hertz-Picciotto 2007). For each pregnancy, there is an observation for each gestational week 8-27 (i.e., until end of the 2nd trimester), as long as the pregnancy was ongoing at the start of that week. The unit of analysis is pregnancy-week. The dependent (outcome) variable for each observation equals 1 if fetal loss eventually occurred at any point from the start of the respective gestational week, and 0 otherwise. The independent variables of the baseline reference model include the gestational week, calendar month of LMP, maternal age, socioeconomic status, primigravida status, an aggregated count (0, 1-3 and 4 or more) of medical comorbidities with potential impact on the study's outcome, social sector, district of residency, health-related behaviors (e.g., smoking and influenza vaccination in the two seasons prior to the index pregnancy), and an indicator for whether the pregnancy was considered high-risk that equals 1 starting from the week in which the pregnancy was considered high risk. The comorbidities included in the model were selected if they appeared in significantly higher frequency among women who experienced fetal loss compared to women who had a live birth. See Table S1 for covariate definitions. Confidence intervals were corrected to account for multiple observations from a single pregnancy across weeks using the Liang-Zeger adjustment (Liang and Zeger 1986, Abadie, Athey and Imbens 2023).

Table S2. Baseline Pooled Logistic Regression of Eventual Fetal Loss in the *Reference* Period (Mar. 1, 2016 – Feb. 28, 2018)

Coefficients	Odds Ratio	95% Confidence Interval
Age at last menstruation	1.084	1.079 - 1.090
Socio-economic status	0.951	0.938 - 0.964
First pregnancy (primigravida) indicator	2.088	1.969 - 2.214
Any influenza vaccination last 3 seasons	1.078	1.011 - 1.150
High risk pregnancy (first two trimesters)	2.212	1.784 - 2.743
Diagnoses prior to pregnancy		
0 pre-existing comorbidities (reference category)	1.000	1.000 - 1.000
1 - 3 pre-existing comorbidities	1.144	1.076 - 1.216
4+ pre-existing comorbidities	1.223	1.070 - 1.397
Recurrent pregnancy loss	1.718	1.442 - 2.046
Infertility/menstrual/reproductive organ disorders	1.207	1.137 - 1.281
Psychiatric/behavioral disorders	1.118	1.055 - 1.184
Obesity	1.056	0.987 - 1.129
Smoking	1.053	0.980 - 1.132
District of residency		
North	0.855	0.780 - 0.937
Sharon	1.017	0.938 - 1.102
South	1.087	0.997 - 1.185
Jerusalem	0.916	0.847 - 0.990
Center (reference category)	1.000	1.000 - 1.000
Ethno-religious sector		
Arab	0.866	0.757 - 0.991
Orthodox	0.854	0.753 - 0.969
Ultra Orthodox	0.778	0.699 - 0.866
Other (reference category)	1.000	1.000 - 1.000

Table S2 (cont'd). Baseline Pooled Logistic Regression of Eventual Fetal Loss in the *Reference* Period

Coefficients	Odds Ratio	95% Confidence Interval
Gestational week		
8 (reference category)	1.000	1.000 - 1.000
9	0.856	0.850 - 0.862
10	0.686	0.678 - 0.694
11	0.533	0.524 - 0.541
12	0.423	0.414 - 0.431
13	0.337	0.329 - 0.345
14	0.275	0.267 - 0.283
15	0.232	0.225 - 0.240
16	0.205	0.198 - 0.212
17	0.181	0.174 - 0.187
18	0.160	0.154 - 0.166
19	0.143	0.137 - 0.149
20	0.117	0.112 - 0.123
21	0.111	0.105 - 0.116
22	0.099	0.094 - 0.105
23	0.089	0.084 - 0.094
24	0.081	0.077 - 0.086
25	0.075	0.070 - 0.080
26	0.069	0.064 - 0.073
27	0.063	0.059 - 0.067
Calendar month		
January	1.014	0.896 - 1.149
February	0.981	0.864 - 1.115
March (reference category)	1.000	1.000 - 1.000
April	1.001	0.882 - 1.135
May	1.053	0.930 - 1.193
June	1.087	0.959 - 1.231
July	1.080	0.953 - 1.224
August	1.105	0.976 - 1.252
September	1.061	0.936 - 1.202
October	0.982	0.867 - 1.111
November	1.101	0.973 - 1.245
December	1.025	0.907 - 1.159
Constant	0.011	0.009 - 0.013

N =1,561,906

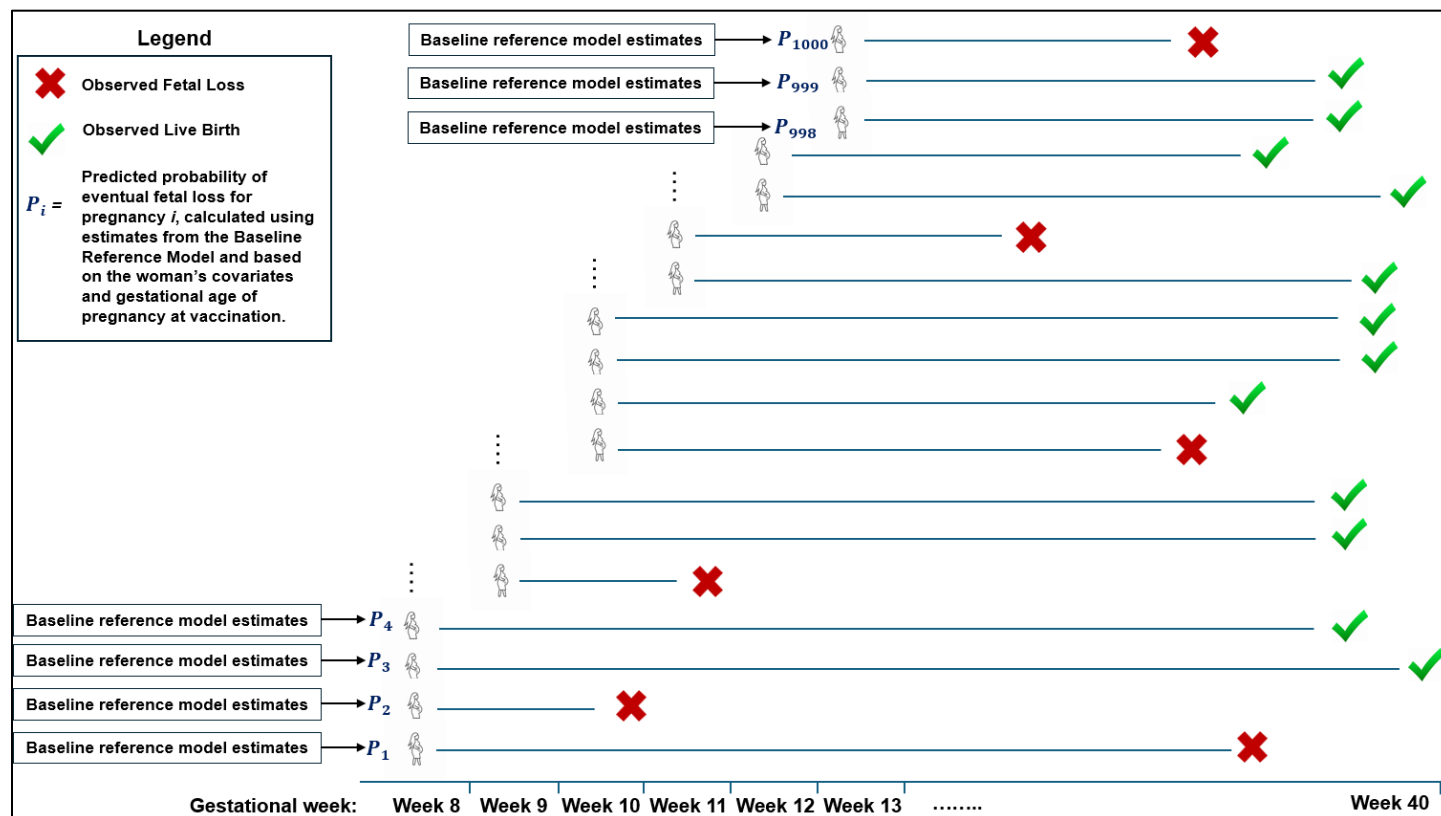
Section S2. Formula for Calculating Expected Values and Confidence Intervals for Eventual Fetal Loss Rate

The baseline reference regression model estimates are used to obtain the risk probability of eventual fetal loss for every gestational week for each pregnancy included in the cohort. The probability is estimated prospectively considering the gestational week of the pregnancy, which is typically the week of vaccination or a later week (assuming the pregnancy was ongoing at the start of that week), as well as the calendar month of the LMP and other covariates in the baseline model. To obtain a cohort-specific expected number of fetal losses, the individual risk probabilities are summed. That is, if there are N pregnancies in the cohort, the cohort-specific expected rate is $\sum_{i=1}^N P_i$, where P_i denotes the predicted risk probability of eventual fetal loss of pregnancy i . The expected number of fetal losses is normalized to number of fetal losses per 100 pregnancies, i.e., $\frac{100}{N} \sum_{i=1}^N P_i$.

To calculate the CIs, we assume that the cohort-specific number of fetal losses is the sum of independent Bernoulli variables, each corresponding to a specific pregnancy, with probability P_i of being equal to 1 (i.e., having a fetal loss). It is sufficient to calculate a CI for $\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N P_i$. From the assumption that the number of fetal losses is the sum of independent Bernoulli variables, it follows that the variance is equal to $\frac{1}{N^2} \sum_{i=1}^N P_i(1 - P_i)$, and using Lyapunov's Central Limit Theorem the CI is:

$$C.I. = \sum_{i=1}^N \frac{P_i}{N} + /- 1.96 * \sqrt{\sum_{i=1}^N \frac{P_i(1 - P_i)}{N}}$$

Figure S1. Diagram Illustrating Methodological Approach Applied to Cohort of Women Vaccinated in Gestational Weeks 8-13



Note: Figure S1 shows an illustrative example of a cohort of 1000 pregnancies with exposure to vaccination during weeks 8-13.

- The baseline reference model is used to estimate each pregnancy's probability of eventual fetal loss based on each pregnant woman's covariate values and gestational week of vaccination. (see Table S2 in Supplementary Appendix for full list of covariates and model results).
- The cohort-specific expected fetal loss rate is calculated by summing the predicted probabilities $P_1, \dots, P_{1000}$ which is then compared to the observed number of fetal losses among the women in the cohort.

Table S3. Characteristics of Pregnant Women in *Reference*, *Validation* and *COVID-19* Periods

Characteristics	Reference Period		Validation Period		COVID-19 Period	
	Mean	95% CI	Mean	95% CI	Mean	95% CI
Age at last menstruation	30.31	30.27 - 30.35	30.23	30.17 - 30.28	30.40	30.19 - 30.27
Socio-economic status	5.71	5.69 - 5.73	5.55	5.52 - 5.57	5.52	5.46 - 5.50
	%		%		%	
First pregnancy (primigravida) indicator	40.43	40.08 - 40.78	38.55	38.09 - 39.01	41.40	41.07 - 41.74
Any influenza vaccination last 3 seasons	21.67	21.38 - 21.96	23.85	23.45 - 24.26	27.55	27.25 - 27.85
High risk pregnancy (first two trimesters)	0.14	0.11 - 0.17	0.12	0.09 - 0.16	0.13	0.11 - 0.16
Diagnoses prior to pregnancy						
1 - 3 pre-existing comorbidities	55.98	55.63 - 56.33	57.33	56.86 - 57.79	59.15	58.81 - 59.48
4+ pre-existing comorbidities	3.46	3.33 - 3.59	3.44	3.26 - 3.61	3.41	3.28 - 3.53
Recurrent pregnancy loss	1.19	1.11 - 1.27	1.52	1.40 - 1.63	1.39	1.31 - 1.47
Infertility/menstrual/reproductive organ disorders	51.95	51.60 - 52.31	52.95	52.48 - 53.43	53.04	52.70 - 53.38
Psychiatric/behavioral disorders	30.22	29.90 - 30.55	31.94	31.49 - 32.38	34.46	34.14 - 34.78
Obesity	17.51	17.24 - 17.78	18.69	18.32 - 19.06	19.40	19.13 - 19.67
Smoking	14.06	13.81 - 14.30	13.51	13.19 - 13.84	12.68	12.45 - 12.90
District of residency						
North	15.18	14.93 - 15.44	14.87	14.53 - 15.20	14.51	14.28 - 14.75
Sharon	20.59	20.30 - 20.87	20.16	19.78 - 20.54	19.23	18.96 - 19.49
South	16.88	16.61 - 17.14	16.43	16.08 - 16.78	16.16	15.91 - 16.41
Jerusalem	24.66	24.35 - 24.96	24.77	24.36 - 25.18	25.70	25.40 - 26.00
Center	22.70	22.40 - 22.99	23.76	23.36 - 24.17	24.40	24.11 - 24.69
Ethno-religious sector						
Arab	6.06	5.89 - 6.23	6.40	6.17 - 6.63	6.74	6.57 - 6.91
Orthodox	5.16	5.00 - 5.31	5.29	5.08 - 5.50	5.46	5.31 - 5.61
Ultra Orthodox	16.99	16.72 - 17.25	19.19	18.82 - 19.56	19.65	19.38 - 19.92
Other	71.80	71.48 - 72.12	69.12	68.68 - 69.56	68.15	67.84 - 68.47

Note: The *Reference* period includes women with LMP from Mar. 1, 2016 – Feb. 28, 2018; the *Validation* period includes women with LMP from Mar. 1, 2018 – Feb. 28, 2019; and the *COVID-19* period includes women with LMP from Mar. 1, 2020 – Feb. 28, 2022.

Table S4. Observed-to-Expected Eventual Fetal Losses among Women Vaccinated for COVID-19 with Dose 2 in Gestational Weeks 8-13 and 14-27

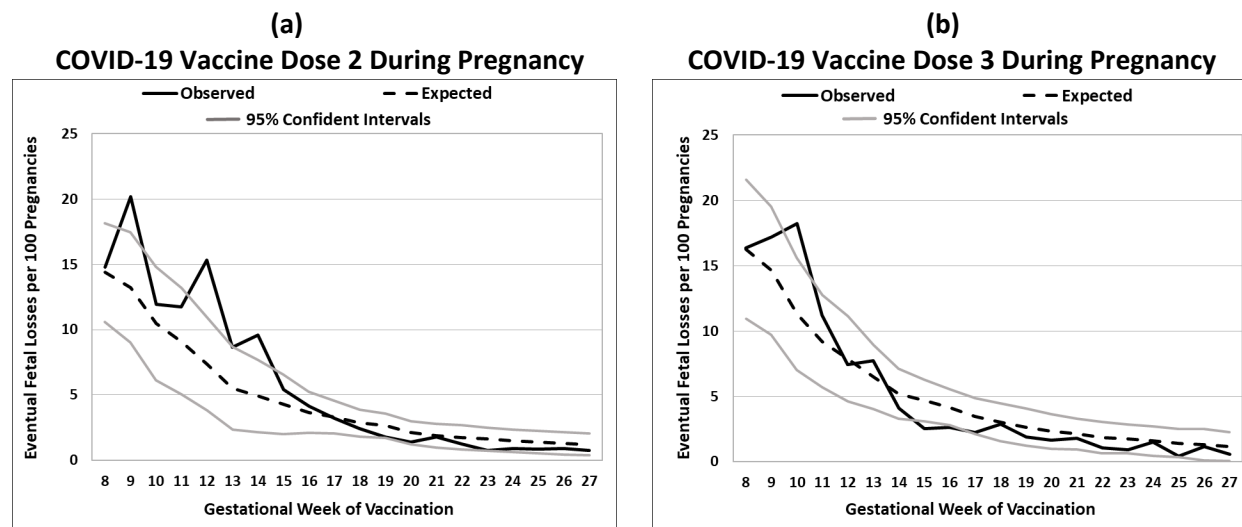
Cohort	Observed Fetal Losses per 100 Pregnancies (n)	Expected Fetal Losses per 100 Pregnancies ^a (n)	Observed-to- Expected Difference per 100 Pregnancies (n)	95% C.I. Observed-to- Expected Difference per 100 Pregnancies	Cohort Size N
<i>Dose 2</i>^b					
During weeks 8-13	14.11 (187)	10.51 (139)	3.61 (48)	[1.99 - 5.22]	1 325
During weeks 14-27	1.95 (200)	2.25 (231)	-0.30 (-31)	[-0.59 - -0.02]	10 266

Notes: Table S4 shows observed-to-expected fetal losses (per 100 pregnancies) among pregnant women with LMP from Mar. 1, 2020 – Feb. 28, 2022 vaccinated for COVID-19 with dose 2. Numbers (n) in parentheses report the corresponding total number of (observed/expected) fetal losses in the cohort.

a. The number of expected fetal losses was obtained by summing the predicted probabilities of eventual fetal loss of women vaccinated in each gestational week, which were estimated for each woman from the baseline reference model, based on her covariate values and gestational week of vaccination (see Table S2 in Supplementary Appendix for full list of covariates and model results).

b. Of women vaccinated with dose 2 during weeks 8-13 and weeks 14-27, 97% and 96% received BNT162b2.

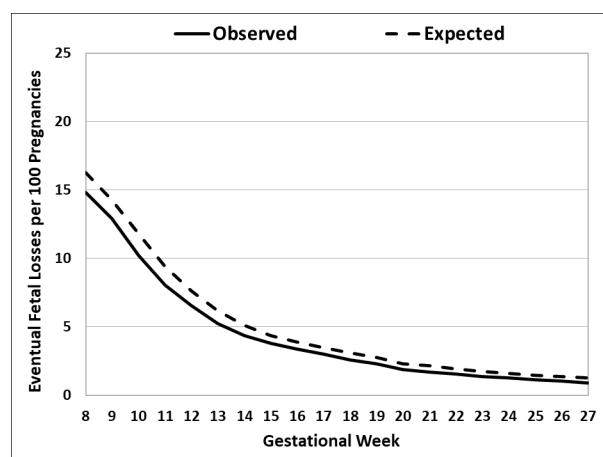
Figure S2. Observed-to-Expected Eventual Fetal Losses by Gestational Week of Vaccination among Women Vaccinated for COVID-19 with Dose 2 or Dose 3



Notes:

- Panel (a) shows results for women who received dose 2 of COVID-19 vaccination in pregnancy during the respective gestational week indicated on the X axis; panel (b) shows results for women who received dose 3 of COVID-19 vaccination during the respective gestational week. Cohort sizes for each gestational week are reported in Table S9 in the Supplementary Appendix.
- For each panel, the Y-axis indicates the observed (solid black) and expected (dashed black) number of eventual fetal losses (per 100 pregnancies) among women with LMP from Mar. 1, 2020 – Feb. 28, 2022 who were vaccinated on the gestational week indicated on the X-axis. The grey solid lines show the 95% confidence interval of the expected fetal losses per 100 pregnancies in each week. See section S2 in the supplementary Appendix for a description of how the CI's were calculated.
- The number of expected fetal losses was obtained by summing the predicted probabilities of eventual fetal loss of women vaccinated in each gestational week, which were estimated from the baseline reference model for each woman, based on her covariate values and gestational week of vaccination (see Table S2 in Supplementary Appendix for full list of covariates and model results).

Figure S3. Observed-to-Expected Eventual Fetal Losses by Gestational Week among Women Vaccinated for COVID-19 with Dose 3 Prior to Pregnancy



Notes:

- Figure S3 shows results for women who received 3 doses of COVID-19 vaccination prior to LMP and whose pregnancies were ongoing at the start of the respective gestational week indicated on the X axis. Cohort sizes for each week are reported in Table S9 in the Supplementary Appendix.
- The Y-axis indicates the observed (solid black) and expected (dashed black) eventual number of fetal losses per 100 pregnancies among women with LMP from Mar. 1, 2020 – Feb. 28, 2022 who were still pregnant at the beginning of each gestational week (8-27) indicated on the X-axis.
- The number of expected eventual fetal losses was obtained by summing the predicted probabilities of eventual fetal loss of women in each cohort, which were estimated from the reference baseline model for each woman, based on her covariate values and the respective gestational week of pregnancy indicated on the X axis (see Table S2 in Supplementary Appendix for full list of covariates and model results). Women experiencing fetal loss prior to the respective gestational week on the X-axis were not included in the calculation.

Table S5. Observed-to-Expected Eventual Fetal Losses among Women Vaccinated for Influenza in Gestational Weeks 8-13 and 14-27 in the *Validation* Period (LMP from Mar. 1, 2018 – Feb. 28, 2019)

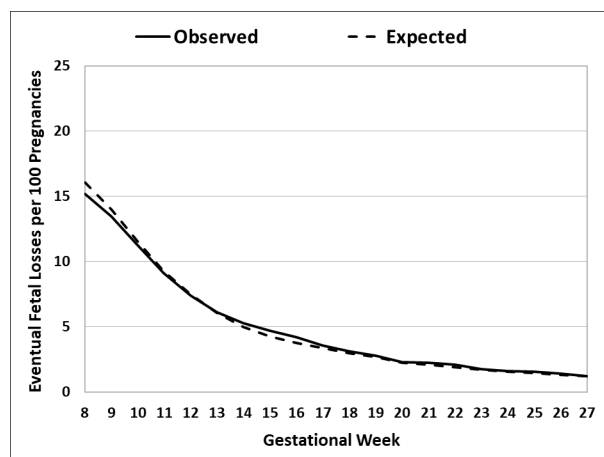
Cohort	Observed Fetal Losses per 100 Pregnancies (n)	Expected Fetal Losses per 100 Pregnancies ^a (n)	Observed-to-Expected Difference per 100 Pregnancies (n)	95% C.I. Observed-to-Expected Difference per 100 Pregnancies	Cohort Size N
<u>Influenza Vaccination</u>					
During weeks 8-13	6.55 (111)	10.98 (186)	-4.42 (-75)	[-5.88 - -2.97]	1 694
During weeks 14-27	1.09 (48)	2.53 (111)	-1.44 (-63)	[-1.90 - -0.98]	4 397

Notes: Table S5 shows observed-to-expected fetal losses (per 100 pregnancies) among women in the Validation Period (LMP from Mar. 1, 2018 – Feb. 28, 2019) vaccinated for influenza. Numbers (n) in parentheses report the corresponding total number of (observed/expected) fetal losses in the cohort.

a. The number of expected fetal losses was obtained by summing the predicted probabilities of eventual fetal loss of women in each cohort, which were estimated from the reference baseline model for each woman, based on her covariate values and gestational week of pregnancy in which she vaccinated (see Table S2 in Supplementary Appendix for full list of covariates and model results).

Figure S4. Observed-to-Expected Eventual Fetal Losses by Gestational Week among Women Vaccinated for Influenza Prior to Pregnancy with LMP in the *Validation* Period (LMP from Mar. 1, 2018 – Feb. 28, 2019)

In-season Influenza Vaccine before Pregnancy



Notes:

- Figure S4 shows results for women who vaccinated for influenza in the same influenza season prior to LMP and whose pregnancies were ongoing at the start of the respective week indicated on the X axis. Cohort sizes for each week are reported in Table S9 in the Supplementary Appendix.
- The Y-axis indicates the observed (solid black) and expected (dashed black) eventual number of fetal losses per 100 pregnancies among women in the *Validation* period (LMP from Mar. 1, 2018 – Feb. 28, 2019) who were still pregnant at the beginning of each gestational week (8-27) indicated on the X-axis.
- The number of expected eventual fetal losses was obtained by summing the predicted probabilities of eventual fetal loss of women in each cohort, which were estimated from the reference baseline model for each woman, based on her covariate values and the respective gestational week of pregnancy indicated on the X axis (see Table S2 in Supplementary Appendix for full list of covariates and model results). Women experiencing fetal loss prior to the respective gestational week on the X-axis were not included in the calculation.

Table S6. Observed-to-Expected Eventual Fetal Loss Ratios among All Cohorts of Women Vaccinated in Weeks 8-13 and 14-27

Cohort	Ratio of Observed-to-Expected per 100 Pregnancies ^a	95% C.I. of Ratio of Observed-to-Expected per 100 Pregnancies	Cohort Size N
<i>COVID-19 Dose 1^b</i>			
During weeks 8-13	1.42	[1.24 - 1.65]	1 837
During weeks 14-27	0.69	[0.62 - 0.77]	12 274
<i>COVID-19 Dose 2^c</i>			
During weeks 8-13	1.34	[1.16 - 1.59]	1 325
During weeks 14-27	0.87	[0.77 - 0.99]	10 266
<i>COVID-19 Dose 3^b</i>			
During weeks 8-13	1.19	[1.03 - 1.40]	1 454
During weeks 14-27	0.69	[0.61 - 0.80]	7 546
<i>Influenza Vaccine^b</i>			
During weeks 8-13	0.55	[0.50 - 0.60]	4 048
During weeks 14-27	0.50	[0.45 - 0.57]	9 586
<i>LATE FETAL LOSSES^d</i>			
<i>COVID-19 Dose 1</i>			
From week 14	1.64	[1.36 - 2.07]	1 733
From week 20	2.16	[1.63 - 3.19]	1 674
From week 25	2.22	[1.58 - 3.75]	1 646
<i>COVID-19 Dose 3</i>			
From week 14	1.53	[1.25 - 1.97]	1 389
From week 20	1.66	[1.23 - 2.54]	1 330
From week 25	1.64	[1.14 - 2.94]	1 311
<i>Influenza Vaccine</i>			
From week 14	0.57	[0.50 - 0.66]	3 918
From week 20	0.06	[0.51 - 0.77]	3 856
From week 25	0.05	[0.40 - 0.66]	3 828

Note: Table S6 shows the ratios of the number of observed-to-expected eventual fetal losses per 100 pregnancies that were included in this study.

a. The number of expected fetal losses was obtained by summing the predicted probabilities of eventual fetal loss of women in each cohort, which were estimated from the reference baseline model for each woman, based on her covariate values and gestational week of pregnancy in which she vaccinated (see Table S2 in Supplementary Appendix for full list of covariates and model results).

b. Based on results presented in Table 1.

c. Based on results presented in TableS4.

d. Based on results presented in Table 2.

Table S7. Percentile Distribution of Predicted Probability of Eventual Fetal Loss and Mean Values of Covariates for Women Vaccinated for Influenza and COVID-19 with Dose 1 in weeks 8-13 and Vaccination Before LMP in the COVID-19 Period

Predicted Probability Percentiles	Weeks 8-13 Vaccination Cohorts		Vaccination Before LMP Cohorts		
	Influenza	Dose 1	Influenza	Dose 2	Dose 3
5th percentile	7.31	6.12	7.04	6.57	6.93
25th percentile	11.43	9.95	11.04	10.30	10.84
50th percentile	15.02	13.85	14.89	14.17	14.70
75th percentile	19.82	18.75	20.09	19.32	19.94
95th percentile	30.21	28.32	31.51	30.17	31.09
N	4048	1837	12544	34452	11970
Covariates	Mean/Percent	Mean/Percent	Mean/Percent	Mean/Percent	Mean/Percent
	95% CI	95% CI	95% CI	95% CI	95% CI
Age at last menstruation	30.94 30.78 - 31.10	30.82 30.78 - 31.10	32.01 31.92 - 32.10	30.92 30.86 - 30.98	31.43 31.33 - 31.53
Socio-economic status	6.68 6.60 - 6.754	5.84 6.60 - 6.75	6.56 6.51 - 6.601	5.97 5.94 - 5.99	5.84 6.25 - 6.35
First pregnancy (primigravida) indicator	43.65 42.12 - 45.18	34.35 32.18 - 36.52	25.23 24.47 - 25.99	39.02 38.51 - 39.54	41.65 41.13 - 42.17
Any influenza vaccination last 3 seasons	49.68 48.14 - 51.22	39.52 37.29 - 41.76	100 100 - 100	32.32 31.82 - 32.81	30.18 29.35 - 31.00
High risk pregnancy (first two trimesters)	0.35	0.22	0.22	0.14	0.13
<u>Diagnoses prior to pregnancy</u>	0.17 - 0.53	0.00 - 0.43	0.13 - 0.30	0.10 - 0.18	0.10 - 0.17
1 - 3 pre-existing comorbidities	63.51 62.03 - 65.00	60.10 57.86 - 62.34	65.43 64.60 - 66.27	61.84 61.33 - 62.35	62.79 62.28 - 63.30
4+ pre-existing comorbidities	4.27 3.65 - 4.90	3.43 2.60 - 4.26	5.65 5.25 - 6.06	3.89 3.68 - 4.09	4.16 3.95 - 4.37
Recurrent pregnancy loss	1.78 1.37 - 2.19	1.80 1.19 - 2.40	2.22 1.97 - 2.48	1.83 1.69 - 1.98	1.84 1.70 - 1.98
Infertility/menstrual/reproductive organ disorders	59.19 57.68 - 60.70	56.23 53.96 - 58.50	63.59 62.75 - 64.43	56.75 56.22 - 57.27	57.42 56.90 - 57.94
Psychiatric/behavioral disorders	40.22 38.71 - 41.73	34.13 31.96 - 36.30	42.20 41.34 - 43.07	37.24 36.73 - 37.75	38.73 38.22 - 39.24
Obesity	20.65 19.41 - 21.90	20.36 18.52 - 22.20	23.46 22.72 - 24.20	20.56 20.13 - 20.98	21.65 21.21 - 22.08
Smoking	12.87	13.01	13.66	13.45	13.66
<u>District of residency</u>	11.84 - 13.90	11.47 - 14.55	13.06 - 14.26	13.09 - 13.81	13.30 - 14.02
North	13.34 12.29 - 14.39	12.85 11.32 - 14.38	13.82 13.22 - 14.42	14.35 13.98 - 14.72	13.74 13.38 - 14.10
Sharon	22.55 21.26 - 23.84	18.62 16.84 - 20.40	23.98 23.23 - 24.73	20.86 20.43 - 21.29	21.72 21.28 - 22.16
South	15.14 14.04 - 16.24	15.73 14.07 - 17.39	15.55 14.92 - 16.18	15.64 15.26 - 16.02	15.05 14.67 - 15.43
Jerusalem	23.34 22.04 - 24.64	26.29 24.28 - 28.30	23.27 22.53 - 24.01	24.74 24.28 - 25.20	24.32 23.87 - 24.77
Center	25.62	26.51	23.38	24.41	25.16
<u>Ethno-religious sector</u>	24.28 - 26.96	24.49 - 28.53	22.64 - 24.12	23.96 - 24.86	24.70 - 25.62
Arab	3.26 2.71 - 3.81	4.25 3.33 - 5.17	3.43 3.11 - 3.75	5.78 5.53 - 6.03	4.29 4.08 - 4.50
Orthodox	5.24 4.55 - 5.93	6.10 5.01 - 7.19	5.68 5.27 - 6.09	5.80 5.55 - 6.05	6.24 5.98 - 6.50
Ultra Orthodox	9.29 8.40 - 10.18	18.18 16.42 - 19.94	10.04 9.51 - 10.57	13.94 13.57 - 14.31	10.96 10.63 - 11.29
Other/Unknown	82.21 81.03 - 83.39	71.48 69.42 - 73.54	80.85 80.16 - 81.54	74.48 74.02 - 74.94	78.51 78.08 - 78.94

Notes: Top panel compares percentiles of the predicted probability of eventual fetal loss in cohorts of women receiving Influenza or dose 1 of COVID-19 vaccine in gestational weeks 8-13 or women vaccinated prior to pregnancy with 2 or 3 doses of COVID-19 vaccine, or with influenza vaccine in same season as LMP. All calculations are from gestational week 8. Bottom panel compares values of covariates used in the baseline reference model between cohorts. All results are for women with LMP from Mar. 1, 2020 – Feb. 28, 2022.

Table S8. Observed-to-Expected Eventual Fetal Losses among Women with SARS-CoV-2 Infections in Gestational Weeks 8-13 and 14-27 by Vaccination Status

Cohort	Observed Fetal Losses per 100 Pregnancies (n)	Expected Fetal Losses per 100 Pregnancies ^a (n)	Observed-to- Expected Difference per 100 Pregnancies (n)	95% C.I. Observed-to- Expected Difference per 100 Pregnancies	Cohort Size N
<i>Infection among Unvaccinated^b</i>					
During weeks 8-13	8.36 (68)	9.07 (74)	-0.70 (-6)	[-2.65 - 1.22]	813
During weeks 14-27	1.66 (29)	2.17 (38)	-0.51 (-9)	[-1.19 - 0.16]	1 743
<i>Infection among Vaccinated^b</i>					
During weeks 8-13	11.57 (223)	10.93 (211)	0.64 (12)	[-0.72 - 2.00]	1 928
During weeks 14-27	2.09 (96)	2.52 (116)	-0.43 (-20)	[-0.88 - 0.02]	4 589

Notes: Table S8 shows observed-to-expected fetal losses (per 100 pregnancies) for women with a documented SARS-CoV-2 infection with LMP from Mar. 1, 2020 – Feb. 28, 2022. Numbers (n) in parentheses report the corresponding total number of (observed/expected) fetal losses in the cohort.

a. The number of expected fetal losses was obtained by summing the predicted probabilities of eventual fetal loss of women in each cohort, which were estimated from the reference baseline model for each woman, based on her covariate values and gestational week of pregnancy in which she was infected (see Table S2 in Supplementary Appendix for full list of covariates and model results).

b. The top panel shows results for women infected in the respective trimester who had received no doses of COVID-19 vaccine prior to infection, and the bottom panel shows results for women who had received at least one dose of COVID-19 vaccine prior to infection. Infections were documented with PCR or (from early 2022) lateral flow tests.

Table S9. Size of Week-level Cohorts Shown in Figures

	COVID-19 Dose 1 During Pregnancy (Fig. 2a)	COVID-19 Dose 2 During Pregnancy (Fig. S2a)	COVID-19 Dose 3 During Pregnancy (Fig. S2b)	COVID-19 Doses 1 & 2 Before Pregnancy (Fig. 3a)	COVID-19 Doses 1-3 Before Pregnancy (Fig. S3)	Influenza During Pregnancy (Fig. 2b)	Influenza Before Pregnancy (Fig. 3b)	Validation Period - Influenza Before Pregnancy (Fig. S4)
Week								
8	211	318	177	31686	11970	621	12544	4127
9	239	238	192	30844	11359	736	12282	4047
10	227	184	203	29768	11093	706	11950	3945
11	240	187	250	28843	10915	700	11653	3851
12	315	202	256	28119	10765	621	11471	3780
13	605	196	376	27379	10664	664	11327	3729
14	845	230	510	26623	10601	681	11224	3697
15	1135	296	668	25787	10553	668	11161	3673
16	1229	557	800	24867	10512	644	11106	3655
17	1160	777	666	24089	10471	721	11061	3631
18	949	997	526	23477	10440	633	11016	3614
19	814	1128	474	22939	10396	631	10978	3602
20	860	1059	492	22356	10375	667	10935	3584
21	848	893	559	21761	10358	709	10925	3581
22	808	733	479	21244	10339	733	10888	3576
23	755	781	550	20654	10328	673	10862	3564
24	730	779	467	20160	10311	670	10846	3559
25	745	699	454	19668	10300	711	10832	3557
26	704	676	342	19301	10282	716	10812	3551
27	692	661	344	18926	18926	729	10793	3544

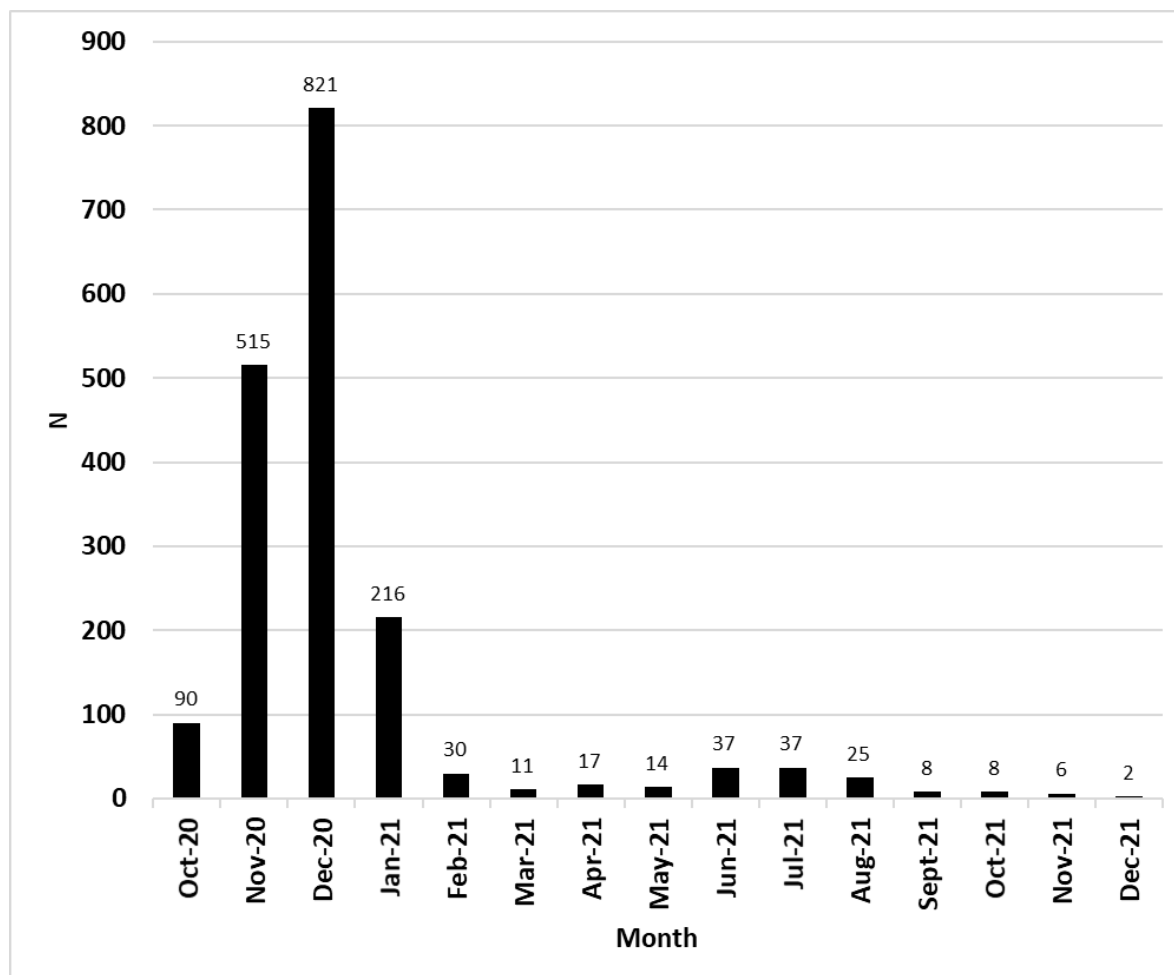
Notes: The size (N) of weekly vaccination cohorts displayed in Figures 2, 3, S2, S3 and S4 are shown. Each column displays the N from week 8-27 for the cohort listed at the top of the column.

Section S4. Rates of Vaccination and SARS-CoV-2 Infections in the COVID-19 Period

Among the pregnancies in the *COVID-19* period included in the analysis, there are 14,111, 11,591 and 9,000 pregnancies where doses 1, 2 and 3, respectively, of the COVID-19 vaccine were received from weeks 8 to 27 (18.6%, 16.4% and 12.3%, respectively, of all pregnancies included in the *COVID-19* period). There were 39,028, 34,452 and 11,970 pregnancies where doses 1, 2 and 3, respectively, were received prior to LMP (41.4%, 36.5% and 12.7% of all pregnancies in the *COVID-19* period). Over 95% of the women vaccinated received Pfizer-BioNTech BNT162b2. Of women exposed during pregnancy, 95.6% of the first doses, 98.7% of the second doses, and 99.9% of the third doses were BNT162b2. Virtually all of the remaining women received Moderna mRNA-1273. There are 13,634 pregnancies in the *COVID-19* period where influenza vaccination was received during weeks 8-27 and 12,544 where it was administered before pregnancy but within the same influenza season (16.8% and 13.3% of all pregnancies analyzed in the *COVID-19* period, respectively).

SARS-CoV-2 Infections. There were 9,776 pregnancies where women had a SARS-CoV-2 infection before pregnancy and 9,073 pregnancies with an infection in weeks 8-27 (9.6% and 14.5% of pregnancies included in the *COVID-19* period, respectively), out of which 6,517 (71.8%) were infected post-vaccination. Infections were documented with PCR or (from early 2022) lateral flow tests.

Figure S5. Month of LMP for Women Receiving Dose 1 of COVID-19 Vaccine in Gestational Weeks 8-13



Notes: Monthly distribution of LMP for women who received dose 1 of COVID-19 vaccine in gestational weeks 8-13 in the *COVID-19* period (LMP from Mar. 1, 2020 – Feb. 28, 2022) is shown. N of women with LMP in each month is displayed above the bars.

Perdite fetali osservate rispetto a quelle previste dopo la vaccinazione con mRNA COVID-19 in gravidanza precoce

Josh Guetzkow, PhD* Dipartimento di
Sociologia e Antropologia
Istituto di Criminologia Università
Ebraica di Gerusalemme
Gerusalemme, Israele 91905
joshua.guetzkow@mail.huji.ac.il

Tal Patalon, MD, MBA
Centro di ricerca e innovazione Maccabi, Servizi sanitari Maccabi Tel Aviv-Yafo, Israele
68012
Arison School of Business, Reichman University Herzliya, Israele
46101

Sivan Gazit, MD, MA
Centro di ricerca e innovazione Maccabi, Servizi sanitari Maccabi Tel Aviv, Israele 68012

Tracy Beth Høeg, MD, PhD
Scuola di gestione Sloan, Massachusetts Institute of Technology Dipartimento di medicina
d'urgenza, Università della California - San Francisco Dipartimento di ricerca clinica,
Università della Danimarca meridionale Cambridge, MA USA 02142

Joseph Fraiman, MD Istituto di
ricerca baromedica Harvey, LA USA
70058

Yaakov Segal, MD
Divisione Sanitaria, Maccabi Healthcare Services Tel
Aviv, Israele 68012

Retsef Levi, PhD
Sloan School of Management, Massachusetts Institute of Technology Cambridge, MA
USA 02142

* Autore corrispondente

Perdite fetali osservate rispetto a quelle attese dopo la vaccinazione con mRNA COVID-19 in gravidanza precoce

SINTESI

Contesto

Gli studi clinici utilizzati per approvare i vaccini contro il COVID-19 hanno escluso le donne in gravidanza e le valutazioni di sicurezza esistenti sulla vaccinazione contro il COVID-19, in particolare durante le prime fasi della gravidanza, sono limitate a studi osservazionali soggetti a vari tipi di potenziali distorsioni, tra cui la distorsione dovuta alla buona salute delle vaccinate.

Metodi

Lo studio include gravidanze in Israele con ultimo ciclo mestruale (LMP) compreso tra il 1° marzo 2016 e il 28 febbraio 2022. L'analisi principale presenta un confronto tra il numero di perdite fetali effettive e quello atteso tra le donne in gravidanza esposte alla vaccinazione con mRNA contro il COVID-19 (quasi tutte Pfizer) durante le settimane gestazionali 8-13 e 14-27, rispettivamente. Come controlli comparativi sono state utilizzate donne vaccinate contro l'influenza durante le settimane gestazionali 8-27, nonché donne vaccinate prima della gravidanza contro il COVID-19 o l'influenza. Il numero atteso di perdite fetali specifico per la coorte è stato stabilito sulla base di stime ricavate da un modello di regressione addestrato su dati storici dal 2016 al 2018 che incorpora fattori di rischio a livello individuale e la settimana gestazionale di ciascuna donna incinta inclusa nella coorte.

Risultati

L'analisi di 226.395 gravidanze singole in Israele dal 2016 al 2022 indica che la vaccinazione contro il COVID-19 con la prima dose durante le settimane 8-13 è stata associata a un numero di perdite fetali osservato *superiore al previsto*, pari a circa 13 contro i 9 previsti per ogni 100 gravidanze esposte, ovvero quasi 3,9 (95% CI: [2,55-5,14]) perdite fetali aggiuntive rispetto al numero previsto ogni 100 gravidanze. La maggior parte delle perdite fetali in eccesso si è verificata dopo la ventesima settimana di gestazione e quasi la metà dopo la venticinquesima settimana. Analogamente, le donne vaccinate con la terza dose durante le settimane 8-13 hanno mostrato un numero di perdite fetali *superiore al previsto*, con quasi 1,9 (95% CI: 0,39-3,42) perdite fetali in più rispetto al previsto ogni 100 gravidanze. Al contrario, le donne in gravidanza vaccinate contro l'influenza durante le settimane 8-27 hanno mostrato un numero di perdite fetali osservato costantemente *inferiore al previsto*, probabilmente a causa di un bias verso le donne vaccinate in buona salute. Le donne vaccinate contro il COVID-19 o l'influenza prima della gravidanza hanno mostrato un numero di perdite fetali *in linea con le aspettative o inferiore al previsto*.

Conclusione

I risultati forniscono prove di un numero di perdite fetali finali notevolmente *superiore al previsto* associato alla vaccinazione contro il COVID-19 durante le settimane gestazionali 8-13.

INTRODUZIONE

Le donne in gravidanza sono state escluse dagli studi clinici randomizzati fondamentali utilizzati per le approvazioni regolatorie iniziali dei vaccini contro il COVID-19. L'unico studio clinico randomizzato successivo condotto su donne in gravidanza è stato condotto da Pfizer e ha incluso solo 173 donne vaccinate in fasi relativamente avanzate della gravidanza (settimane gestazionali 24-34) (Pfizer 2023).

Gli studi osservazionali sulla vaccinazione contro il COVID-19 durante la gravidanza confrontano prevalentemente i risultati tra donne in gravidanza vaccinate e non vaccinate durante campagne di vaccinazione attive utilizzando vari modelli di regressione (Fell, Dhinsa, et al. 2022, Magnus, et al. 2022, Calvert, Carruthers, et al.

2022, Velez, et al. 2023, Calvert, Carruthers, et al. 2023, Goldshtein, Steinberg, et al. 2022, Hui, et al. 2023, Rimmer, et al. 2023). Tra questi studi, solo pochi hanno considerato l'impatto della vaccinazione contro il COVID-19 nelle prime fasi della gravidanza, quando il rischio di teratogenicità è probabilmente più elevato (Calvert, Carruthers, et al. 2022, Velez, et al. 2023, Shimabukuro, et al. 2021). Ulteriori studi sull'associazione tra la vaccinazione contro il COVID-19 all'inizio della gravidanza e gli aborti spontanei (prima della 20ª settimana) hanno utilizzato un metodo caso-controllo. (Kharbanda, Haapala e DeSilva, et al. 2021, Kharbanda, Haapala e Lipkind, et al. 2023)

Con poche eccezioni (Aharon, et al. 2022, Kuhbandner e Reitzner 2023, Velez, et al. 2023), gli studi sulla vaccinazione contro il COVID-19 durante la gravidanza non hanno riportato alcuna associazione statisticamente significativa tra esiti avversi della gravidanza e vaccinazione contro il COVID-19 durante la gravidanza. (Rimmer, et al. 2023, Prasad, et al. 2022)

Tuttavia, questi studi osservazionali presentano noti limiti metodologici relativi al controllo della tempistica gestazionale della vaccinazione, ai criteri di inclusione ed esclusione applicati e ai potenziali fattori di confondimento non controllati. (Fell, Dimitris, et al. 2021) In particolare, le differenze osservate e non osservate nello stato di salute tra le donne vaccinate e non vaccinate potrebbero influenzare i risultati studiati ed essere fonte di bias metodologici, denominati *bias dei vaccinati sani (o non sani)*. (Høeg, Duriseti e Prasad 2023, Remschmidt, Wichmann e Harder 2015)

Il presente studio mirava a valutare l'impatto della vaccinazione contro il COVID-19 durante le settimane gestazionali 8-27 sfruttando i dati anonimizzati forniti da Maccabi Healthcare Services (MHS), il secondo fondo sanitario più grande di Israele. L'analisi principale ha preso in considerazione diverse coorti esposte di donne in gravidanza, definite

in base al momento e alla dose di vaccinazione, e utilizzando dati storici, ha analizzato la differenza osservata rispetto a quella prevista nel numero di perdite fetali all'interno di ciascuna coorte.

Israele è stato il primo paese al mondo a lanciare una campagna nazionale di vaccinazione contro il COVID-19, a partire dal dicembre 2020, utilizzando quasi esclusivamente il vaccino a mRNA Pfizer BNT162b2. Nell'agosto 2021, Israele è stato nuovamente il primo paese a vaccinare la popolazione con una dose di richiamo. Il 19 gennaio 2021 il Ministero della Salute israeliano ha pubblicato una raccomandazione per la vaccinazione delle donne in gravidanza, inizialmente limitata al 2° e 3° trimestre, poi estesa a tutte le fasi della gravidanza il 1° febbraio 2021. Esistono diversi studi sull'associazione tra la vaccinazione contro il COVID-19 e vari esiti della gravidanza basati su dati provenienti da Israele, ma presentano limitazioni metodologiche simili a quelle sopra menzionate. (Wainstock, Yoles e Sergienko 2021, Lipschuetz, et al. 2023, Dick, et al. 2022, Rottenstreich, et al. 2022, Goldshtein, Steinberg, et al. 2022)

MATERIALI E METODI

Fonti dei dati

Questo studio si basa sul database centralizzato delle cartelle cliniche elettroniche (EHR) gestito dal MHS sin dagli anni '90, composto da un database longitudinale su 2,7 milioni di pazienti (il 26% della popolazione israeliana) con un turnover minimo (~1% all'anno). I dati anonimizzati del registro delle gravidanze MHS sono stati estratti il 6 maggio 2023, data in cui il registro conteneva informazioni su 1.330.845 gravidanze dal 1990. Questo studio ha utilizzato 226.395 gravidanze con dati completi e affidabili e LMP tra il 1° marzo 2016 e il 28 febbraio 2022. Il registro include informazioni registrate regolarmente dagli ostetrici, tra cui l'esito della gravidanza e la data in cui si è verificato, la data dell'ultimo ciclo mestruale (LMP), il numero di embrioni e se la gravidanza è stata considerata ad alto rischio, insieme alla data in cui la gravidanza è entrata nella categoria ad alto rischio. I dati del registro delle gravidanze sono stati incrociati con altri dati EHR relativi a condizioni cliniche diagnosticate, richieste di prestazioni e procedure mediche e un registro specializzato COVID-19 che includeva informazioni sui registri delle vaccinazioni COVID-19 e sui risultati di laboratorio provenienti da un laboratorio centrale. Il comitato di revisione istituzionale dell'MHS ha approvato lo studio, che è stato esentato dal consenso informato data la sua natura retrospettiva e l'uso di informazioni anonime raccolte regolarmente.

Esposizioni

L'analisi primaria ha incluso coorti di donne in gravidanza esposte alla dose 1 o 3 di qualsiasi vaccino COVID-19 durante la gravidanza, con coorti separate per l'esposizione durante le settimane gestazionali 8-13 e 14-27, rispettivamente. La dose 2 è stata inclusa solo come analisi supplementare, poiché la stragrande maggioranza delle donne che hanno ricevuto la dose 1 ha continuato a ricevere la dose 2. Le coorti della dose 3 includono solo le donne che hanno ricevuto due dosi prima della gravidanza. Lo studio ha incluso anche coorti di una sola settimana per le settimane gestazionali $W=8, \dots, 27$, ciascuna composta da donne che hanno ricevuto la vaccinazione contro il COVID-19 (dose 1 o 3) nella specifica settimana gestazionale W . Il rischio prospettico di ciascuna donna inclusa in queste coorti di vaccinazione contro il COVID-19 è valutato in modo prospettico a partire da una *settimana di rischio* definita come la settimana gestazionale della vaccinazione. (Si veda la discussione relativa agli esiti riportata di seguito).

Sono state escluse le donne vaccinate durante le settimane gestazionali 1-7, poiché l'identificazione e il follow-up delle gravidanze durante queste settimane sono parziali e incoerenti, sollevando preoccupazioni circa la presenza di distorsioni nella segnalazione; ad esempio, le donne vaccinate potrebbero essere più inclini a segnalare una perdita fetale precoce. Entro la settimana 8 o 9, quasi tutte le gravidanze sono già sotto follow-up e la documentazione è sostanzialmente più coerente.

Per ovviare, almeno in parte, alle distorsioni derivanti da covariate confondenti potenzialmente non osservate, l'analisi ha preso in considerazione due tipi di coorti di controllo comparative. In primo luogo, sono state definite coorti di controllo simili per l'esposizione alla vaccinazione antinfluenzale durante le settimane gestazionali 8-13 e 14-27, nonché per singole settimane $W=8, \dots, 27$. In secondo luogo, l'esposizione alla vaccinazione prima della gravidanza è stata considerata come un altro controllo con coorti di singole settimane per le settimane gestazionali $W=8, \dots, 27$, ciascuna comprendente donne ancora in gravidanza all'inizio della settimana W , che hanno ricevuto le dosi 1 e 2, la dose 3 o la vaccinazione antinfluenzale prima della gravidanza. In queste ultime coorti, la settimana di rischio è definita come la rispettiva settimana gestazionale W .

L'analisi esplorativa ha incluso l'esposizione all'infezione da SARS-CoV-2 durante la gravidanza (confermata da test PCR positivo), con coorti corrispondenti all'infezione verificatasi durante le settimane gestazionali 8-13 e 17-24 con e senza precedente vaccinazione contro il COVID-19, rispettivamente.

Risultati

Il risultato principale dello studio è stata la perdita fetale durante la gravidanza, che è una misura composita che include aborti spontanei e indotti e natimortalità. Il risultato composito è stato determinato sulla base del registro delle gravidanze, della diagnosi e dei codici procedurali. (Vedi Tabella S1 nell')

Appendice supplementare per una descrizione dettagliata). Mentre gli aborti spontanei e i nati morti si verificano involontariamente e sono determinati da meccanismi biologici, gli aborti indotti possono essere elettivi o terapeutici (cioè determinati da ragioni mediche). Gli aborti elettivi sono tipicamente determinati da considerazioni personali o ragioni quali l'età della madre e le circostanze della gravidanza (ad esempio, fuori dal matrimonio o risultato di relazioni proibite dal diritto penale). Le ragioni mediche degli aborti indotti (ad esempio, difetti e malformazioni fetali) coinvolgono meccanismi biologici che si sovrappongono a quelli degli aborti spontanei e dei nati morti. I dati relativi alla diagnosi e alle richieste di rimborso relativi agli aborti indotti spesso non includono una documentazione chiara delle motivazioni sottostanti e molti sono determinati da preoccupazioni per la salute del feto.

Per valutare la plausibilità che i risultati relativi ai tassi di perdita fetale finale non fossero interamente determinati da decisioni elettive delle donne, sono stati considerati come risultati aggiuntivi i casi di perdita fetale tardiva a partire dalla 14^a, 20^a e 25^a settimana di gestazione. In Israele, tutti gli aborti indotti devono essere preventivamente approvati da comitati speciali nominati all'interno delle istituzioni sanitarie. Un recente rapporto del Ministero della Salute israeliano sulle tendenze temporali degli aborti indotti nel periodo 1990-2022 indica che gli aborti elettivi dopo la 14^a settimana di gestazione sono diventati sempre più rari, mentre quelli dopo la 24^a settimana sono rari e concessi solo per motivi medici. (Ministero della Salute israeliano 2023)

Numero osservato/previsto di casi di perdita fetale definitiva

Le analisi primarie di questo studio hanno seguito un approccio comunemente utilizzato negli studi sulla sicurezza dei vaccini, in cui l'incidenza osservata di eventi avversi tra gli individui vaccinati viene confrontata con l'incidenza prevista sulla base dei tassi di base nella popolazione generale. (Gordillo-Marañón, et al. 2024, Mahaux, Bauchau e Holle 2015) A differenza degli studi esistenti sulla sicurezza della vaccinazione durante la gravidanza che hanno utilizzato tassi di incidenza di fondo attesi non specifici per la popolazione dello studio (Shimabukuro, et al. 2021), il presente studio ha stimato il numero atteso di perdite fetali specifico per la coorte, aggiustato per le caratteristiche individuali delle donne vaccinate.

Le stime corrette del numero previsto di perdite fetali sono state calcolate sulla base di un *modello di riferimento di base* a livello individuale ottenuto addestrando un modello di regressione logistica aggregato sulle gravidanze con LMP tra il 1° marzo 2016 e il 28 febbraio 2018. Questo modello ha preso come input una gravidanza in una determinata settimana di rischio gestazionale. Ha quindi stimato il rischio prospettico di perdita fetale finale da quella

settimana per tutta la gravidanza, correggendo per l'età gestazionale e il mese di calendario della gravidanza, l'età della donna, nonché per molteplici covariate che catturano lo stato di salute della donna, il suo comportamento in materia di salute e altri fattori socioeconomici. Per una descrizione dettagliata del modello di riferimento di base, delle covariate e dei risultati del modello, si veda l'appendice supplementare, sezione S1 e tabelle S1 e S2.

Il numero previsto di perdite fetali finali specifico per coorte è stato calcolato sommando le probabilità di rischio individuali previste per tutte le donne della coorte, calcolate in base alla settimana in cui ciascuna di esse è stata esposta (cioè la settimana di rischio). Il numero previsto è stato quindi confrontato con il numero osservato di perdite fetali nella coorte. La figura S1 nell'appendice supplementare illustra come è stata condotta l'analisi sulle coorti vaccinate per le settimane gestazionali 8-13. Sono riportati i numeri attesi e osservati di perdite fetali specifici per coorte (come numero di perdite fetali per 100 gravidanze), insieme alla differenza tra il numero osservato e quello atteso, l'intervallo di confidenza (IC) al 95% e il numero di gravidanze incluse in ciascuna coorte. I rapporti tra le perdite fetali osservate e quelle attese con i corrispondenti IC al 95% sono riportati separatamente nell'appendice supplementare. Per una descrizione di come sono stati calcolati i valori attesi e gli IC, si veda la sezione S2 nell'appendice supplementare.

L'analisi può essere interpretata come una sperimentazione simulata, in cui ogni donna incinta vaccinata inclusa nella coorte è stata "abbinata" a un "controllo *sintetico* non vaccinato" con caratteristiche individuali e di gravidanza simili. I risultati dei controlli sintetici sono stati "simulati" sulla base del modello di riferimento di base e confrontati con i risultati osservati. Confrontando le donne vaccinate con controlli storici (sintetici) piuttosto che con controlli all'interno del periodo di vaccinazione, l'analisi osservata/attesa ha consentito la massima "corrispondenza" sulle covariate osservate e sul tempo di follow-up non censurato.

Perdite fetali tardive. Per rispondere alla potenziale preoccupazione che le donne vaccinate contro il COVID-19 (dose 1 o 3) o contro l'influenza nelle prime settimane di gestazione (8-13) potessero essere più (o meno) inclini ad aborti indotti puramente elettivi, è stata calcolata la differenza tra il numero osservato e quello atteso di perdite fetali finali a partire dalla 14^a, 20^a e 25^a settimana per le donne vaccinate nella 8^a-13^a settimana. In particolare, il rischio individuale di perdita fetale finale, per ciascuna donna di queste coorti, è stato stimato in modo prospettico alle settimane di gestazione 14, 20 e 25, separatamente, per tutte le donne che erano ancora incinte all'inizio della rispettiva settimana. Inoltre, è stata calcolata la percentuale di donne che hanno subito una perdita fetale dalla settimana di gestazione

25 in poi è stata calcolata per le donne che hanno ricevuto la vaccinazione contro il COVID-19 (dose 1 o 3) o la vaccinazione antinfluenzale, in ciascuna delle settimane $W=8, \dots, 13$. Queste sono state poi confrontate con la stessa percentuale tra tutte le donne ancora in gravidanza all'inizio di ciascuna settimana W .

Analisi di validazione e robustezza

Per ottenere una convalida fuori campione delle stime di riferimento di base e valutare la loro coerenza tra i diversi periodi di analisi, è stata condotta un'analisi osservata/attesa per le coorti vaccinate contro l'influenza con LMP dal 1° marzo 2018 al 28 febbraio 2019. Queste includevano le coorti delle settimane gestazionali 8-13, 14-27, nonché le coorti di una sola settimana $W=8, \dots, 27$ con vaccinazione antinfluenzale prima della gravidanza ma nella stessa stagione influenzale dell'LMP.

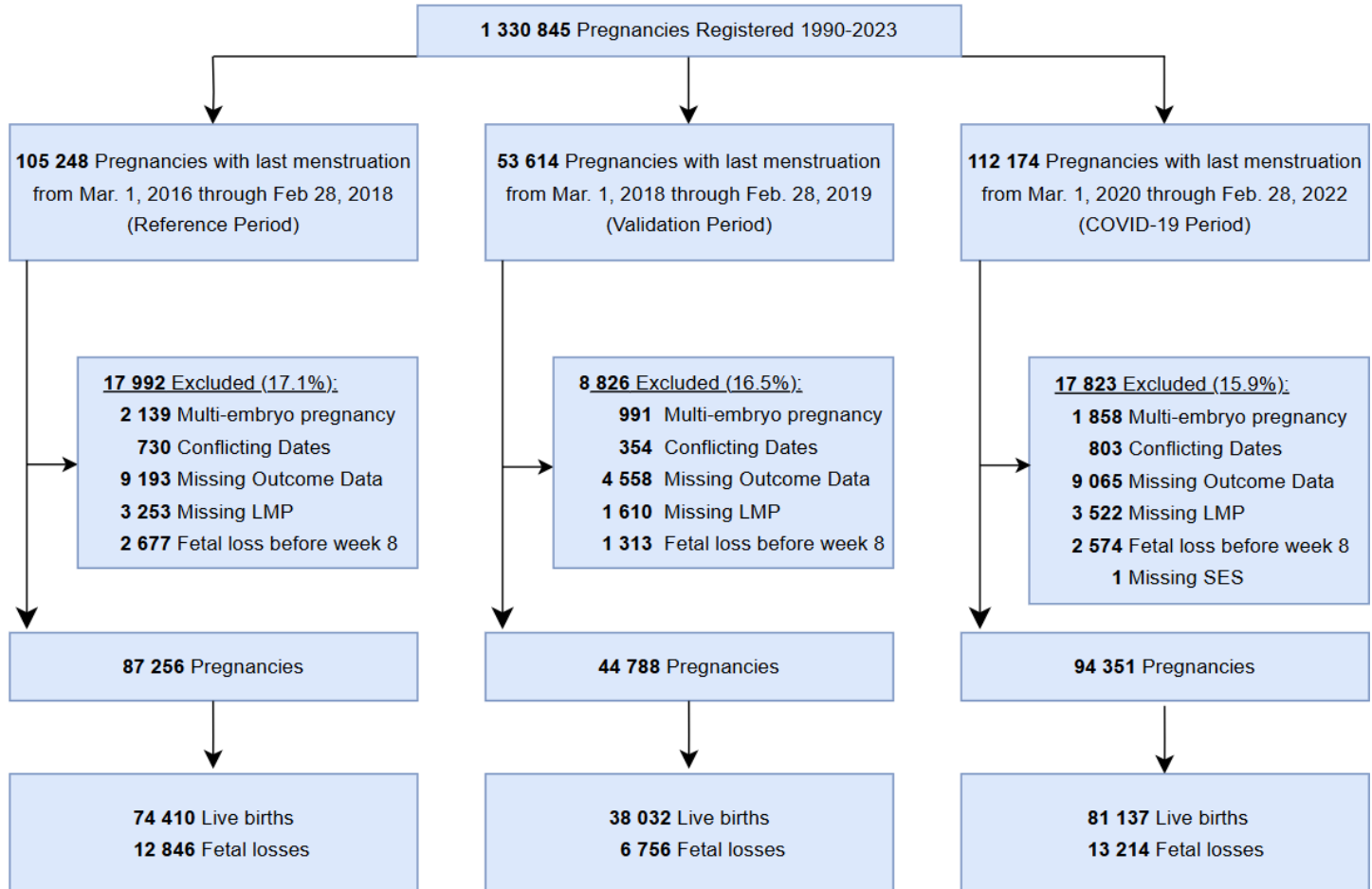
Sono state condotte diverse analisi di robustezza aggiuntive. In primo luogo, le principali analisi osservate/attese sono state ripetute utilizzando un modello di riferimento di base stimato sui dati dal 1° marzo 2016 al 28 febbraio 2019. In secondo luogo, per valutare la sensibilità dei risultati alla scelta del momento di inizio del follow-up (settimana 8), l'analisi osservata/attesa è stata ripetuta quando le gravidanze sono state seguite a partire dalla settimana 10.

Sono state condotte analisi complementari per confrontare sia il punteggio di rischio che le distribuzioni delle covariate della coorte di donne vaccinate contro il COVID-19 nelle settimane 18-13 con la corrispondente coorte vaccinata contro l'influenza, nonché con le donne esposte all'influenza o alla vaccinazione contro il COVID-19 prima della gravidanza. Per valutare la correlazione tra la vaccinazione antinfluenzale e quella contro il COVID-19 nelle prime fasi della gravidanza, sono state identificate le donne il cui periodo di gravidanza ha consentito loro di ricevere la prima dose del vaccino contro il COVID-19 durante le settimane gestazionali 8-13 e 8-27, rispettivamente. All'interno di questi gruppi, le donne che hanno ricevuto il vaccino antinfluenzale nella stessa stagione sono state confrontate con quelle che non lo hanno ricevuto.

RISULTATI

La figura 1 presenta le gravidanze incluse ed escluse dall'analisi, insieme ai motivi dell'esclusione. La tabella S3 presenta le statistiche descrittive sulle covariate per le donne incluse in ciascuno dei tre periodi di analisi (Riferimento, Convalida e COVID-19). Mostra piccole differenze nel valore medio di alcune covariate, che sono state aggiustate nelle analisi osservate/attese. I tassi di vaccinazione contro il COVID-19 durante la gravidanza e la loro tempistica calendariale sono descritti nella sezione S4 dell'appendice supplementare e nella figura S5.

Figura 1. Gravidanze incluse ed escluse dalle analisi



Analisi osservato/atteso

Vaccinazione durante la gravidanza. La tabella 1 mostra i risultati dell'analisi osservato/atteso per le donne vaccinate durante le settimane 8-13 e 14-27. Le donne vaccinate per COVID-19 con 1 o 3 dosi durante le settimane 8-13 hanno mostrato un numero di aborti spontanei osservati durante la gravidanza *superiore al previsto*. Le differenze osservate rispetto al previsto erano 3,85 (95% CI: [2,55-5,14]) per la dose 1 e 1,9 (95% CI: [0,39-3,42]) per la dose 3, ovvero 3,85 e 1,9 perdite fetali osservate in più rispetto al previsto ogni 100 gravidanze, rispettivamente. Per la vaccinazione contro il COVID-19 durante le settimane 14-27, il numero osservato di perdite fetali è stato *inferiore al previsto*, con differenze osservate rispetto al previsto pari a -0,79 (95% CI: [-1,07 - -0,51]) per la dose 1 e -0,85 (95% CI: [-0,48 - -0,37]) per la dose 3.

In netto contrasto, le coorti corrispondenti alla vaccinazione antinfluenzale hanno mostrato un numero di perdite fetali *inferiore al previsto*

numero di perdite fetali osservate, con differenze osservate/previste pari a -5,11 (95% CI: [-6,06 - -4,16]) e -1,24 (95% CI: [-1,61 - -0,98]) per le settimane 8-13 e 14-27, ovvero 5,11 e 1,24 perdite fetali in meno ogni 100 gravidanze rispetto al previsto, rispettivamente. I risultati per la dose 2 del vaccino COVID-19 sono simili a quelli della dose 1 e sono riportati nella Tabella S4 nell'Appendice supplementare. I rapporti tra perdite fetali osservate e previste sono riportati nella Tabella S6.

La Figura 2 mostra i risultati osservati rispetto a quelli attesi per ogni singola coorte a livello settimanale $W=8, \dots, 27$, per la dose 1 di COVID-19 e la vaccinazione antinfluenzale. Questi hanno mostrato modelli coerenti con i risultati della Tabella 1 per le coorti di donne vaccinate durante le settimane 8-13 e 14-27. La Figura 2(a) mostra che, per ciascuna delle settimane $W=8, \dots, 13$, le donne che sono state vaccinate con la dose 1 durante la settimana W hanno mostrato un numero di perdite fetali osservate *superiore al previsto*, con differenze osservate rispetto al previsto che raggiungevano un massimo di 9 perdite fetali in più rispetto al previsto ogni 100 gravidanze. La differenza tra il numero osservato e quello previsto è rimasta positiva, ma è diminuita dalla settimana 9 alla settimana 13, mentre nelle settimane $W=14, \dots, 27$ il trend si è invertito, con un numero di aborti spontanei osservati *inferiore al previsto*. Al contrario, le coorti corrispondenti vaccinate contro l'influenza mostrate nella Fig. 2(b) hanno mostrato un numero di aborti spontanei osservati notevolmente *inferiore al previsto* in tutte le settimane $W=8, \dots, 27$. I risultati per le dosi 2 e 3 del vaccino contro il COVID-19 sono presentati nella Figura S2 nell'Appendice supplementare.

Tabella 1. Perdite fetali effettive rispetto a quelle previste tra le donne vaccinate contro il COVID-19 o l'influenza nelle settimane gestazionali 8-13 e 14-27

Cohort	Observed Fetal Losses per 100 Pregnancies (n)	Expected Fetal Losses per 100 Pregnancies ^a (n)	Observed-to-Expected Difference per 100 Pregnancies (n)	95% C.I. Observed-to-Expected Difference per 100 Pregnancies	Cohort Size N
<u>COVID-19 Dose 1</u>^b					
During weeks 8-13	13.06 (240)	9.22 (169)	3.85 (71)	[2.55 - 5.14]	1 837
During weeks 14-27	1.74 (214)	2.53 (309)	-0.79 (-95)	[-1.07 - -0.51]	12 274
<u>COVID-19 Dose 3</u>^b					
During weeks 8-13	12.04 (175)	10.14 (147)	1.90 (28)	[0.39 - 3.42]	1 454
During weeks 14-27	1.92 (145)	2.77 (209)	-0.85 (-64)	[-0.48 - -0.37]	7 546
<u>Influenza Vaccine</u>^c					
During weeks 8-13	6.13 (248)	11.24 (455)	-5.11 (-207)	[-6.06 - -4.16]	4 048
During weeks 14-27	1.31 (126)	2.60 (250)	-1.29 (-124)	[-1.61 - -0.98]	9 586

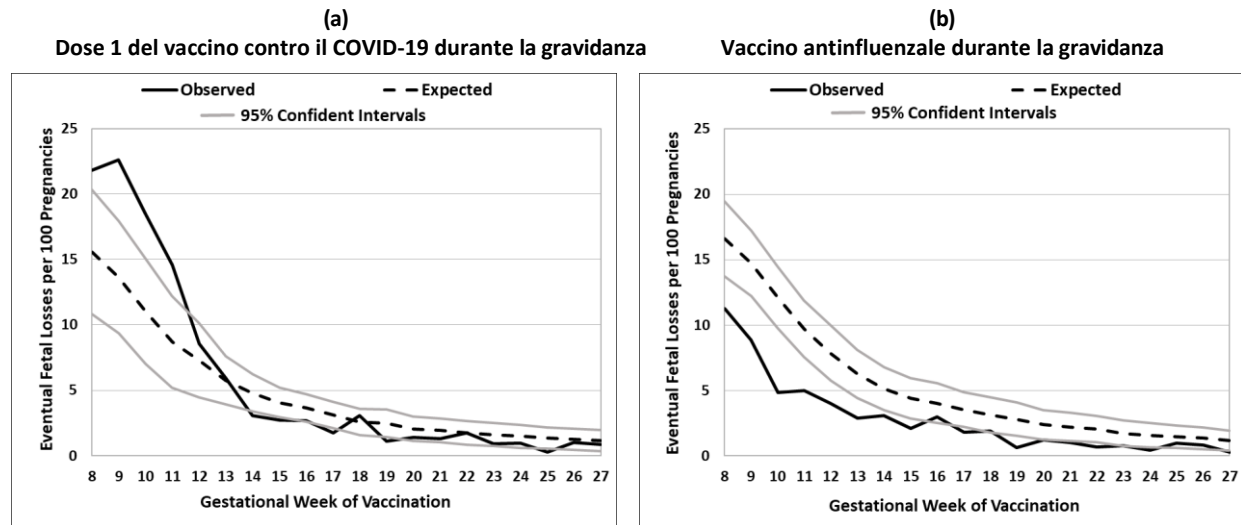
Note: La tabella 1 mostra le perdite fetali osservate rispetto a quelle attese (per 100 gravidanze) tra le donne vaccinate contro il COVID-19 (dose 1 o 3) o l'influenza con LMP dal 1° marzo 2020 al 28 febbraio 2022. I numeri (n) tra parentesi riportano il numero totale corrispondente (osservato/atteso) di perdite fetali nella coorte.

a. Il numero di perdite fetali previste è stato ottenuto sommando le probabilità previste di perdita fetale finale delle donne vaccinate in ciascuna settimana di gestazione, stimate dal modello di riferimento di base per ciascuna donna, in base ai valori delle covariate e alla settimana di gestazione al momento della vaccinazione (vedere la Tabella S2 nell'Appendice supplementare per l'elenco completo delle covariate e i risultati del modello).

b. Tra le donne vaccinate con la dose 1 durante le settimane 8-13 e 14-27, il 97% e il 96% hanno ricevuto BNT162b2. Per la dose 3, quasi il 100% delle donne vaccinate durante le settimane 8-13 e 14-27 ha ricevuto BNT162b2.

c. La coorte vaccinata contro l'influenza corrisponde a due stagioni influenzali comprese tra il 1° marzo 2020 e il 28 febbraio

Figura 2. Perdite fetali effettive rispetto a quelle attese per settimana di gestazione al momento della vaccinazione tra le donne vaccinate contro il COVID-19 o l'influenza



Legenda

- Il pannello (a) mostra i risultati per le donne che hanno ricevuto la prima dose di vaccino contro il COVID-19 in gravidanza durante la rispettiva settimana gestazionale indicata sull'asse X; il pannello (b) mostra i risultati per le donne che hanno ricevuto un vaccino antinfluenzale durante la rispettiva settimana gestazionale. Le dimensioni delle coorti per ciascuna settimana gestazionale sono riportate nella Tabella S9 nell'Appendice supplementare.
- Per ciascun pannello, l'asse Y indica il numero osservato (linea nera continua) e previsto (linea nera tratteggiata) di eventuali perdite fetali (per 100 gravidanze) tra le donne con LMP dal 1° marzo 2020 al 28 febbraio 2022 che sono state vaccinate nella settimana di gestazione indicata sull'asse X. Le linee grigie continue mostrano l'intervallo di confidenza al 95% delle perdite fetali attese per 100 gravidanze in ciascuna settimana. Vedere la sezione S2 nell'appendice supplementare per una descrizione di come sono stati calcolati gli IC.
- Il numero di perdite fetali attese è stato ottenuto sommando le probabilità previste di perdita fetale finale delle donne vaccinate in ciascuna settimana di gestazione, stimate dal modello di riferimento di base per ciascuna donna, in base ai valori delle covariate e alla settimana di gestazione al momento della vaccinazione (vedere la tabella S2 nell'appendice supplementare per l'elenco completo delle covariate e i risultati del modello).

Perdite fetali tardive. La tabella 2 mostra i risultati dell'analisi delle perdite fetali effettive rispetto a quelle previste nelle donne che sono state vaccinate contro il COVID-19 (dose 1 o 3) o contro l'influenza durante le settimane gestazionali 8-13 e che erano ancora in gravidanza all'inizio delle settimane gestazionali 14, 20 e 25, rispettivamente. Sia la coorte della dose 1 che quella della dose 3 hanno continuato a mostrare un numero residuo di perdite fetali effettive significativamente superiore al previsto fino alla settimana di gestazione 25. Per la dose 1, la differenza tra il numero osservato e quello previsto nella settimana 14 era 3,05 (95% CI: [2,06 – 4,05]), ovvero più di 3 perdite fetali aggiuntive ogni 100 gravidanze rispetto al previsto.

che era molto simile alla differenza osservata/prevista di 3,85 riportata nella Tabella 1. Le differenze osservate rispetto al valore atteso nelle settimane 20 e 25 erano pari a 2,47 (95% CI: [1,78 – 3,16]) e 1,66 (95% CI: [1,11 – 2,]) perdite fetali superiori al valore atteso per 100 gravidanze, rispettivamente. Per la dose 3, la differenza osservata rispetto al valore atteso nella settimana 14 era pari a 2,73 (95% CI: [1,57 – 3,89]) perdite fetali superiori al valore atteso per 100 gravidanze, superiore all'1,9 riportato nella Tabella 1, mentre nelle settimane 20 e 25 era pari a 1,52 (95% CI: [0,71 – 2,54]) e 0,95 (95% CI: [0,30 – 1]) perdite fetali superiori al previsto per 100 gravidanze, rispettivamente. Al contrario, il numero osservato di perdite fetali finali *inferiore al previsto* nella coorte influenzale ha mostrato una rapida diminuzione delle differenze negative osservate rispetto al previsto, con -2,27 (95% CI: [-2,96 - -1,58]), -0,91 (95% CI: [-1,39 - -0,44]) e -0,78 (95% CI: [-1,16 - -0,39]) perdite fetali ogni 100

gravidanze nelle settimane 14, 20 e 25, rispettivamente, rispetto alle -5,11 perdite fetali per 100 gravidanze riportate nella Tabella 1. (Vedere la Tabella S6 per i corrispondenti rapporti tra perdite fetali osservate e previste). Inoltre, la Tabella 3 mostra che il 2,72%, l'1,79% e lo 0,72% delle donne che si sono vaccinate durante le settimane gestazionali 8-13, con la dose 1, la dose 3 e l'influenza, rispettivamente, hanno avuto una perdita fetale a partire dalla settimana gestazionale 25, rispetto allo 0,99% e all'1,09% di tutte le donne che erano ancora incinte nelle settimane 8 e 13, rispettivamente.

Vaccinazione prima della gravidanza. La figura 3(a) mostra i risultati osservati rispetto a quelli attesi per ciascuna settimana $W=8,...,27$ tra le donne che hanno ricevuto due dosi prima della gravidanza, le cui gravidanze sono sopravvissute all'inizio della rispettiva settimana W e che non erano state vaccinate con una terza dose all'inizio della settimana. La figura 3(b) mostra gli stessi risultati per le donne vaccinate contro l'influenza nella stessa stagione del loro LMP, ma prima della gravidanza. A differenza dei risultati relativi alla vaccinazione durante la gravidanza, sia la coorte COVID-19 che quella influenzale hanno registrato un numero di aborti simili a quelli attesi, e i numeri osservati erano *in linea con le aspettative* o leggermente *inferiori*. La figura S3 nell'appendice supplementare mostra risultati simili per le donne vaccinate con 3 dosi prima della gravidanza.

Infezioni da SARS-CoV-2. Il numero osservato di perdite fetali era leggermente *inferiore al previsto* per le donne con infezioni da SARS-CoV-2 durante le settimane gestazionali 8-13 e 14-27 prima e dopo la vaccinazione contro il COVID-19, ad eccezione delle infezioni da SARS-CoV-2 nelle settimane gestazionali 8-13 tra le donne non vaccinate, ma tutti gli IC al 95% delle rispettive differenze osservate rispetto a quelle previste includevano 0 (Tabella S8). I tassi di infezione da SARS-CoV-2 prima e durante la gravidanza sono descritti nella sezione S4 dell'appendice supplementare.

Tabella 2. Perdite fetali tardive effettive rispetto a quelle previste dalla 14^a, 20^a e 25^a settimana tra le donne vaccinate contro il COVID-19 o l'influenza nelle settimane gestazionali 8-13

Cohort	Observed Fetal Losses per 100 Pregnancies (n)	Expected Fetal Losses per 100 Pregnancies ^a (n)	Observed-to-Expected Difference per 100 Pregnancies (n)	95% C.I. Observed-to-Expected Difference per 100 Pregnancies	Cohort Size N
<u>COVID-19 Dose 1^b</u>					
<i>From Week 14</i>	7.85 (136)	4.79 (83)	3.05 (53)	[2.06 - 4.05]	1 733
<i>From Week 20</i>	4.60 (77)	2.13 (36)	2.47 (41)	[1.78 - 3.16]	1 674
<i>From Week 25</i>	3.04 (50)	1.37 (23)	1.66 (27)	[1.11 - 2.23]	1 646
<u>COVID-19 Dose 3^b</u>					
<i>From Week 14</i>	7.92 (110)	5.19 (72)	2.73 (38)	[1.57 - 3.89]	1 389
<i>From Week 20</i>	3.83 (51)	2.31 (31)	1.52 (20)	[0.71 - 2.54]	1 330
<i>From Week 25</i>	2.44 (32)	1.49 (19)	0.95 (13)	[0.30 - 1.61]	1 311
<u>Influenza Vaccine^c</u>					
<i>From Week 14</i>	3.01 (118)	5.28 (207)	-2.27 (-89)	[-2.96 - -1.58]	3 918
<i>From Week 20</i>	1.45 (56)	2.36 (91)	-0.91 (-35)	[-1.39 - -0.44]	3 856
<i>From Week 25</i>	0.76 (29)	1.53 (59)	-0.78 (-30)	[-1.16 - -0.39]	3 828

Note: La tabella 2 mostra il numero di perdite fetali effettive rispetto a quelle attese (per 100 gravidanze) per le donne con LMP dal 1° marzo 2020 al 28 febbraio 2022 che sono state vaccinate contro il COVID-19 (dose 1 o 3) o l'influenza durante le settimane di gestazione 8-13. I numeri (n) tra parentesi riportano il numero totale corrispondente di perdite fetali (osservate/attese) nella coorte.

a. Il numero di perdite fetali attese è stato ottenuto sommando la probabilità prevista di perdita fetale finale delle donne in ciascuna coorte di vaccinazione a partire dalla rispettiva settimana di gestazione (14, 20, 25), stimata per ciascuna donna dal modello di riferimento di base, in base ai valori delle covariate e alla settimana di gestazione (14, 20, 25) (vedere la tabella S2 nell'appendice supplementare per l'elenco delle covariate e i risultati del modello). Le donne che hanno subito una perdita fetale prima della settimana corrispondente (14, 20, 25) non sono state incluse nel calcolo.

b. Tra le donne vaccinate con la dose 1 durante le settimane 8-13, il 97% ha ricevuto BNT162b2. Per la dose 3, quasi il 100% delle donne vaccinate durante le settimane 8-13 ha ricevuto BNT162b2.

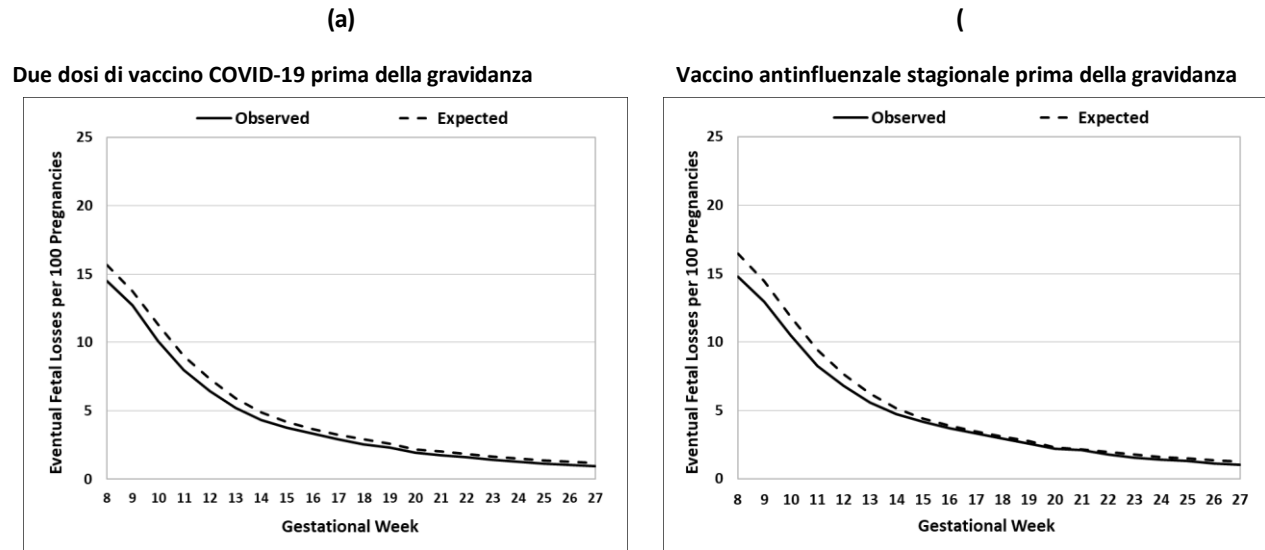
c. La coorte vaccinata contro l'influenza corrisponde a due stagioni, dal 1° marzo 2020 al 28 febbraio 2022.

Tabella 3. Perdite fetali osservate a partire dalla 25^a settimana tra le donne vaccinate contro il COVID-19 o l'influenza e tutte le donne in gravidanza tra l'8^a e la 13^a settimana

Week	Cohort Size (N)	Fetal Losses from Week 25 (n)	Fetal Losses from Week 25 (%)
DOSE 1			
8	211	5	2.37%
9	239	9	3.77%
10	227	5	2.20%
11	240	8	3.33%
12	315	8	2.54%
13	605	15	2.48%
8-13	1837	50	2.72%
DOSE 3			
8	205	2	0.98%
9	231	4	1.73%
10	218	7	3.21%
11	230	8	3.48%
12	309	3	0.97%
13	590	8	1.36%
8-13	1783	32	1.79%
INFLUENZA			
8	621	3	0.48%
9	736	6	0.82%
10	706	2	0.28%
11	700	10	1.43%
12	621	4	0.64%
13	664	4	0.60%
8-13	4048	29	0.72%
ALL WOMEN			
8	94351	935	0.99%
9	92492	935	1.01%
10	90096	935	1.04%
11	88093	935	1.06%
12	86677	935	1.08%
13	85567	935	1.09%

Note: I pannelli della tabella 3 mostrano il tasso di perdite fetali effettive a partire dalla 25^a settimana per le donne vaccinate con la prima dose di COVID-19, la terza dose, l'influenza e per tutte le donne con LMP dal 1° marzo 2020 al 28 febbraio 2022. Per le coorti vaccinate, N è il numero di donne vaccinate nella settimana considerata, mentre per tutte le donne N è il numero di donne ancora in gravidanza all'inizio della settimana considerata. Le coorti vaccinate mostrano anche i calcoli combinati per tutte le donne nelle coorti di 8-13 settimane, che possono essere confrontati con la settimana 13 per tutte le donne.

Figura 3. Perdite fetali effettive rispetto a quelle attese tra le donne vaccinate per COVID-19 o influenza prima della gravidanza



Legenda della figura 3:

- Il pannello (a) mostra i risultati per le donne che hanno ricevuto 2 dosi di vaccino anti COVID-19 prima dell'LMP e la cui gravidanza era in corso all'inizio della rispettiva settimana gestazionale indicata sull'asse X; il pannello (b) mostra risultati simili per le donne che hanno ricevuto un vaccino antinfluenzale prima dell'LMP. Le dimensioni delle coorti per ciascuna settimana sono riportate nella Tabella S9 nell'Appendice supplementare.
- Per ciascun pannello, l'asse Y indica il numero osservato (linea nera continua) e previsto (linea nera tratteggiata) di eventuali perdite fetali ogni 100 gravidanze tra le donne con LMP dal 1° marzo 2020 al 28 febbraio 2022 che erano ancora in gravidanza all'inizio di ciascuna settimana gestazionale (8-27) indicata sull'asse X.
- Il numero di perdite fetali attese è stato ottenuto sommando le probabilità previste di perdita fetale delle donne in ciascuna coorte, stimate dal modello di riferimento di base per ciascuna donna, in base ai valori delle covariate e alla rispettiva settimana di gestazione indicata sull'asse X (vedere la tabella S2 nell'appendice supplementare per l'elenco completo delle covariate e i risultati del modello). Le donne che hanno subito una perdita fetale prima della rispettiva settimana di gestazione sull'asse X non sono state incluse nel calcolo.

Risultati di convalida e robustezza

I risultati dell'analisi osservato/atteso per la vaccinazione antinfluenzale durante il periodo pre-pandemico dal 1° marzo 2018 al 28 febbraio 2019 erano molto simili ai risultati dell'analisi primaria, suggerendo che le variazioni annuali nei modelli delle differenze osservate/attese nel numero di perdite fetali effettive erano relativamente basse (Tabella S5, Figura S4).

Il confronto tra le donne della coorte che ha ricevuto la prima dose durante le settimane gestazionali 8-13 e le coorti di controllo (vaccinazione antinfluenzale durante le settimane 8-13 e vaccinazione contro COVID-19 e influenza prima della gravidanza) indica che i punteggi di rischio delle donne nelle coorti di controllo erano relativamente più elevati (Tabella S7). Ciò potrebbe essere spiegato dalle differenze nella distribuzione delle covariate, dove le coorti di controllo presentavano una percentuale più elevata di donne con comorbidità e fattori di rischio.

La maggior parte delle donne (89%) che hanno ricevuto la prima dose durante le settimane gestazionali 8-27 avevano un LMP compreso tra ottobre 2020 e gennaio 2021 (vedere la Figura S5 per la distribuzione mensile). Complessivamente, 20.383 gravidanze con LMP durante questi mesi hanno avuto l'opportunità di ricevere la prima dose di vaccino COVID-19 nelle settimane gestazionali 8-27. Di queste, 2.984 avevano ricevuto un vaccino antinfluenzale durante la stagione influenzale 2020-2021. Le donne che avevano ricevuto il vaccino antinfluenzale erano circa 2 volte più propense a ricevere la prima dose del vaccino contro il COVID-19 rispetto alle donne che non lo avevano ricevuto (15,08% contro 7,25% per le settimane 8-13 e 71,31% contro 37,94% per le settimane 8-27).

I risultati con il modello di riferimento di base stimato sui dati dal marzo 2016 al febbraio 2019 erano molto simili ai risultati dell'analisi primaria. I risultati sono rimasti molto simili anche quando le gravidanze sono state seguite dalla settimana 10.

DISCUSSIONE

Il risultato principale di questo studio è che la vaccinazione contro il COVID-19 con qualsiasi dose durante le settimane gestazionali 8-13 di gravidanza è stata associata a un numero di perdite fetali osservato *superiore al previsto* (Tabelle 1, S4). Per la dose 1, ciò ha comportato quasi 4 (3,85) perdite fetali in più rispetto al previsto ogni 100 gravidanze esposte alla dose 1 di vaccino contro il COVID-19 durante le settimane 8-13, ovvero circa 13 perdite fetali osservate ogni 100 gravidanze rispetto alle 9 previste. Analogamente, le donne vaccinate con la dose 3 durante le settimane 8-13 hanno mostrato quasi 1,9 perdite fetali in più ogni 100 gravidanze rispetto al previsto.

Le donne vaccinate durante le settimane 8-13 hanno riportato un numero di aborti spontanei *superiore al previsto* nel corso della gravidanza. Dei 3,85 aborti spontanei in più ogni 100 gravidanze rispetto al previsto per la dose 1 (Tabella 1), oltre 3 si sono verificati a partire dalla settimana 14 e poco meno della metà, ovvero 1,66 aborti spontanei, si sono verificati a partire dalla settimana gestazionale 25 (Tabella 2). Inoltre, il 2,72% delle donne vaccinate con la dose 1 e l'1,79% delle donne vaccinate con la dose 3 durante le settimane 8-13 hanno avuto una perdita fetale a partire dalla settimana 25, un tasso notevolmente superiore all'1% registrato per tutte le donne in gravidanza e allo 0,79% delle donne vaccinate contro l'influenza durante il periodo in esame (Tabella 3). Ciò indica che gran parte del numero osservato di perdite fetali *superiore al previsto* associato alla vaccinazione contro il COVID-19 durante le settimane di gestazione 8-13 derivava inequivocabilmente da perdite fetali tardive, ovvero natimortalità e aborti spontanei o terapeutici causati da meccanismi biologici e ragioni mediche, piuttosto che da modelli comportamentali che tipicamente determinano aborti puramente elettivi.

Il confronto tra i modelli osservati e quelli attesi per la vaccinazione contro il COVID-19 durante le settimane 8-13 con i modelli corrispondenti durante le settimane 14-27 e con le coorti di controllo comparative fornisce un contesto importante per la loro interpretazione. Il numero osservato di perdite fetali *superiore al previsto* per la vaccinazione contro il COVID-19 durante le settimane 8-13 è cambiato rapidamente e le settimane gestazionali 14-27 hanno mostrato numeri osservati *inferiori al previsto*. Inoltre, a differenza della vaccinazione contro il COVID-19, la vaccinazione antinfluenzale durante la gravidanza ha mostrato un numero di perdite fetali osservate notevolmente *inferiore al previsto* durante tutte le settimane di gestazione 8-27, con 5,11 perdite fetali in meno rispetto al previsto per 100 gravidanze per la vaccinazione antinfluenzale durante le settimane 8-13 (Tabelle 1 e Figura 2(b)). Anche le coorti di controllo comparative, corrispondenti alla vaccinazione prima della gravidanza, hanno mostrato modelli osservati/previsti molto diversi dalla vaccinazione contro il COVID-19 durante le settimane 8-13, con le donne vaccinate prima della gravidanza che hanno mostrato numeri osservati leggermente *inferiori al previsto* o *in linea con le aspettative* (Figure 3 e S3).

Esiste una differenza marcata nei modelli osservati rispetto a quelli attesi per le vaccinazioni contro il COVID-19 tra le settimane gestazionali 8-13 e le settimane 14-27 o prima della gravidanza. Questa differenza, insieme al numero *superiore al previsto* di aborti tardivi associati alla vaccinazione durante le settimane 8-13 (compresa la settimana 25 in poi), può essere coerente con i meccanismi biologici sottostanti che dipendono dal momento dell'esposizione durante la gravidanza. Infatti, l'esposizione a teratogeni, soprattutto nelle prime fasi della gravidanza, è un rischio noto per esiti avversi della gravidanza ed è stata discussa in

nel contesto della vaccinazione, compresi i vaccini antinfluenzali. (Bednarczyk e Adjaye-Gbewonyo 2012, Skowronski 2009) Il periodo critico per lo sviluppo di molte anomalie congenite coincide con le prime fasi della gravidanza e in particolare con il primo trimestre. (Czeizel 2008) Inoltre, recenti evidenze suggeriscono che si verifichi una trasmissione transplacentare dei vaccini a mRNA contro il COVID-19 (Lin, et al. 2024, Chen, et al. 2025), e uno studio in vitro mostra la soppressione dei geni della globina embrionale-fetale nelle cellule K562 di eritroleucemia umana dopo l'esposizione al vaccino BNT162b2. (Zurlo, et al. 2023) Inoltre, i vaccini a mRNA contro il COVID-19 sono associati a eventi avversi trombotici, che sono un altro meccanismo noto che provoca aborti spontanei. (Berild, et al. 2022)

In particolare, le differenze osservate rispetto a quelle attese per le donne che hanno ricevuto la prima e la seconda dose durante le settimane 8-13 (l'87% di tutte le donne che hanno ricevuto la prima dose ha continuato a ricevere la seconda dose durante la gravidanza) erano 2 volte superiori rispetto a quelle delle donne che hanno ricevuto due dosi prima della gravidanza e una singola dose 3 durante le settimane 8-13 (3,85 contro 1,9, rispettivamente). Questa potenziale relazione dose-risposta potrebbe anche essere coerente con i meccanismi biologici, poiché la differenza osservata rispetto a quella prevista aumenta con una dose aggiuntiva ricevuta all'inizio della gravidanza.

È plausibile che il numero osservato di perdite fetali *inferiore al previsto* sia per la vaccinazione contro il COVID-19 durante le settimane gestazionali 14-27 che per la vaccinazione antinfluenzale durante le settimane 8-27 sia il risultato di un bias dei soggetti vaccinati sani, piuttosto che di un effetto protettivo della vaccinazione. Esistono prove provenienti da diversi paesi, tra cui Israele, di un bias dei soggetti vaccinati sani in studi sulla vaccinazione contro il COVID-19 e sugli esiti di ospedalizzazione e decesso. (Høeg, Duriseti e Prasad 2023, Riedmann, et al. 2024, Xu, et al. 2021, Furst e Straka 2024) Il bias dei soggetti vaccinati sani, un tipo di bias degli utenti sani, è stato evidenziato anche negli studi sulla sicurezza e l'efficacia della vaccinazione antinfluenzale, anche durante la gravidanza. (Remschmidt, Wichmann e Harder 2015, Wolfe, et al. 2023, Dozelli 2018) Inoltre, i risultati osservati rispetto a quelli attesi per l'esposizione alle infezioni da SARS-CoV-2 durante la gravidanza (Tabella S8) non hanno mostrato alcun segnale di aumento significativo del numero di perdite fetali rispetto a quanto atteso, anche tra le donne non vaccinate. Analogamente, i tassi di infezione durante la stagione influenzale 2020-2021 sono stati significativamente inferiori rispetto agli anni precedenti, compresa ad esempio la stagione 2018-2019. (Fratty, et al.

2022) Poiché le differenze osservate rispetto a quelle previste per la vaccinazione antinfluenzale durante la gravidanza in entrambi i periodi erano sostanzialmente simili, è improbabile che la vaccinazione antinfluenzale abbia ridotto in modo significativo le perdite fetali.

Sebbene il numero *superiore al previsto* di perdite fetali associate all'esposizione alla vaccinazione contro il COVID-19 durante le settimane gestazionali 8-13 sia motivo di preoccupazione, l'analisi dei dati osservati rispetto a quelli attesi non è sufficiente per stabilire una relazione causale.

Anche se la vaccinazione contro il COVID-19 all'inizio della gravidanza aumentasse effettivamente il numero di perdite fetali al di sopra di quanto previsto, qualsiasi impatto cumulativo a livello di popolazione sarebbe stato probabilmente modesto e non facilmente rilevabile dai tradizionali meccanismi di farmacovigilanza. La ragione di ciò è che solo un numero relativamente esiguo di donne ha ricevuto la vaccinazione durante le settimane gestazionali 8-13. In particolare, delle 20.383 donne incluse in questo studio che avrebbero potuto ricevere la prima dose durante le settimane di gestazione 8-27 in base alla loro LMP, solo 1.837, circa il 9%, hanno ricevuto la prima dose durante le settimane di gestazione 8-13. È importante notare che queste donne sembrano aver avuto un rischio *a priori* di perdita fetale inferiore rispetto alla popolazione.

Inoltre, 3,85 perdite fetali aggiuntive ogni 100 gravidanze equivalgono a un totale di 71 perdite fetali in più rispetto al previsto, che è inferiore allo 0,35% delle 20.383 donne. Un segnale del genere avrebbe potuto essere facilmente mascherato dalla variabilità casuale e dalle tendenze temporali, come la tendenza osservata alla diminuzione dei tassi di aborti indotti elettivi in Israele, in particolare nel periodo 2020-2022. (Ministero della Salute israeliano 2023) Infatti, come si può calcolare dalla Figura 1, la percentuale complessiva di gravidanze che hanno portato alla perdita fetale a partire dall'ottava settimana di gestazione è stata del 14% nel periodo 2020-2022, rispetto al 15,08% e al 14,7% nel periodo 2018-2019 e 2016-2018, rispettivamente.

Ciò evidenzia l'importanza di sviluppare metodi di farmacovigilanza robusti, compresi quelli prospettici, per individuare segnali di sicurezza deboli in sottogruppi della popolazione. Ciò è particolarmente vero per esiti comuni come aborto spontaneo, parto prematuro e anomalie fetali, che difficilmente vengono segnalati come eventi avversi sospetti a meno che non presentino caratteristiche insolite o patognomoniche e in cui la finestra di teratogenicità può essere ristretta.

Gran parte dei risultati di questo studio, in particolare le analisi osservate/attese, non possono essere confrontati direttamente con lavori precedenti, che si sono concentrati quasi esclusivamente su analisi di regressione con aggiustamento del rischio che confrontano le donne vaccinate con quelle non vaccinate durante le campagne di vaccinazione e hanno studiato principalmente l'impatto della vaccinazione durante le fasi avanzate della gravidanza. (Rimmer, et al. 2023, Prasad, et al. 2022) Tuttavia, tali approcci sono spesso messi in discussione per ottenere coorti stabili e simili, anche quando si utilizzano metodi di bilanciamento delle covariate, come la ponderazione della probabilità inversa del trattamento (IPTW) e

corrispondenza. (McCaffrey, et al. 2013, Austin 2015, Stuart 2010). Due studi sull'associazione tra la vaccinazione contro il COVID-19 durante la gravidanza e l'incidenza dell'infezione da SARS-CoV-2, utilizzando i dati dei registri di gravidanza in Israele, illustrano questi limiti. (Goldshtein, Nevo, et al. 2021, Dagan, et al. 2021) Gli studi sono riusciti ad abbinare con successo solo il 63% e il 38% delle donne vaccinate idonee, rispettivamente. Inoltre, il 42% e il 47% delle coppie vaccinate-non vaccinate abbinate, rispettivamente, sono state censurate quando le donne di controllo abbinate sono state vaccinate, portando a un breve periodo di follow-up. Al contrario, l'analisi osservata/attesa in questo studio ha permesso il massimo abbinamento delle donne vaccinate ai controlli storici ("sintetici"), tempi di follow-up più lunghi e la valutazione di una serie di esposizioni alla vaccinazione in termini di dosi e tempistica.

La ricerca condotta in Scozia (Calvert, Carruthers, et al. 2022) costituisce in qualche modo un'eccezione, in quanto ha abbinato donne in gravidanza vaccinate a donne in gravidanza con la stessa età materna e la stessa settimana di gestazione degli anni precedenti. Sebbene gli autori non abbiano riportato risultati significativi, non hanno considerato le perdite fetali dopo la ventesima settimana e la loro analisi ha combinato l'esposizione a partire da sei settimane prima del concepimento con l'esposizione fino alla ventesima settimana di gestazione. Inoltre, il loro algoritmo di abbinamento era approssimativo e non ha tenuto conto di molte covariate importanti con un impatto noto sul rischio di perdita fetale, con coorti abbinate che differivano in modo significativo. Al contrario, il modello di riferimento di base utilizzato nel presente studio si è basato su tutte le gravidanze con LMP da marzo 2016 a febbraio 2018 per stabilire punteggi di rischio individuali aggiustati che tengono conto delle covariate specifiche delle donne vaccinate e delle perdite fetali attese specifiche per coorte durante l'intera gravidanza.

Un aspetto unico del presente studio rispetto alla letteratura esistente sull'impatto della vaccinazione contro il COVID-19 durante la gravidanza è stato l'uso di controlli comparativi multipli. Il confronto dei tassi degli stessi esiti avversi tra diversi vaccini è comunemente utilizzato nella rilevazione dei segnali di sicurezza. (Vellozzi, et al. 2010) Sebbene le donne vaccinate contro il COVID-19 durante la gravidanza non avessero caratteristiche identiche a quelle vaccinate contro l'influenza durante la gravidanza, è ragionevole supporre che le due coorti condividessero almeno alcuni fattori di confondimento non osservati. Analogamente, il confronto tra diversi tempi di vaccinazione è stato utilizzato in precedenza per valutare i potenziali rischi per la sicurezza dei vaccini pediatrici. (DeStefano, et al. 2001, Velez, et al. 2023)

Limiti. Innanzitutto, l'analisi osservata/attesa è appropriata per rilevare potenziali segnali di sicurezza, ma non per dedurre una relazione causale tra la vaccinazione e l'aumento o la diminuzione dei tassi di perdita fetale né per quantificare l'entità di tale potenziale impatto. Come in qualsiasi studio osservazionale, esistono preoccupazioni relative a covariate confondenti non osservate. Tuttavia, se esistessero, tali fattori confondenti non osservati avrebbero dovuto essere specifici delle donne che hanno ricevuto la vaccinazione per il COVID-19 ma non per l'influenza. Avrebbero inoltre dovuto essere rilevanti per le donne che si sono vaccinate durante le settimane gestazionali 8-13 ma non durante le settimane 14-27 o prima della gravidanza. In secondo luogo, questo studio non ha incluso le settimane gestazionali 1-7 e quindi non ha potuto valutare il potenziale impatto della vaccinazione durante tale periodo. In terzo luogo, un'altra limitazione generale degli studi basati sui registri di gravidanza deriva dal fatto che spesso le perdite fetali precoci non sono documentate e, più in generale, il follow-up potrebbe non essere coerente tra le donne. Infatti, nel registro sono state escluse alcune gravidanze a causa della mancanza di un follow-up adeguato e tempestivo e, sebbene l'analisi non abbia evidenziato evidenti distorsioni correlate, non è possibile escluderle. In quarto luogo, il registro Maccabi, come la maggior parte dei registri di gravidanza, non ha fornito informazioni sufficienti per distinguere tra aborti indotti puramente elettivi e quelli indotti per motivi medici. È quindi possibile che alcune delle differenze osservate rispetto alle aspettative siano determinate da meccanismi comportamentali. Ad esempio, le donne vaccinate all'inizio della gravidanza potrebbero essere state più propense a segnalare perdite fetali. Infine, questo studio si basa solo su dati provenienti da Israele e sarebbe importante condurre studi con dati simili provenienti da altri paesi per verificare se i risultati sono replicabili.

Conclusione. Nel complesso, i risultati di questo studio hanno fornito prove preoccupanti di un tasso di perdita fetale *superiore al previsto* associato alle dosi di vaccino anti-COVID-19 a mRNA somministrate durante la prima fase della gravidanza (settimane gestazionali 8-13). Il segnale di sicurezza dovrebbe essere ulteriormente indagato dalle autorità regolatorie nell'ambito della loro valutazione dei rischi della vaccinazione durante la gravidanza, con particolare attenzione agli effetti fisiologici nella prima fase della gravidanza. È inoltre necessario condurre studi fisiopatologici per comprendere meglio i potenziali meccanismi biologici. Inoltre, sarebbe utile valutare il potenziale impatto dei vaccini anti-COVID-19 non a mRNA. I risultati sottolineano anche l'importanza di condurre studi clinici prospettici dedicati e statisticamente significativi per studiare l'impatto della vaccinazione contro il COVID-19 e altri agenti patogeni durante la gravidanza, al fine di fornire raccomandazioni più informate a questa popolazione vulnerabile.

RUOLI DEGLI AUTORI

Concettualizzazione: JG e RL; Acquisizione dei dati: TP e SG; Analisi dei dati: JG e RL; Stesura: JG e RL; Interpretazione dei risultati e revisione critica: JG, RL, TP, SG, TBH, JF, YS; Approvazione finale: JG, RL, TP, SG, TBH, JF, YS; Responsabilità: JG, RL, TP, SG, TBH, JF, YS

RINGRAZIAMENTI

Gli autori ringraziano Jay Bhattacharya per i suoi utili commenti e contributi alle versioni precedenti dell'articolo. Ulteriori commenti sono stati forniti da Joseph Ladapo, Shoshy Altuvia, Efrat Schur, Alexandra Kalev, Norman Fenton, Clare Craig, Jessica Rose e Sam Saidi.

FINANZIAMENTI

Nessuno degli autori ha ricevuto finanziamenti per questo progetto.

CONFLITTI DI INTERESSE

TP, SG, JF e YS dichiarano l'assenza di conflitti di interesse. Durante questo periodo, RF ha ricevuto sovvenzioni attive dalla FDA e dalla collaborazione MIT-Takeda per progetti non collegati al presente studio. Non in relazione al presente studio, TBH ha ricevuto onorari e rimborsi spese di viaggio dal Global Liberty Institute e dalla Heterodox Academy, nonché consulenze dal Dipartimento della Salute Pubblica della Florida e dalla Real Clear Foundation. JG e TBH hanno ricevuto pagamenti dagli abbonati alle loro newsletter tramite Substack, Inc., non in relazione al presente studio. TBH è stato membro fondatore non retribuito di The Urgency Normal.

RIFERIMENTI

- Abadie, A., S. Athey, G. W. e Wooldridge, J. M. Imbens. 2023. "When Should You Adjust Standard Errors for Clustering? ." *Q J Econ.* 138 (1): 1-35.
- Aharon, D., M. Lederman, A. Ghofranian, C. Hernandez-Nieto, C. Canon, Hanley W., D. Gounko, J. A. Lee, D. Stein, E. e Copperman, A. B. Buyuk. 2022. "Fecondazione in vitro ed esiti della gravidanza precoce dopo la vaccinazione contro la malattia da coronavirus 2019 (COVID-19-19)". *Ostetricia e ginecologia* 139 (4) : 490-497.
- Austin, P. C. e Stuart E. A. 2015. "Verso le migliori pratiche nell'uso della ponderazione della probabilità inversa del trattamento (IPTW) utilizzando il punteggio di propensione per stimare gli effetti causali del trattamento negli studi osservazionali". *Statistics of Medicine* 34 (28): 3661-3679.
- Bednarczyk, R. A., e D. e Omer, S. B. Adjaye-Gbewonyo. 2012. "Sicurezza della vaccinazione antinfluenzale durante la gravidanza per il feto e il neonato". *Am J Obstet Gynecol* 270 (3): 38-46.
- Berild, J. D., V. B. Larsen, E. M. Thieson, T. Lehtonen, M. Grøslund, J. Helgeland, J. Wolhlfahrt, J. V. Hansen e A. A. e Hviid, A. Palmu. 2022. "Analisi degli eventi tromboembolici e trombocitopenici dopo i vaccini AZD1222, BNT162b2 e MRNA-1273 COVID-19-19 in 3 paesi nordici". *JAMA Network Open* 5 (6): 00-00.
- Bonhoeffer, J., S. Kochhar, S. Hirschfeld, P. Heath, C. E. Jones, J. Bauwens, A. Honrado, et al. 2016. "Allineamento globale della valutazione della sicurezza delle vaccinazioni in gravidanza – Il progetto GAIA". *Vaccine* 34 (49): 5993-5997.
- Calvert, C., J. Carruthers, C. Denny, J. Donaghy, S. Hillman, L. E. M. Hopcroft, L. Hopkins, et al. 2022. "Uno studio di coorte abbinato basato sulla popolazione sugli esiti della gravidanza precoce dopo la vaccinazione contro il COVID-19 e l'infezione da SARS-CoV-2." *Nature Communications* 13: 6124-6130.
- Calvert, C., J. Carruthers, C. Denny, J. Donaghy, S. Hillman, L. E. M. Hopcroft, L. Hopkins, et al. 2023. "Uno studio di coorte abbinato basato sulla popolazione delle principali anomalie congenite a seguito della vaccinazione contro il COVID-19 e dell'infezione da SARS-CoV-2". *Nature Communications* 14: 107.
- Czeizel, A. F. 2008. "Periodo critico specifico di diverse anomalie congenite: un nuovo approccio per gli studi teratologici sull'uomo". *Congenital Anomalies* 48 (3): 103-109.
- Dagan, N., N. Barda, T. Biron-Shental, M. Makov-Assif, Key C., I. S. Kohane, M. A. Hernán, M. Lipsitch, S. Hernandez-Diaz, B. Y. e Balicer, R. D. Reis. 2021. "Efficacia del vaccino BNT162b2 mRNA COVID-19-19 in gravidanza". *Nature Medicine* 27: 1693–1695.
- D'Agostino, R. B., M. L. Lee, A. J. Belanger, L. A. Cupples, K. e Kannel, W. B. Anderson. 1990. "Relazione tra la regressione logistica aggregata e l'analisi di regressione di Cox dipendente dal tempo: lo studio Framingham Heart Study". *Stat Med* 9 (12): 1501-1515.
- D'Agostino, R. B., M. L. Lee, A. J. Belanger, L. A. Cupples, K. Anderson e W. B. Kannel. 1990. "Relazione tra regressione logistica aggregata e analisi di regressione di Cox dipendente dal tempo: lo studio Framingham Heart Study." *Stat Med.* 9 (12): 1501-1515.
- DeStefano, F., J. P. Mullooly, C. A. Okoro, R. T. Chen, S. M. Marcy, J. I. Ward, C. M. Vadheim, S. B. Black, H. R. Shinefield, R. L. e Bohlke, K. Davis. 2001. "Vaccinazioni infantili, tempistica delle vaccinazioni e rischio di diabete mellito di tipo 1". *Pediatrics* 108 (6): 112-.

- Dick, A., J. I. Rosenbloom, E. Gutman-Ido, N. Lessans, A. Chill e H. H. Cahen-Peretz. 2022. "Sicurezza del terzo vaccino SARS-CoV-2 (dose di richiamo) durante la gravidanza". *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 4 (4): 100637.
- Dozelli, A. 2018. "Vaccinazioni antinfluenzali per tutte le donne in gravidanza? Sono necessarie prove più evidenti". *Int J Environ Res Public Health* 15 (9): 2034.
- Fell, D. B., M. C. Dimitris, J. A. Hutcheon, J. R. Ortiz, R. W. Platt, A. K. e Savitz, D. A. Regan. 2021. "Linee guida per la progettazione e l'analisi di studi osservazionali sugli esiti fetali e neonatali a seguito della vaccinazione contro il COVID-19 durante la gravidanza". *Vaccine* 39 (14): 1882-1886.
- Fell, D. B., T. Dhinsa, G. D. Alton, E. Török, S. Dimanlig-Cruz, A. K. Regan, A. E. Sprague, et al. 2022. "Associazione tra vaccinazione contro il COVID-19 in gravidanza ed esiti avversi peripartum". *JAMA* 327 (15): 1478-1487.
- Fratty, I. S., S., Reznik-Balter, I. Nemet, N. Atari, L. Kliker, H. Sherbany, N. Keller, M. Stein, E. e Mandelboim M. Mendelson. 2022. "Focolaio di influenza e altri virus respiratori in pazienti ospedalizzati durante la pandemia di SARS-CoV-2". *Frontier in Microbiology* 13: 00-00.
- Furst, T., e R. e Janosek, J. Straka. 2024. "Effetto vaccinale sano: un bias da non dimenticare negli studi osservazionali sull'efficacia del vaccino COVID-19-19". *Pol Arch Intern Med.* 134: 16634.
- Goldshtein, I., D. M. Steinberg, J. Kuint, G. Chodick, Y. Segal, e S. e Ben-Tov, A. Shapiro-Ben-David. 2022. "Associazione tra la vaccinazione con BNT162b2 COVID-19-19 durante la gravidanza e gli esiti neonatali e nella prima infanzia". *JAMA Pediatrics* 176 (5): 470-477.
- Goldshtein, I., D. Nevo, D. M. Steinberg, R. S. Rotem, M. Gorfine, G. Chodick e Y Segal. 2021. "Associazione tra la vaccinazione con BNT162b2 e l'incidenza dell'infezione da SARS-CoV-2 nelle donne in gravidanza". *JAMA* 326 (8): 728-735.
- Gordillo-Marañón, M., G. Candore, K. Hedenmalm, K. Browne, R. Flynn, L. Piccolo, A. Santoro, C. e Kurz, X. Zaccaria. 2024. "Lezioni apprese dall'analisi dei dati osservati rispetto a quelli attesi utilizzando segnalazioni spontanee durante la vaccinazione di massa". *Drug Safety* 47: 607-615.
- Høeg, T. B., R. Duriseti e V. Prasad. 2023. "Potenziale "distorsione dovuta a vaccinati sani" in uno studio sul vaccino BNT162b2 contro il COVID-19-19". *New Journal England of Medicine* 389: 284-286.
- Howards, P. P., e I. e Poole, C. Hertz-Picciotto. 2007. "Condizioni per la distorsione dovuta al troncamento differenziale a sinistra". *Am J Epidemiol* 165 (4): 444-452. doi:10.1093/aje/kwk027.
- Hu, K. e Tong, W. 2021. "Quale scegliere quando si valutano i fattori di rischio per lo stoma permanente, il modello di regressione COX o il modello di regressione logistica?" *Ann Transl Med.* 9 (21): 1634.
- Hui, L., M. B. Marzan, D. L. Rolnik, S. Potenza, N. Pritchard, J. M. Said, K. R. Palmer, C. L. e Sheehan, P. M. Whitehead. 2023. "Riduzione dei casi di natimortalità e parto pretermine nelle donne vaccinate contro il COVID-19: uno studio multicentrico di coorte sulla diffusione della vaccinazione e sugli esiti perinatali." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 228 (5): 1-16.
- Ministero della Salute israeliano. 2023. *Interruzione di gravidanza secondo la legge 1990-2022*. Governo, Gerusalemme, Israele: Ministero della Salute israeliano. https://www.gov.il/BlobFolder/reports/abortions-by-law/he/files_publications_info_unit_preg1990_2022.pdf.

- Kharbanda, E. O., J. Haapala, H. S. Lipkind, M. B. DeSilva, J. Zhu, K. K. Vesco, A. L. Naleway, e H. S. e Lipkind. 2023. "COVID-19-19 Vaccinazione di richiamo in gravidanza precoce e sorveglianza". *JAMA Open* 6 (5): 00-00.
- Kharbanda, E. O., J. Haapala, M. DeSilva, G. Vazquez-Benitez, K. K. Vesco, A. L. e Lipkind, H. S. Naleway. 2021. "Aborto spontaneo in seguito alla vaccinazione contro il COVID-19 durante la gravidanza." *JAMA* 326 (16): 1629-1631.
- Kuhbandner, C, e M Reitzner. 2023. "Stima della mortalità in eccesso in Germania nel periodo 2020-2022". *Cureus* 15 (5): 00-00.
- Liang, K.Y. e Zeger, S. L. 1986. "Analisi longitudinale dei dati utilizzando modelli lineari generalizzati". *Biometrika* 73 (1): 13-22. doi:doi:10.1093/biomet/73.1.13.
- Lin, X., B. Botros, M. Hanna, E. Gurzenda, C. M. D. Mejia, M. e Hanna, N. Chavez. 2024. "Trasmissione transplacentare del messaggero RNA del vaccino COVID-19-19: prove dalle analisi del sangue placentare, materno e del cordone ombelicale dopo la vaccinazione". *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 00: 00-00.
- Lipschuetz, M., J. Guedalia, S. M. Cohen, S. Sompolinsky, G. Shefer, E. Melul, Z. Ergaz-Shaltiel, D. Goldman-Wohl, S. Yagel e O. Calderon-Margalit R. e Beharier. 2023. "Terza dose materna del vaccino a mRNA BNT162b2 e rischio di ospedalizzazione per COVID-19-19 nei neonati". *Nature Medicine* 29: 1155-1163.
- Magnus, M. C., A. K. Örtqvist, E. Dahlqvist, R. Ljung, F. Skår, L. Oakley, F. Macsali, B. Pasternak, H. K. Gjessing, S. E. e Stephansson, O. Håberg. 2022. "Associazione tra vaccinazione contro il SARS-CoV-2 durante la gravidanza ed esiti della gravidanza". *JAMA* 327 (15): 1469-1477.
- Mahaux, O., V. Bauchau e L V Holle. 2015. "Considerazioni farmacoepidemiologiche nelle analisi osservate/attese per i vaccini". *Pharmacoepidemiol Drug Safety* 25 (2): 215-222.
- McCaffrey, D. F., B. A. Griffin, D. Almirall, M. E. Slaughter, R. e Burgette, L. F. Ramchand. 2013. "Tutorial sulla stima del punteggio di propensione per trattamenti multipli utilizzando modelli generalizzati potenziati". *Stat Med.* 32 (19): 3388-3414 .
- Pfizer. 2023. *ClinicalTrials.gov: NCT04754594*. Biblioteca Nazionale di Medicina degli Stati Uniti. 13 luglio. <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04754594>.
- Prasad, S., E. Kalafat, H. Blakeway, R. Townsend, P. O'Brien, E. Morris, T. Draycott, et al. 2022. "Revisione sistematica e meta-analisi dell'efficacia e degli esiti perinatali della vaccinazione contro il COVID-19 in gravidanza." *Nature Communications* 13 (1): 2414.
- Renschmidt, C., O. Wichmann e T. Harder. 2015. "Frequenza e impatto della confondibilità dovuta all'indicazione e alla selezione dei soggetti sani nei vaccini in studi osservazionali che valutano l'efficacia del vaccino antinfluenzale: una revisione sistematica". *BMC Infectious Diseases* 15: 429.
- Riedmann, U., A. Chalupka, L. Richter, A. Chakeri, Z. El-Khatib, V. Theiler-Schwetz, C. Trummer, et al. 2024. "Efficacia di una quarta dose di vaccino SARS-CoV-2 in soggetti precedentemente infetti in Austria". *European Journal of Clinical Investigation* 54 (3): 00-00.
- Rimmer, M P, J J Teh, S C Mackenzie e B H Al Wattar. 2023. "Il rischio di aborto spontaneo dopo la vaccinazione contro il COVID-19: una revisione sistematica e una meta-analisi". *Human Reproduction* 840-52.
- Rottenstreich, M., H. M. Sela, R. Rotem, E. Kadish, Y. e Grisaru-Granovsky, S. Wiener-Well. 2022. "Vaccinazione contro il COVID-19 durante il terzo trimestre di gravidanza: tasso di vaccinazione ed esiti materni e neonatali, uno studio di coorte retrospettivo multicentrico". *BJOG* 129 (2): 248-255.

- Shimabukuro, T. T., M. Nguyen, D. e DeStefano, F. Martin. 2015. "Monitoraggio della sicurezza nel Sistema di segnalazione degli eventi avversi da vaccino (VAERS)". *Vaccine* 33 (36) : 4398–4405.
- Shimabukuro, T., S. Y. Kim, T. R. Myers, P. L. Moro, T. Oduyebo, L. Panagiotakopoulos, P. L. Marquez, et al. 2021. "Risultati preliminari sulla sicurezza del vaccino mRNA COVID-19-19 nelle donne in gravidanza." *New England Journal of Medicine* 2273-2282.
- Skowronski, D. M e Serres, S. D. 2009. "È giustificata la vaccinazione antinfluenzale di routine all'inizio della gravidanza?" *Vaccine* 27 (35): 4754-4770.
- STATA. 2024. "Analisi di sopravvivenza a tempo discreto". <https://www.stata.com/manuals13/stdiscrete.pdf>.
- Stuart, E. 2010. "Metodi di abbinamento per l'inferenza causale: una rassegna e uno sguardo al futuro." *Stat Sci.* 25 (1): 1-21.
- Suresh, K., C. Severn e D. Ghosh. 2022. "Modelli di previsione della sopravvivenza: un'introduzione alla modellizzazione a tempo discreto". *BMC Med Res Methodology* 27: 207.
- Velez, M. P., D. B. Fell, J. P. Shellenberger, J. C. e Ray, J. G. Kwong. 2023. "Aborto spontaneo dopo vaccinazione contro SARS-CoV-2: uno studio di coorte basato sulla popolazione." *BJOG* 00: 423.
- Vellozzi, C., K. R. Broder, Haber P., Guh A., Nguyen M., Cano M., Lewis P., et al. 2010. "Eventi avversi a seguito di vaccini monovalenti contro l'influenza A (H1N1) 2009 segnalati al Vaccine Adverse Event Reporting System, Stati Uniti, 1 ottobre 2009-31 gennaio 2010". *Vaccine* 28 (45): 7248-55.
- Wainstock, T., I. Yoles, R. e Sheine, E. Sergienko. 2021. "Vaccinazione prenatale materna contro il COVID-19 e esiti della gravidanza". *Vaccine* 39 (41): 6037-6040.
- Wolfe, D. M., D. Fell, C. Garritty, C. Hamel, C. Butler, M. Hersi, N. Ahmadzai, et al. 2023. "Sicurezza della vaccinazione antinfluenzale durante la gravidanza: una revisione sistematica". *Open BMJ* 13 (9): 00-00.
- Xu, S., R. Huang, L. S., Glenn, S. C. Sy, D. S. Ryan, K. Morrisette, D. K. Shay, G. Vazquez-Benitez, et al. 2021. "Vaccinazione e rischio di mortalità non correlato al COVID-19 — Sette organizzazioni sanitarie integrate, Stati Uniti, 14 dicembre 2020-31 luglio 2021 ." *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 70: 1520–1524.
- Zurlo, M., J. Gasparello, M. Verona, Papi. C., Cosenza L. C., A. Finotti, G. e Gambari, R. Marzaro. 2023. "Il vaccino anti-SARS-CoV-2 BNT162b2 sopprime la differenziazione eritroide indotta dalla mitramicina e l'espressione dei geni della globina embrionale-fetale nelle cellule K562 di eritroleucemia umana." *Exp Cell Res* 433(2): 113853.

Appendice supplementare

Perdite fetali osservate rispetto a quelle previste dopo la vaccinazione con mRNA COVID-19 in gravidanza precoce

Indice

Tabella S1. Definizioni delle variabili dipendenti e indipendenti per il modello di regressione di base nel periodo <i>di riferimento</i>	S
Sezione S1. Descrizione del modello di regressione di riferimento di base nel periodo <i>di riferimento</i>	S
Tabella S2. Regressione logistica aggregata di base della perdita fetale finale nel periodo <i>di riferimento</i>	S
Sezione S2. Formula per il calcolo dei valori attesi e degli intervalli di confidenza per l'analisi osservato/atteso analisi osservato/atteso	S
Figura S1. Diagramma che illustra l'approccio metodologico applicato alla coorte di donne vaccinate nelle settimane gestazionali 8-13	S6
Tabella S3. Caratteristiche delle donne in gravidanza nei periodi <i>di riferimento</i> , <i>di convalida</i> e <i>COVID-19</i>	S
Tabella S4. Perdite fetali effettive rispetto a quelle attese tra le donne vaccinate contro il COVID-19 con la seconda dose nelle settimane di gestazione 8-13 e 14-27	S
Figura S2. Perdite fetali effettive rispetto a quelle attese per settimana di gestazione al momento della vaccinazione tra le donne vaccinate contro il COVID-19 con la seconda o la terza dose	S9
Figura S3. Perdite fetali effettive rispetto a quelle attese per settimana di gestazione tra le donne vaccinate per COVID-19 con la terza dose prima della gravidanza	S
Tabella S5. Perdite fetali effettive rispetto a quelle attese tra le donne vaccinate contro l'influenza influenza nelle settimane gestazionali 8-13 e 14-27 nel periodo <i>di validazione</i>	S1
Figura S4. Perdite fetali effettive rispetto a quelle attese per settimana di gestazione tra le donne Vaccinate contro l'influenza prima della gravidanza nel periodo <i>di validazione</i>	S12
Tabella S6. Rapporti tra perdite fetali effettive e attese in tutte le coorti di donne vaccinate nelle settimane 8-13 e 14-27	S
Tabella S7. Distribuzione percentile della probabilità prevista di perdita fetale finale e valori medi delle covariate per le donne vaccinate contro l'influenza e il COVID-19 con la prima dose nelle settimane 8-13 e vaccinazione prima dell'ultimo ciclo mestruale (LMP) nel periodo <i>COVID-19</i>	S14
Tabella S8. Perdite fetali finali osservate rispetto a quelle previste tra le donne con infezioni da SARS-CoV-2 nelle settimane gestazionali 8-13 e 14-27 in base allo stato vaccinale	S15
Tabella S9. Dimensione delle coorti settimanali riportate nelle figure	S16
Sezione S4. Riepilogo dei tassi di vaccinazione e delle infezioni da SARS-CoV-2 nel periodo <i>COVID</i>	S17
Figura S5. Mese dell'ultimo ciclo mestruale per le donne che hanno ricevuto la prima dose del vaccino contro il COVID-19 nelle settimane gestazionali 8-13	

Tabella S1. Definizioni delle variabili dipendenti e indipendenti per il modello di regressione di base

VARIABILE	DEFINIZIONE	CODICI ICD-9 E CPT (SE APPLICABILI)
Perdita fetale	Tutte le diagnosi e i trattamenti che indicano la perdita fetale.	ICD-9: 69, 69.09, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 639, 640, 641, 656.4, 656.41, 656.43, 761.4, 779.6 CPT: 410000, 410200, 414200, 598400001 e 598400005
Età all'ultima mestruazione	Calcolata in base alla data di nascita della donna e alla data dell'ultima mestruazione (ricordata o stimata).	N/A
Stato socioeconomico	Misura composita dell'Ufficio centrale di statistica israeliano basata su: reddito familiare, titolo di studio, sovraffollamento abitativo e possesso di un'auto. È misurato su una scala da 1 a 10.	N/A
Prima gravidanza (primigravida)	Variabile indicatrice se la donna non ha avuto precedenti gravidanze precedenti registrate nel registro delle gravidanze.	N/A
Qualsiasi vaccinazione antinfluenzale nelle ultime 3 stagioni	Sulla base delle cartelle cliniche relative alla vaccinazione antinfluenzale nelle due stagioni influenzali precedenti alla data dell'ultima mestruazione.	CPT: 10200, 906560001, 9079200, 906600001, 9079100, 9065600004, 906600000, 9072900, 9077900, 906560002, 9072400, 9072500
Alto rischio gravidanza	Indica la settimana di gravidanza in cui una gravidanza è stata classificata per la prima volta come gravidanza ad alto rischio.	V23
Comorbidità preesistenti	L'indice delle comorbidità è il numero totale di diagnosi che le donne avevano ricevuto prima della data dell'ultima mestruazione correlate ai seguenti disturbi e malattie: sindrome da antifosfolipidi, artrite, disturbi cardiaci, diabete, disturbi epatobiliari, ipertensione, infezioni, lupus eritematoso, neoplasie maligne, disturbi neurologici, disturbi renali/urinari e disturbi tiroidei.	<u>Sindrome da antifosfolipidi</u> : 286,9 <u>Artrite</u> : 714, 715, 719 <u>Cardio</u> : 414, 425, 427 <u>Diabete</u> : 250, 648-648.03 <u>Epatobiliare</u> : 51, 571, 574.2 <u>Iipertensione</u> : 401, 642 <u>Infezioni</u> : 52, 54.1, 78.11, 79.4, 112, 127.4, 131 <u>Lupus eritematoso</u> : 695.4, 710 <u>Neoplasie maligne</u> : 140, 165.99, 170-209 <u>Neurologiche</u> : 333, 345, 350, 353, 354, 356, 386, 649.4, 722, 729.2, 723.4, 780.4, 780.5, 780.9, 782 <u>Rene/Urina</u> : 96.49, 590, 592, 595, 788.0, 788.3 <u>Tiroide</u> : 193, 226, 242-246, 376.2, 376.21, 376.22, 648.1, 794.5
Ricorrenti perdita di gravidanza	Indicatore di qualsiasi diagnosi indicativa di aborto ricorrente prima della data dell'ultima mestruazione.	629.81, 629.89, 629.9, 646.3, 646.31, 646.33
Infertilità/disturbi mestruali/disturbi dell'apparato riproduttivo organi riproduttivi	Indicatore per qualsiasi diagnosi correlata a infertilità, disturbi mestruali o disturbi degli organi riproduttivi prima della data dell'ultima mestruazione.	65, 67, 69, 70.22, 71, 218, 614, 616, 620, 621, 622, 623, 752, 626.1, 626.2, 626.4, 626.6, 628, 654.0-654.13, 654.4-654.94
Disturbi psichiatrici/disturbi comportamentali	Indicatore per qualsiasi diagnosi correlata a disturbi psichiatrici o comportamentali prima della data dell'ultima mestruazione.	293, 295, 296, 298, 300, 301, 302, 307.1-307.51, 308, 309, 311, 312, 313, 314, 315, V40, V61, V62
Obesità	Indicatore di qualsiasi diagnosi correlata all'obesità prima della data dell'ultima mestruazione.	43, 44, 278, 649.1-649.14
Fumo	Indicatore di qualsiasi diagnosi correlata al fumo prima della data dell'ultima mestruazione.	305.1-305.13, 649.0-649.04, V15.82, V65.42
Note. Le colonne elencano i nomi delle variabili, le definizioni e i codici ICD-9 e CPT corrispondenti, ove applicabile. Quando sono elencati codici ICD a 3 cifre, sono inclusi tutti i sottocodici. Maccabi ha sviluppato alcuni codici CPT specializzati per differenziare procedure specifiche; in questi casi le prime 5 cifre corrispondono al codice CPT standard.		

Sezione S1. Descrizione del modello di regressione di riferimento di base nel periodo *di riferimento*

Il modello di riferimento di base utilizzato per stimare la probabilità condizionata dipendente dal tempo di perdita fetale finale è una regressione logistica aggregata che include un'osservazione per ogni donna e settimana di gravidanza (R. D'Agostino, et al. 1990). Poiché questo studio riguarda un esito clinico binario non censurato (perdita fetale o nascita viva) e non il tempo di insorgenza dell'evento, un modello di regressione logistica è una scelta di modellizzazione naturale (Hu e Tong 2021). Il modello è stato addestrato su tutte le gravidanze nel periodo *di riferimento* (1° marzo 2016 - 28 febbraio 2018) sopravvissute all'inizio della settimana gestazionale 8, con esito della nascita documentato e informazioni complete sulle covariate. Le gravidanze terminate prima dell'inizio della settimana 8 sono state escluse, poiché un numero significativo di esse termina senza una documentazione adeguata e coerente, che è una fonte nota di distorsione nella stima dei tassi di aborto spontaneo (Howards e Hertz-Picciotto 2007). Per ogni gravidanza, è prevista un'osservazione per ogni settimana gestazionale compresa tra l'8^a e la 27^a (cioè fino alla fine del 2° trimestre), a condizione che la gravidanza fosse in corso all'inizio di quella settimana. L'unità di analisi è la settimana di gravidanza. La variabile dipendente (esito) per ogni osservazione è pari a 1 se la perdita fetale si è verificata in qualsiasi momento dall'inizio della rispettiva settimana gestazionale e 0 in caso contrario. Le variabili indipendenti del modello di riferimento di base includono la settimana di gestazione, il mese di calendario dell'ultimo ciclo mestruale, l'età materna, lo stato socioeconomico, lo stato di primigravida, un conteggio aggregato (0, 1-3 e 4 o più) delle comorbidità mediche con potenziale impatto sul risultato dello studio, il settore sociale, il distretto di residenza, i comportamenti relativi alla salute (ad esempio, fumo e vaccinazione antinfluenzale nelle due stagioni precedenti la gravidanza indice) e un indicatore che indica se la gravidanza era considerata ad alto rischio, pari a 1 a partire dalla settimana in cui la gravidanza era stata considerata ad alto rischio. Le comorbidità incluse nel modello sono state selezionate se apparivano con una frequenza significativamente più elevata tra le donne che avevano subito una perdita fetale rispetto alle donne che avevano avuto un parto vivo. Vedere la tabella S1 per le definizioni delle covariate. Gli intervalli di confidenza sono stati corretti per tenere conto delle osservazioni multiple di una singola gravidanza nel corso delle settimane utilizzando l'aggiustamento di Liang-Zeger (Liang e Zeger 1986, Abadie, Athey e Imbens 2023).

Tabella S2. Regressione logistica aggregata di base della perdita fetale finale nel periodo *di riferimento* (1 marzo 2016 - 28 febbraio 2018)

Coefficients	Odds Ratio	95% Confidence Interval
Age at last menstruation	1.084	1.079 - 1.090
Socio-economic status	0.951	0.938 - 0.964
First pregnancy (primigravida) indicator	2.088	1.969 - 2.214
Any influenza vaccination last 3 seasons	1.078	1.011 - 1.150
High risk pregnancy (first two trimesters)	2.212	1.784 - 2.743
Diagnoses prior to pregnancy		
0 pre-existing comorbidities (reference category)	1.000	1.000 - 1.000
1 - 3 pre-existing comorbidities	1.144	1.076 - 1.216
4+ pre-existing comorbidities	1.223	1.070 - 1.397
Recurrent pregnancy loss	1.718	1.442 - 2.046
Infertility/menstrual/reproductive organ disorders	1.207	1.137 - 1.281
Psychiatric/behavioral disorders	1.118	1.055 - 1.184
Obesity	1.056	0.987 - 1.129
Smoking	1.053	0.980 - 1.132
District of residency		
North	0.855	0.780 - 0.937
Sharon	1.017	0.938 - 1.102
South	1.087	0.997 - 1.185
Jerusalem	0.916	0.847 - 0.990
Center (reference category)	1.000	1.000 - 1.000
Ethno-religious sector		
Arab	0.866	0.757 - 0.991
Orthodox	0.854	0.753 - 0.969
Ultra Orthodox	0.778	0.699 - 0.866
Other (reference category)	1.000	1.000 - 1.000

Tabella S2 (continua). Regressione logistica aggregata di base della perdita fetale finale nel periodo *di riferimento*

Coefficients	Odds Ratio	95% Confidence Interval
Gestational week		
8 (reference category)	1.000	1.000 - 1.000
9	0.856	0.850 - 0.862
10	0.686	0.678 - 0.694
11	0.533	0.524 - 0.541
12	0.423	0.414 - 0.431
13	0.337	0.329 - 0.345
14	0.275	0.267 - 0.283
15	0.232	0.225 - 0.240
16	0.205	0.198 - 0.212
17	0.181	0.174 - 0.187
18	0.160	0.154 - 0.166
19	0.143	0.137 - 0.149
20	0.117	0.112 - 0.123
21	0.111	0.105 - 0.116
22	0.099	0.094 - 0.105
23	0.089	0.084 - 0.094
24	0.081	0.077 - 0.086
25	0.075	0.070 - 0.080
26	0.069	0.064 - 0.073
27	0.063	0.059 - 0.067
Calendar month		
January	1.014	0.896 - 1.149
February	0.981	0.864 - 1.115
March (reference category)	1.000	1.000 - 1.000
April	1.001	0.882 - 1.135
May	1.053	0.930 - 1.193
June	1.087	0.959 - 1.231
July	1.080	0.953 - 1.224
August	1.105	0.976 - 1.252
September	1.061	0.936 - 1.202
October	0.982	0.867 - 1.111
November	1.101	0.973 - 1.245
December	1.025	0.907 - 1.159
Constant	0.011	0.009 - 0.013
N =1,561,906		

Sezione S2. Formula per il calcolo dei valori attesi e degli intervalli di confidenza per il tasso di perdita fetale finale

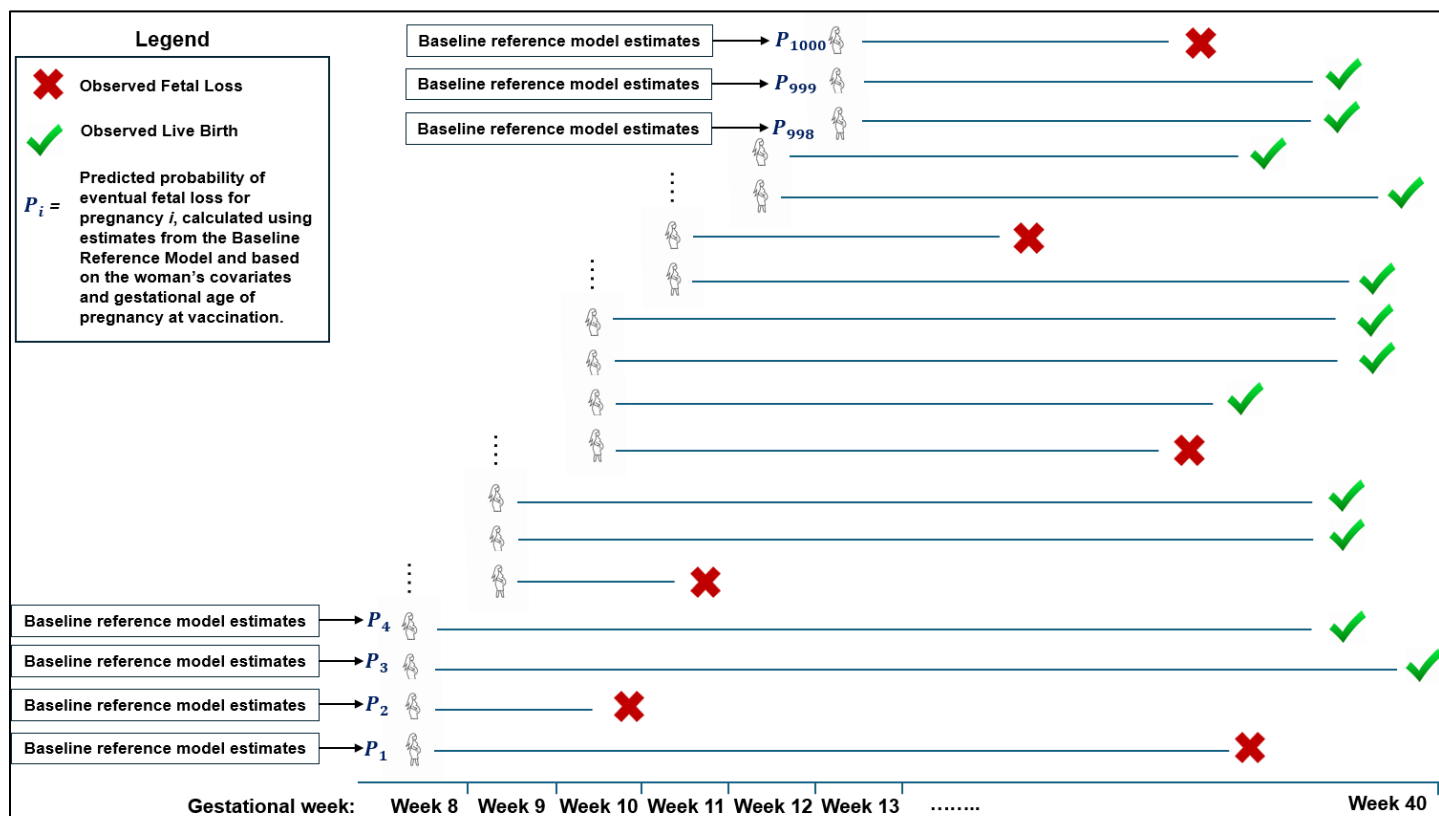
Le stime del modello di regressione di riferimento di base sono utilizzate per ottenere la probabilità di rischio di perdita fetale finale per ogni settimana di gestazione per ciascuna gravidanza inclusa nella coorte. La probabilità è stimata in modo prospettico considerando la settimana di gestazione della gravidanza, che è in genere la settimana della vaccinazione o una settimana successiva (supponendo che la gravidanza fosse in corso all'inizio di quella settimana), nonché il mese di calendario dell'ultimo ciclo mestruale e altre covariate nel modello di base. Per ottenere il numero previsto di perdite fetali specifico per la coorte, si sommano le probabilità di rischio individuali. Cioè, se ci sono N gravidanze nella coorte, il tasso atteso specifico per la coorte è $\sum_{i=1}^N P_i$, dove P_i indica il probabilità di rischio prevista di eventuale perdita fetale in gravidanza i . Il numero previsto di perdite fetali è normalizzato al numero di perdite fetali ogni 100 gravidanze, ovvero $\frac{100}{N} \sum_{i=1}^N P_i$.

Per calcolare gli IC, ipotizziamo che il numero di aborti specifici della coorte sia la somma di variabili di Bernoulli indipendenti, ciascuna corrispondente a una gravidanza specifica, con probabilità P_i pari a 1 (cioè con una perdita fetale). È sufficiente calcolare un IC per $\sum_{i=1}^N P_i$. Dal

supponendo che il numero di aborti spontanei sia la somma di variabili indipendenti di Bernoulli, ne consegue che che la varianza è uguale a $\frac{1}{N^2} \sum_{i=1}^N P_i(1-P_i)$, e utilizzando il Teorema del Limite Centrale di Lyapunov, l'intervallo di confidenza è:

$$C.I. = \frac{\sum_{i=1}^N P_i}{N} \pm 1.96 * \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N P_i(1-P_i)}{N}}$$

Figura S1. Diagramma che illustra l'approccio metodologico applicato alla coorte di donne vaccinate nelle settimane gestazionali 8-13



Nota: la figura S1 mostra un esempio illustrativo di una coorte di 1000 gravidanze con esposizione alla vaccinazione durante le settimane 8-13.

- Il modello di riferimento di base viene utilizzato per stimare la probabilità di perdita fetale finale di ciascuna gravidanza sulla base dei valori delle covariate di ciascuna donna incinta e della settimana gestazionale della vaccinazione. (vedere la Tabella S2 nell'Appendice supplementare per l'elenco completo delle covariate e i risultati del modello).
- Il tasso di perdita fetale atteso specifico per la coorte viene calcolato sommando le probabilità previste $P_1, \dots, P_{(1000)}$, che vengono poi confrontate con il numero osservato di perdite fetali tra le donne della coorte.

Tabella S3. Caratteristiche delle donne in gravidanza nei periodi di riferimento, di validazione e COVID-19

Characteristics	Reference Period		Validation Period		COVID-19 Period	
	Mean	95% CI	Mean	95% CI	Mean	95% CI
Age at last menstruation	30.31	30.27 - 30.35	30.23	30.17 - 30.28	30.40	30.19 - 30.27
Socio-economic status	5.71	5.69 - 5.73	5.55	5.52 - 5.57	5.52	5.46 - 5.50
	%		%		%	
First pregnancy (primigravida) indicator	40.43	40.08 - 40.78	38.55	38.09 - 39.01	41.40	41.07 - 41.74
Any influenza vaccination last 3 seasons	21.67	21.38 - 21.96	23.85	23.45 - 24.26	27.55	27.25 - 27.85
High risk pregnancy (first two trimesters)	0.14	0.11 - 0.17	0.12	0.09 - 0.16	0.13	0.11 - 0.16
Diagnoses prior to pregnancy						
1 - 3 pre-existing comorbidities	55.98	55.63 - 56.33	57.33	56.86 - 57.79	59.15	58.81 - 59.48
4+ pre-existing comorbidities	3.46	3.33 - 3.59	3.44	3.26 - 3.61	3.41	3.28 - 3.53
Recurrent pregnancy loss	1.19	1.11 - 1.27	1.52	1.40 - 1.63	1.39	1.31 - 1.47
Infertility/menstrual/reproductive organ disorders	51.95	51.60 - 52.31	52.95	52.48 - 53.43	53.04	52.70 - 53.38
Psychiatric/behavioral disorders	30.22	29.90 - 30.55	31.94	31.49 - 32.38	34.46	34.14 - 34.78
Obesity	17.51	17.24 - 17.78	18.69	18.32 - 19.06	19.40	19.13 - 19.67
Smoking	14.06	13.81 - 14.30	13.51	13.19 - 13.84	12.68	12.45 - 12.90
District of residency						
North	15.18	14.93 - 15.44	14.87	14.53 - 15.20	14.51	14.28 - 14.75
Sharon	20.59	20.30 - 20.87	20.16	19.78 - 20.54	19.23	18.96 - 19.49
South	16.88	16.61 - 17.14	16.43	16.08 - 16.78	16.16	15.91 - 16.41
Jerusalem	24.66	24.35 - 24.96	24.77	24.36 - 25.18	25.70	25.40 - 26.00
Center	22.70	22.40 - 22.99	23.76	23.36 - 24.17	24.40	24.11 - 24.69
Ethno-religious sector						
Arab	6.06	5.89 - 6.23	6.40	6.17 - 6.63	6.74	6.57 - 6.91
Orthodox	5.16	5.00 - 5.31	5.29	5.08 - 5.50	5.46	5.31 - 5.61
Ultra Orthodox	16.99	16.72 - 17.25	19.19	18.82 - 19.56	19.65	19.38 - 19.92
Other	71.80	71.48 - 72.12	69.12	68.68 - 69.56	68.15	67.84 - 68.47

Nota: il periodo di riferimento include le donne con LMP dal 1° marzo 2016 al 28 febbraio 2018; il periodo di convalida include le donne con LMP dal 1° marzo 2018 al 28 febbraio 2019; e il periodo COVID-19 include le donne con LMP dal 1° marzo 2020 al 28 febbraio 2022.

Tabella S4. Perdite fetali effettive rispetto a quelle attese tra le donne vaccinate contro il COVID-19 con la seconda dose nelle settimane gestazionali 8-13 e 14-27

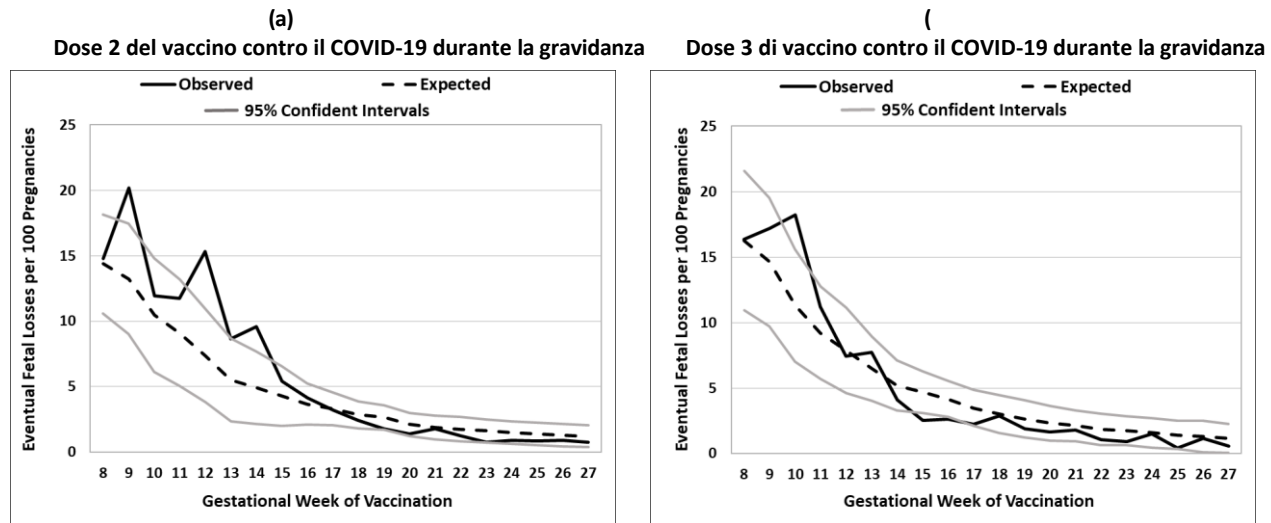
Cohort	Observed Fetal Losses per 100 Pregnancies (n)	Expected Fetal Losses per 100 Pregnancies ^a (n)	Observed-to- Expected Difference per 100 Pregnancies (n)	95% C.I. Observed-to- Expected Difference per 100 Pregnancies	Cohort Size N
<u>Dose 2</u>^b					
During weeks 8-13	14.11 (187)	10.51 (139)	3.61 (48)	[1.99 - 5.22]	1 325
During weeks 14-27	1.95 (200)	2.25 (231)	-0.30 (-31)	[-0.59 - -0.02]	10 266

Note: La tabella S4 mostra le perdite fetali osservate rispetto a quelle attese (per 100 gravidanze) tra le donne in gravidanza con LMP dal 1° marzo 2020 al 28 febbraio 2022 vaccinate per COVID-19 con la dose 2. I numeri (n) tra parentesi riportano il numero totale corrispondente di perdite fetali (osservate/attese) nella coorte.

a. Il numero di aborti fetali previsti è stato ottenuto sommando le probabilità previste di aborto fetale delle donne vaccinate in ciascuna settimana di gestazione, che sono state stimate per ciascuna donna dal modello di riferimento di base, in base ai valori delle covariate e alla settimana di gestazione al momento della vaccinazione (vedere la Tabella S2 nell'Appendice supplementare per l'elenco completo delle covariate e i risultati del modello).

b. Tra le donne vaccinate con la seconda dose durante le settimane 8-13 e 14-27, il 97% e il 96% hanno ricevuto BNT162b2.

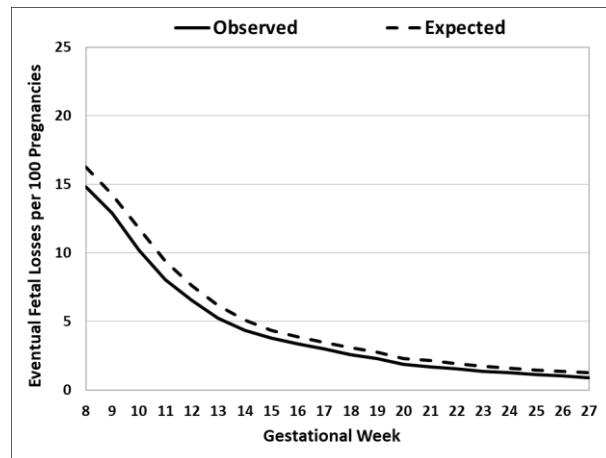
Figura S2. Perdite fetali effettive rispetto a quelle previste per settimana di gestazione al momento della vaccinazione tra le donne vaccinate contro il COVID-19 con la dose 2 o la dose 3



Note

- Il pannello (a) mostra i risultati per le donne che hanno ricevuto la seconda dose di vaccino anti COVID-19 in gravidanza durante la rispettiva settimana gestazionale indicata sull'asse X; il pannello (b) mostra i risultati per le donne che hanno ricevuto la terza dose di vaccino anti COVID-19 durante la rispettiva settimana gestazionale. Le dimensioni delle coorti per ciascuna settimana gestazionale sono riportate nella Tabella S9 nell'Appendice supplementare.
- Per ciascun pannello, l'asse Y indica il numero osservato (linea nera continua) e previsto (linea nera tratteggiata) di perdite fetali finali (per 100 gravidanze) tra le donne con LMP dal 1° marzo 2020 al 28 febbraio 2022 che sono state vaccinate nella settimana di gestazione indicata sull'asse X. Le linee grigie continue mostrano l'intervallo di confidenza al 95% delle perdite fetali attese per 100 gravidanze in ciascuna settimana. Vedere la sezione S2 nell'appendice supplementare per una descrizione di come sono stati calcolati gli IC.
- Il numero di aborti fetali previsti è stato ottenuto sommando le probabilità previste di aborto fetale delle donne vaccinate in ciascuna settimana di gestazione, stimate dal modello di riferimento di base per ciascuna donna, in base ai valori delle covariate e alla settimana di gestazione al momento della vaccinazione (vedere la tabella S2 nell'appendice supplementare per l'elenco completo delle covariate e i risultati del modello).

Figura S3. Perdite fetali finali osservate rispetto a quelle previste per settimana di gestazione tra le donne vaccinate per COVID-19 con la terza dose prima della gravidanza



Note:

- La figura S3 mostra i risultati relativi alle donne che hanno ricevuto 3 dosi di vaccino anti COVID-19 prima dell'ultimo ciclo mestruale (LMP) e la cui gravidanza era in corso all'inizio della rispettiva settimana gestazionale indicata sull'asse X. Le dimensioni delle coorti per ciascuna settimana sono riportate nella tabella S9 nell'appendice supplementare.
- L'asse Y indica il numero effettivo (linea nera continua) e previsto (linea nera tratteggiata) di aborti per 100 gravidanze tra le donne con LMP dal 1° marzo 2020 al 28 febbraio 2022 che erano ancora in gravidanza all'inizio di ciascuna settimana gestazionale (8-27) indicata sull'asse X.
- Il numero di perdite fetali attese è stato ottenuto sommando le probabilità previste di perdita fetale delle donne in ciascuna coorte, stimate dal modello di riferimento di base per ciascuna donna, in base ai valori delle covariate e alla rispettiva settimana di gestazione indicata sull'asse X (vedere la tabella S2 nell'appendice supplementare per l'elenco completo delle covariate e i risultati del modello). Le donne che hanno subito una perdita fetale prima della rispettiva settimana di gestazione sull'asse X non sono state incluse nel calcolo.

Tabella S5. Perdite fetali finali osservate rispetto a quelle previste tra le donne vaccinate contro l'influenza nelle settimane gestazionali 8-13 e 14-27 nel periodo *di validazione* (LMP dal 1° marzo 2018 al 28 febbraio 2019)

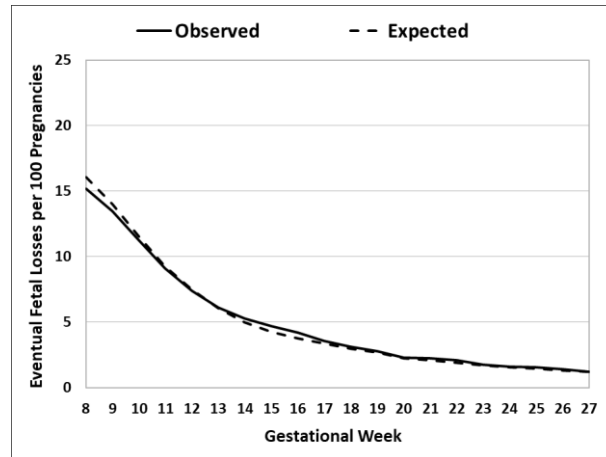
Cohort	Observed Fetal Losses per 100 Pregnancies (n)	Expected Fetal Losses per 100 Pregnancies ^a (n)	Observed-to- Expected Difference per 100 Pregnancies (n)	95% C.I. Observed-to- Expected Difference per 100 Pregnancies	Cohort Size N
<u>Influenza Vaccination</u>					
During weeks 8-13	6.55 (111)	10.98 (186)	-4.42 (-75)	[-5.88 - -2.97]	1 694
During weeks 14-27	1.09 (48)	2.53 (111)	-1.44 (-63)	[-1.90 - -0.98]	4 397

Note: La tabella S5 mostra le perdite fetali osservate rispetto a quelle attese (per 100 gravidanze) tra le donne nel periodo di validazione (LMP dal 1° marzo 2018 al 28 febbraio 2019) vaccinate contro l'influenza. I numeri (n) tra parentesi riportano il numero totale corrispondente di perdite fetali (osservate/attese) nella coorte.

a. Il numero di perdite fetali previste è stato ottenuto sommando le probabilità previste di perdita fetale finale delle donne in ciascuna coorte, stimate dal modello di riferimento di base per ciascuna donna, sulla base dei valori delle covariate e della settimana di gestazione in cui è stata vaccinata (vedere la tabella S2 nell'appendice supplementare per l'elenco completo delle covariate e i risultati del modello).

Figura S4. Perdite fetali finali osservate rispetto a quelle previste per settimana di gestazione tra le donne vaccinate contro l'influenza prima della gravidanza con LMP nel periodo *di validazione* (LMP dal 1° marzo 2018 al 28 febbraio 2019)

Vaccino antinfluenzale stagionale prima della gravidanza



Note

- La figura S4 mostra i risultati relativi alle donne che si sono vaccinate contro l'influenza nella stessa stagione influenzale prima dell'LMP e la cui gravidanza era in corso all'inizio della settimana indicata sull'asse X. Le dimensioni delle coorti per ciascuna settimana sono riportate nella tabella S9 nell'appendice supplementare.
- L'asse Y indica il numero effettivo (linea nera continua) e previsto (linea nera tratteggiata) di aborti spontanei ogni 100 gravidanze tra le donne nel periodo *di validazione* (LMP dal 1° marzo 2018 al 28 febbraio 2019) che erano ancora in gravidanza all'inizio di ciascuna settimana gestazionale (8-27) indicata sull'asse X.
- Il numero di perdite fetali attese è stato ottenuto sommando le probabilità previste di perdita fetale delle donne in ciascuna coorte, stimate dal modello di riferimento di base per ciascuna donna, in base ai valori delle covariate e alla rispettiva settimana di gestazione indicata sull'asse X (vedere la tabella S2 nell'appendice supplementare per l'elenco completo delle covariate e i risultati del modello). Le donne che hanno subito una perdita fetale prima della rispettiva settimana di gestazione sull'asse X non sono state incluse nel calcolo.

Tabella S6. Rapporti tra perdite fetali effettive e previste in tutte le coorti di donne vaccinate nelle settimane 8-13 e 14-27

Cohort	Ratio of Observed-to-Expected per 100 Pregnancies^a	95% C.I. of Ratio of Observed-to-Expected per 100 Pregnancies	Cohort Size N
<i>COVID-19 Dose 1^b</i>			
During weeks 8-13	1.42	[1.24 - 1.65]	1 837
During weeks 14-27	0.69	[0.62 - 0.77]	12 274
<i>COVID-19 Dose 2^c</i>			
During weeks 8-13	1.34	[1.16 - 1.59]	1 325
During weeks 14-27	0.87	[0.77 - 0.99]	10 266
<i>COVID-19 Dose 3^b</i>			
During weeks 8-13	1.19	[1.03 - 1.40]	1 454
During weeks 14-27	0.69	[0.61 - 0.80]	7 546
<i>Influenza Vaccine^b</i>			
During weeks 8-13	0.55	[0.50 - 0.60]	4 048
During weeks 14-27	0.50	[0.45 - 0.57]	9 586
<i>LATE FETAL LOSSES^d</i>			
<i>COVID-19 Dose 1</i>			
From week 14	1.64	[1.36 - 2.07]	1 733
From week 20	2.16	[1.63 - 3.19]	1 674
From week 25	2.22	[1.58 - 3.75]	1 646
<i>COVID-19 Dose 3</i>			
From week 14	1.53	[1.25 - 1.97]	1 389
From week 20	1.66	[1.23 - 2.54]	1 330
From week 25	1.64	[1.14 - 2.94]	1 311
<i>Influenza Vaccine</i>			
From week 14	0.57	[0.50 - 0.66]	3 918
From week 20	0.06	[0.51 - 0.77]	3 856
From week 25	0.05	[0.40 - 0.66]	3 828

Nota: la tabella S6 mostra i rapporti tra il numero di perdite fetali effettive e previsto per 100 gravidanze incluse in questo studio.

a. Il numero di perdite fetali attese è stato ottenuto sommando le probabilità previste di perdita fetale finale delle donne in ciascuna coorte, stimate dal modello di riferimento di base per ciascuna donna, sulla base dei valori delle covariate e della settimana di gestazione in cui è stata vaccinata (vedere la tabella S2 nell'appendice supplementare per l'elenco completo delle covariate e i risultati del modello).

b. Sulla base dei risultati presentati nella Tabella 1.

c. Sulla base dei risultati presentati nella Tabella S4.

d. Sulla base dei risultati presentati nella Tabella 2.

Tabella S7. Distribuzione percentile della probabilità prevista di perdita fetale finale e valori medi delle covariate per le donne vaccinate contro l'influenza e il COVID-19 con la prima dose nelle settimane 8-13 e vaccinazione prima dell'LMP nel periodo COVID-19

Predicted Probability Percentiles	Weeks 8-13 Vaccination Cohorts		Vaccination Before LMP Cohorts		
	Influenza	Dose 1	Influenza	Dose 2	Dose 3
5th percentile	7.31	6.12	7.04	6.57	6.93
25th percentile	11.43	9.95	11.04	10.30	10.84
50th percentile	15.02	13.85	14.89	14.17	14.70
75th percentile	19.82	18.75	20.09	19.32	19.94
95th percentile	30.21	28.32	31.51	30.17	31.09
N	4048	1837	12544	34452	11970
Covariates	Mean/Percent 95% CI	Mean/Percent 95% CI	Mean/Percent 95% CI	Mean/Percent 95% CI	Mean/Percent 95% CI
Age at last menstruation	30.94 30.78 - 31.10	30.82 30.78 - 31.10	32.01 31.92 - 32.10	30.92 30.86 - 30.98	31.43 31.33 - 31.53
Socio-economic status	6.68 6.60 - 6.754	5.84 6.60 - 6.75	6.56 6.51 - 6.601	5.97 5.94 - 5.99	5.84 6.25 - 6.35
First pregnancy (primigravida) indicator	43.65 42.12 - 45.18	34.35 32.18 - 36.52	25.23 24.47 - 25.99	39.02 38.51 - 39.54	41.65 41.13 - 42.17
Any influenza vaccination last 3 seasons	49.68 48.14 - 51.22	39.52 37.29 - 41.76	100 100 - 100	32.32 31.82 - 32.81	30.18 29.35 - 31.00
High risk pregnancy (first two trimesters)	0.35	0.22	0.22	0.14	0.13
<u>Diagnoses prior to pregnancy</u>	0.17 - 0.53	0.00 - 0.43	0.13 - 0.30	0.10 - 0.18	0.10 - 0.17
1 - 3 pre-existing comorbidities	63.51 62.03 - 65.00	60.10 57.86 - 62.34	65.43 64.60 - 66.27	61.84 61.33 - 62.35	62.79 62.28 - 63.30
4+ pre-existing comorbidities	4.27 3.65 - 4.90	3.43 2.60 - 4.26	5.65 5.25 - 6.06	3.89 3.68 - 4.09	4.16 3.95 - 4.37
Recurrent pregnancy loss	1.78 1.37 - 2.19	1.80 1.19 - 2.40	2.22 1.97 - 2.48	1.83 1.69 - 1.98	1.84 1.70 - 1.98
Infertility/menstrual/reproductive organ disorders	59.19 57.68 - 60.70	56.23 53.96 - 58.50	63.59 62.75 - 64.43	56.75 56.22 - 57.27	57.42 56.90 - 57.94
Psychiatric/behavioral disorders	40.22 38.71 - 41.73	34.13 31.96 - 36.30	42.20 41.34 - 43.07	37.24 36.73 - 37.75	38.73 38.22 - 39.24
Obesity	20.65 19.41 - 21.90	20.36 18.52 - 22.20	23.46 22.72 - 24.20	20.56 20.13 - 20.98	21.65 21.21 - 22.08
Smoking	12.87	13.01	13.66	13.45	13.66
<u>District of residency</u>	11.84 - 13.90	11.47 - 14.55	13.06 - 14.26	13.09 - 13.81	13.30 - 14.02
North	13.34 12.29 - 14.39	12.85 11.32 - 14.38	13.82 13.22 - 14.42	14.35 13.98 - 14.72	13.74 13.38 - 14.10
Sharon	22.55 21.26 - 23.84	18.62 16.84 - 20.40	23.98 23.23 - 24.73	20.86 20.43 - 21.29	21.72 21.28 - 22.16
South	15.14 14.04 - 16.24	15.73 14.07 - 17.39	15.55 14.92 - 16.18	15.64 15.26 - 16.02	15.05 14.67 - 15.43
Jerusalem	23.34 22.04 - 24.64	26.29 24.28 - 28.30	23.27 22.53 - 24.01	24.74 24.28 - 25.20	24.32 23.87 - 24.77
Center	25.62	26.51	23.38	24.41	25.16
<u>Ethno-religious sector</u>	24.28 - 26.96	24.49 - 28.53	22.64 - 24.12	23.96 - 24.86	24.70 - 25.62
Arab	3.26 2.71 - 3.81	4.25 3.33 - 5.17	3.43 3.11 - 3.75	5.78 5.53 - 6.03	4.29 4.08 - 4.50
Orthodox	5.24 4.55 - 5.93	6.10 5.01 - 7.19	5.68 5.27 - 6.09	5.80 5.55 - 6.05	6.24 5.98 - 6.50
Ultra Orthodox	9.29 8.40 - 10.18	18.18 16.42 - 19.94	10.04 9.51 - 10.57	13.94 13.57 - 14.31	10.96 10.63 - 11.29
Other/Unknown	82.21 81.03 - 83.39	71.48 69.42 - 73.54	80.85 80.16 - 81.54	74.48 74.02 - 74.94	78.51 78.08 - 78.94

Note: Il pannello superiore confronta i percentili della probabilità prevista di perdita fetale finale in coorti di donne che hanno ricevuto il vaccino antinfluenzale o la prima dose del vaccino anti COVID-19 tra l'ottava e la tredicesima settimana di gestazione o donne vaccinate prima della gravidanza con 2 o 3 dosi di vaccino anti COVID-19 o con il vaccino antinfluenzale nella stessa stagione dell'ultimo ciclo mestruale (LMP). Tutti i calcoli sono effettuati a partire dall'ottava settimana di gestazione. Il pannello inferiore confronta i valori delle covariate utilizzate nel modello di riferimento di base tra le coorti. Tutti i risultati si riferiscono a donne con LMP compresa tra il 1° marzo 2020 e il 28 febbraio 2022.

Tabella S8. Perdite fetali effettive rispetto a quelle attese tra le donne con infezione da SARS-CoV-2 nelle settimane gestazionali 8-13 e 14-27 in base allo stato vaccinale

Cohort	Observed Fetal Losses per 100 Pregnancies (n)	Expected Fetal Losses per 100 Pregnancies ^a (n)	Observed-to- Expected Difference per 100 Pregnancies (n)	95% C.I. Observed-to- Expected Difference per 100 Pregnancies	Cohort Size N
<i>Infection among Unvaccinated^b</i>					
During weeks 8-13	8.36 (68)	9.07 (74)	-0.70 (-6)	[-2.65 - 1.22]	813
During weeks 14-27	1.66 (29)	2.17 (38)	-0.51 (-9)	[-1.19 - 0.16]	1 743
<i>Infection among Vaccinated^b</i>					
During weeks 8-13	11.57 (223)	10.93 (211)	0.64 (12)	[-0.72 - 2.00]	1 928
During weeks 14-27	2.09 (96)	2.52 (116)	-0.43 (-20)	[-0.88 - 0.02]	4 589

Note: La tabella S8 mostra le perdite fetali osservate rispetto a quelle attese (per 100 gravidanze) per le donne con infezione da SARS-CoV-2 documentata con LMP dal 1° marzo 2020 al 28 febbraio 2022. I numeri (n) tra parentesi riportano il numero totale corrispondente di perdite fetali (osservate/attese) nella coorte.

a. Il numero di perdite fetali previste è stato ottenuto sommando le probabilità previste di perdita fetale finale delle donne in ciascuna coorte, stimate dal modello di riferimento di base per ciascuna donna, sulla base dei valori delle covariate e della settimana di gestazione in cui è stata infettata (vedere la tabella S2 nell'appendice supplementare per l'elenco completo delle covariate e i risultati del modello).

b. Il pannello superiore mostra i risultati per le donne infettate nel rispettivo trimestre che non avevano ricevuto alcuna dose di vaccino COVID-19 prima dell'infezione, mentre il pannello inferiore mostra i risultati per le donne che avevano ricevuto almeno una dose di vaccino COVID-19 prima dell'infezione. Le infezioni sono state documentate con PCR o (a partire dall'inizio del 2022) con test a flusso laterale.

Tabella S9. Dimensione delle coorti settimanali mostrate nelle figure

	COVID-19 Dose 1 During Pregnancy (Fig. 2a)	COVID-19 Dose 2 During Pregnancy (Fig. S2a)	COVID-19 Dose 3 During Pregnancy (Fig. S2b)	COVID-19 Doses 1 & 2 Before Pregnancy (Fig. 3a)	COVID-19 Doses 1-3 Before Pregnancy (Fig. S3)	Influenza During Pregnancy (Fig. 2b)	Influenza Before Pregnancy (Fig. 3b)	Validation Period - Influenza Before Pregnancy (Fig. S4)
Week								
8	211	318	177	31686	11970	621	12544	4127
9	239	238	192	30844	11359	736	12282	4047
10	227	184	203	29768	11093	706	11950	3945
11	240	187	250	28843	10915	700	11653	3851
12	315	202	256	28119	10765	621	11471	3780
13	605	196	376	27379	10664	664	11327	3729
14	845	230	510	26623	10601	681	11224	3697
15	1135	296	668	25787	10553	668	11161	3673
16	1229	557	800	24867	10512	644	11106	3655
17	1160	777	666	24089	10471	721	11061	3631
18	949	997	526	23477	10440	633	11016	3614
19	814	1128	474	22939	10396	631	10978	3602
20	860	1059	492	22356	10375	667	10935	3584
21	848	893	559	21761	10358	709	10925	3581
22	808	733	479	21244	10339	733	10888	3576
23	755	781	550	20654	10328	673	10862	3564
24	730	779	467	20160	10311	670	10846	3559
25	745	699	454	19668	10300	711	10832	3557
26	704	676	342	19301	10282	716	10812	3551
27	692	661	344	18926	18926	729	10793	3544

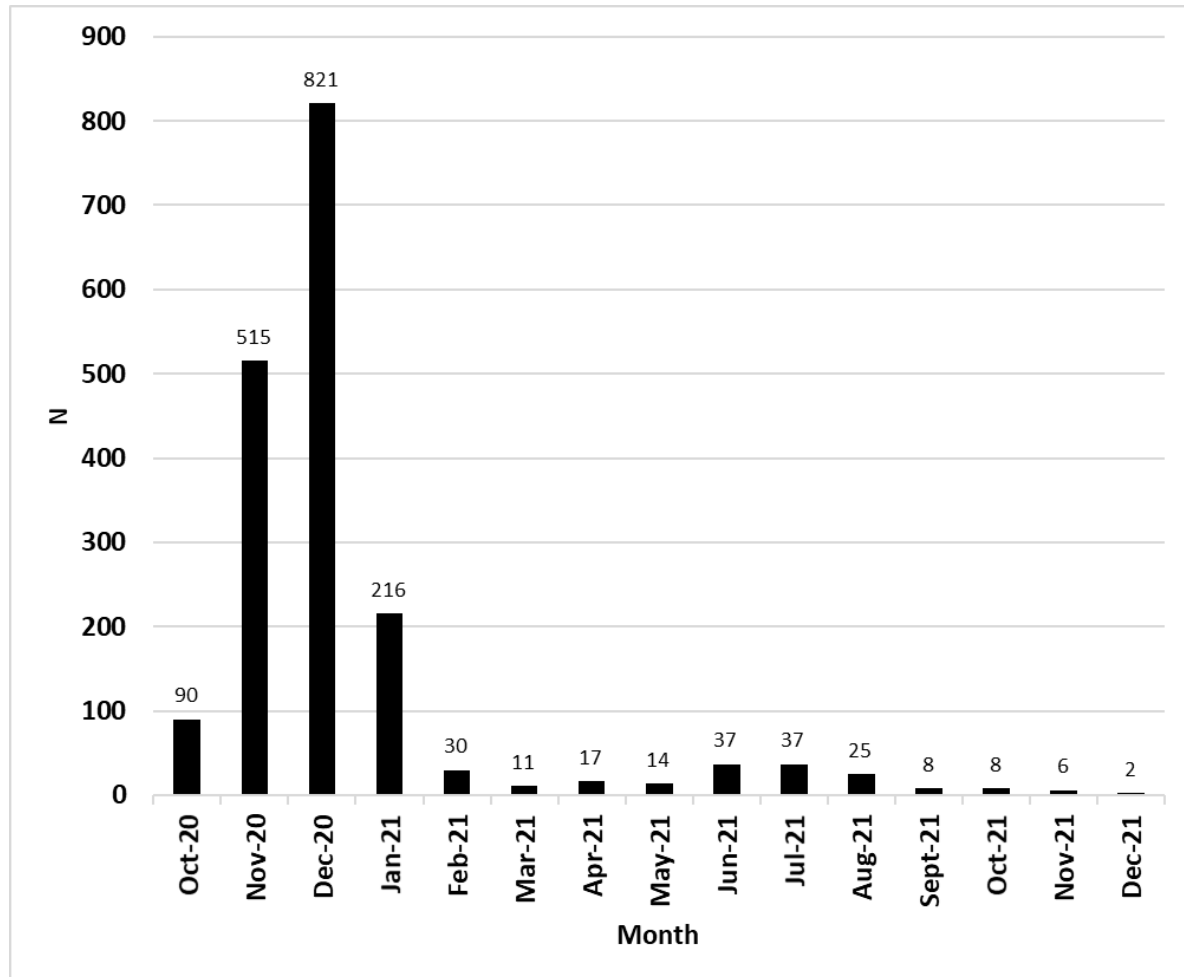
Note: È indicata la dimensione (N) delle coorti di vaccinazione settimanali riportate nelle figure 2, 3, S2, S3 e S4. Ogni colonna mostra il valore N dalla settimana 8 alla settimana 27 per la coorte elencata nella parte superiore della colonna.

Sezione S4. Tassi di vaccinazione e infezioni da SARS-CoV-2 nel periodo COVID-19

Tra le gravidanze nel periodo *COVID-19* incluse nell'analisi, ci sono 14.111 11.591 e 9.000 gravidanze in cui sono state somministrate rispettivamente la prima, la seconda e la terza dose del vaccino COVID-19 tra la settimana 8 e la settimana 27 (rispettivamente il 18,6%, il 16,4% e il 12,3% di tutte le gravidanze incluse nel periodo *COVID-19*). Sono state 39.028, 34.452 e 11.970 le gravidanze in cui sono state somministrate rispettivamente la prima, la seconda e la terza dose prima dell'ultimo ciclo mestruale (41,4%, 36,5% e 12,7% di tutte le gravidanze nel periodo *COVID-19*). Oltre il 95% delle donne vaccinate ha ricevuto il vaccino Pfizer-BioNTech BNT162b2. Tra le donne esposte durante la gravidanza, il 95,6% della prima dose, il 98,7% della seconda dose e il 99,9% della terza dose erano BNT162b2. Praticamente tutte le donne rimanenti hanno ricevuto il vaccino Moderna mRNA-1273. Nel periodo *COVID-19*, sono state registrate 13.634 gravidanze in cui la vaccinazione antinfluenzale è stata somministrata durante le settimane 8-27 e 12.544 in cui è stata somministrata prima della gravidanza, ma nella stessa stagione influenzale (rispettivamente il 16,8% e il 13,3% di tutte le gravidanze analizzate nel periodo *COVID-19*).

Infezioni da SARS-CoV-2. Sono state registrate 9.776 gravidanze in cui le donne avevano contratto l'infezione da SARS-CoV-2 prima della gravidanza e 9.073 gravidanze con infezione nelle settimane 8-27 (rispettivamente il 9,6% e il 14,5% delle gravidanze incluse nel periodo *COVID-19*), di cui 6.517 (71,8%) sono state infettate dopo la vaccinazione. Le infezioni sono state documentate con PCR o (dall'inizio del 2022) con test a flusso laterale.

Figura S5. Mese dell'ultimo ciclo mestruale (LMP) per le donne che hanno ricevuto la prima dose del vaccino COVID-19 nelle settimane gestazionali 8-13



Note: è riportata la distribuzione mensile dell'LMP per le donne che hanno ricevuto la prima dose del vaccino COVID-19 nelle settimane gestazionali 8-13 nel periodo *COVID-19* (LMP dal 1° marzo 2020 al 28 febbraio 2022). Il numero di donne con LMP in ciascun mese è indicato sopra le barre.

Table 73. List of Important Risks and Missing Information

Important identified risks	Myocarditis and Pericarditis
Important potential risks	None
Missing information	Use in pregnancy and while breast feeding
	Use in immunocompromised patients
	Use in frail patients with co-morbidities (e.g., chronic obstructive pulmonary disease [COPD], diabetes, chronic neurological disease, cardiovascular disorders)
	Use in patients with autoimmune or inflammatory disorders
	Long term safety data

II.B Summary of Important Risks

The safety information in the Product Information is aligned to the reference.

Table 74. Important Identified Risk: Myocarditis and Pericarditis

Evidence for linking the risk to the medicine	Events of Myocarditis and Pericarditis have been reported.
Risk factors and risk groups	Post-authorization reports have been reported more frequently in adolescent and young adult male patients following the second dose of vaccine; however, reports have been received for adult males and females of broader age range and following the first vaccination also.
Risk minimisation measures	<u>Routine risk minimisation measures:</u> SmPC sections 4.4. and 4.8. <u>Additional risk minimisation measures:</u> DHCP letter and communication plan
Additional pharmacovigilance activities	C4591009 C4591021 (former ACCESS/VAC4EU) C4591038 (former C4591021 sub-study) C4591036 (former Pediatric Heart Network study) C4591051 C4591052 See Section II.C this summary for an overview of the post-authorisation development plan.

Infant Mortality in the United States, 2023: Data From the Period Linked Birth/Infant Death File

by Danielle M. Ely, Ph.D., and Anne K. Driscoll, Ph.D.

Abstract

Objectives—This report presents final 2023 infant mortality statistics by age at death, maternal race and Hispanic origin, maternal age, gestational age, leading causes of death, and maternal state of residence. Trends in infant mortality are also examined.

Methods—Descriptive tabulations of data are presented and interpreted for infant deaths and infant mortality rates using the 2023 period linked birth/infant death file. The linked birth/infant death file is based on birth and death certificates registered in all 50 states and the District of Columbia.

Results—A total of 20,162 infant deaths were reported in the United States in 2023, down 2% from 2022. The U.S. infant mortality rate was 5.61 infant deaths per 1,000 live births, unchanged from the rate in 2022. Changes in the neonatal mortality rate from 3.59 in 2022 to 3.65 in 2023, and in the postneonatal mortality rate from 2.02 to 1.96, were not significant. Changes in mortality rates for infants by maternal race and Hispanic-origin group were not significant; among Hispanic-origin subgroups, rates increased for infants of Mexican women in 2023 compared with 2022. Infants of Black non-Hispanic women had the highest mortality rate (10.93) in 2023, followed by infants of American Indian and Alaska Native non-Hispanic (9.20) and Native Hawaiian or Other Pacific Islander non-Hispanic (8.21), Hispanic (5.03), White non-Hispanic (4.48), and Asian non-Hispanic (3.44) women. The mortality rate decreased from 2022 to 2023 for infants born at 41 weeks of gestation (1.73 to 1.46) but were essentially unchanged for other gestational age categories. The five leading causes of infant death in 2023 were the same as in 2022. Infant mortality rates by state for 2023 ranged from a low of 2.93 in New Hampshire to a high of 8.94 in Mississippi.

Keywords: maternal and infant characteristics • vital statistics • National Vital Statistics System

Introduction

This report presents infant mortality statistics based on data from the 2023 period linked birth/infant death file. Infant mortality and mortality rates are described by age at death, maternal race and Hispanic origin, maternal age, gestational age, leading causes of death, and maternal state of residence. Infant mortality trends are also presented by selected characteristics. In the linked file, information from the death certificate is linked to information from the birth certificate for each infant younger than age 1 year who died in the 50 states, the District of Columbia, Puerto Rico, or Guam during 2023 (1). The purpose of the linkage is to use variables available from the birth certificate to conduct more detailed analyses of infant mortality patterns (2,3). The linked birth/infant death data set also is the preferred source for examining infant mortality by race and Hispanic origin. Infant mortality rates by race and Hispanic origin, based on maternal race and Hispanic origin, are more accurately measured from the birth certificate compared with the death certificate.

For 2023, linked birth/infant death data are not available for American Samoa, Commonwealth of the Northern Marianas, and U.S. Virgin Islands. Some rates calculated from the mortality file differ from those published using the linked file. More details can be found elsewhere (1).

Methods

Data shown in this report are based on birth and infant death certificates registered in all states, the District of Columbia, Puerto Rico, and Guam. As part of the Vital Statistics Cooperative Program, each state provides matching birth and death certificate numbers for each infant younger than age 1 year who died during 2023 to the National Center for Health Statistics. Further discussion of the process of linking births and deaths occurring in different states and file production can be found in the Methodology section of the “User Guide to the 2023

Period/2022 Cohort Linked Birth/Infant Death Public Use File" (1).

The period linked file for 2017 marked the first data year for which the linked birth data for infant deaths for all 50 states and the District of Columbia were based on the 2003 revision of the U.S. Standard Certificate of Live Birth (4) and, also, the first year for which national data on race and Hispanic-origin categories based on 1997 Office of Management and Budget standards became available (5).

In 2023, 98.8% of all infant death records were successfully linked to their corresponding birth records. These records were weighted to adjust for the 1.2% of infant death records that were not linked to their corresponding birth certificates (1) (Technical Notes).

Information for age and race of mother is imputed if it is not reported on the birth certificate. In 2023, race of mother was imputed for 8.1% of births; mother's age was imputed for 0.02% of births (2,3).

All race and Hispanic-origin data are based on single-race reporting and are consistent with the 1997 Office of Management and Budget standards and differ from the bridged-race categories shown in previous reports (5). Maternal race and Hispanic-origin categories presented are American Indian and Alaska Native non-Hispanic (subsequently, American Indian and Alaska Native), Asian non-Hispanic (subsequently, Asian), Black non-Hispanic (subsequently, Black), Native Hawaiian or Other Pacific Islander non-Hispanic (subsequently, Native Hawaiian or Other Pacific Islander), White non-Hispanic (subsequently, White), and Hispanic. Race and Hispanic origin are reported separately on the birth certificate. Data are shown in most cases for five specified Hispanic groups: Central and South American, Cuban, Dominican, Mexican, and Puerto Rican. Additional details on Hispanic origin are available elsewhere (3). Comparisons between 2023 and 2022 by race and Hispanic origin are made in this report. The 2003 revision of the U.S. Standard Certificate of Live Birth allows the reporting of five race categories for each parent (6)—either alone, as in single race, or in combination, as in more than one race or multiple races—in accordance with the 1997 revised Office of Management and Budget standards (5). Further details on race reporting are available elsewhere (3).

Cause-of-death statistics are classified in accordance with the *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 10th Revision (ICD-10)* (7) (Technical Notes).

Data by maternal and infant characteristics

This report presents descriptive tabulations of infant mortality data by a variety of maternal and infant characteristics. These tabulations are useful for understanding the basic relationships between risk factors and infant mortality, unadjusted for the possible effects of other variables. This report also presents several key risk factors for infant mortality: age at death, maternal race and Hispanic origin, maternal age, gestational age, leading causes of infant death, and maternal state of residence. For brevity, additional selected risk factors (sex, birthweight, plurality, and nativity [mother's place of birth]) are presented in tables but not discussed in this report.

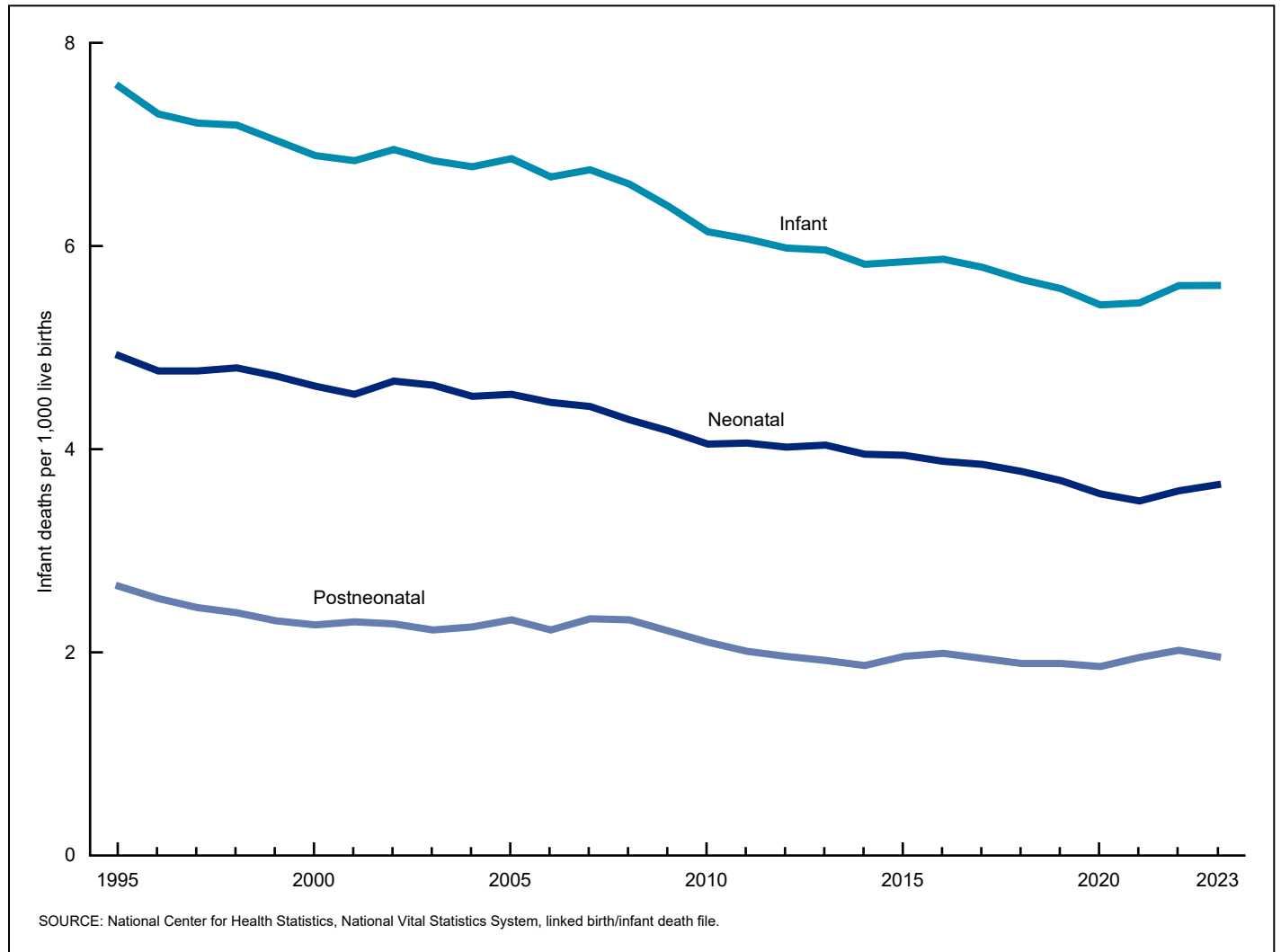
Race and Hispanic origin—Infant mortality rates are presented by race and Hispanic origin of the mother. The linked file is useful for computing accurate infant mortality rates by these characteristics because the race and Hispanic origin of the mother from the birth certificate are used in both the numerator and denominator of the infant mortality rate. In contrast, for rates based on the vital statistics mortality file, race information for the denominator is the race of the mother as reported on the birth certificate, while race information for the numerator is the race of the decedent as reported on the death certificate (2,3,8). More detail on the reliability of race and Hispanic-origin data from the linked file compared with the mortality file is available elsewhere (8).

Statistical significance—Statements in the text have been tested for statistical significance, and a statement that a given infant mortality rate is higher or lower than another rate indicates that the rates are significantly different using a two-tailed *z* test at the alpha level of 0.05. Comparisons between state rates and the U.S. rate take into account each state's contribution to the U.S. rate. As a result, each state rate is compared with a unique U.S. rate independent of the state's contribution to the total U.S. rate. Information on the methods used to test for statistical significance and suppression standards, as well as information on differences between period and cohort data, the weighting of the linked file, maternal age, period of gestation, birthweight, and cause-of-death classification is also available (1) (Technical Notes).

Results

Trends in infant mortality and infant age at death

- In 2023, 20,162 infant deaths were reported in the United States, a decrease of 2% from 2022 (20,577) (Figure 1, Table 1). The infant mortality rate was 5.61 deaths per 1,000 live births in 2023, unchanged from the 2022 rate; the increase in the rate from 2021 (5.44) to 2022 was the first since the increase from 2001 (6.84) to 2002 (6.95).
- The U.S. infant mortality rate has generally trended downward since 1995 (the first year that the period linked birth/infant death file was available) and is down 19% since 2002.
- The 2023 neonatal mortality rate (infant deaths at less than 28 days) of 3.65 was not significantly different than the rate in 2022 (3.59); the increase in the rate from 2021 (3.49) to 2022 was the first since the increase from 2001 (4.54) to 2002 (4.67). The neonatal mortality rate has generally declined since 1995 and decreased 22% since the last increase in 2002.
- The 2023 postneonatal mortality rate (infant deaths at 28 days or more) of 1.96 was essentially unchanged from the rate in 2022 (2.02). The rate increased from 2021 (1.95) to 2022. The postneonatal mortality rate has also generally declined since 1995 and decreased 14% since 2002 (2.28).

Figure 1. Infant, neonatal, and postneonatal mortality rates: United States, 1995–2023

Race and Hispanic origin

- Mortality rates did not change significantly from 2022 to 2023 for infants of women of any of the race and Hispanic-origin groups: American Indian and Alaska Native (9.06 infant deaths per 1,000 live births in 2022 to 9.20 in 2023), Asian (3.51 to 3.44), Black (10.90 to 10.93), Native Hawaiian and Other Pacific Islander (8.50 to 8.21), White (4.52 to 4.48), and Hispanic (4.89 to 5.03) (Tables 1 and 2, Figure 2).
- Among Hispanic-origin subgroups, the mortality rate for infants of Mexican women increased from 4.79 to 5.12 from 2022 to 2023; increases in mortality rates for infants of Central and South American (4.36 to 4.59) and Puerto Rican (6.32 to 6.43) women were not significant. Declines in mortality rates for infants of Cuban (3.94 to 3.77) and Dominican (4.74 to 4.59) women from 2022 to 2023 were not significant.
- In 2023, infant mortality continued to vary by race: infants of Black women had the highest mortality rate (10.93), followed by infants of American Indian and Alaska Native and Native Hawaiian or Other Pacific Islander (9.20 and

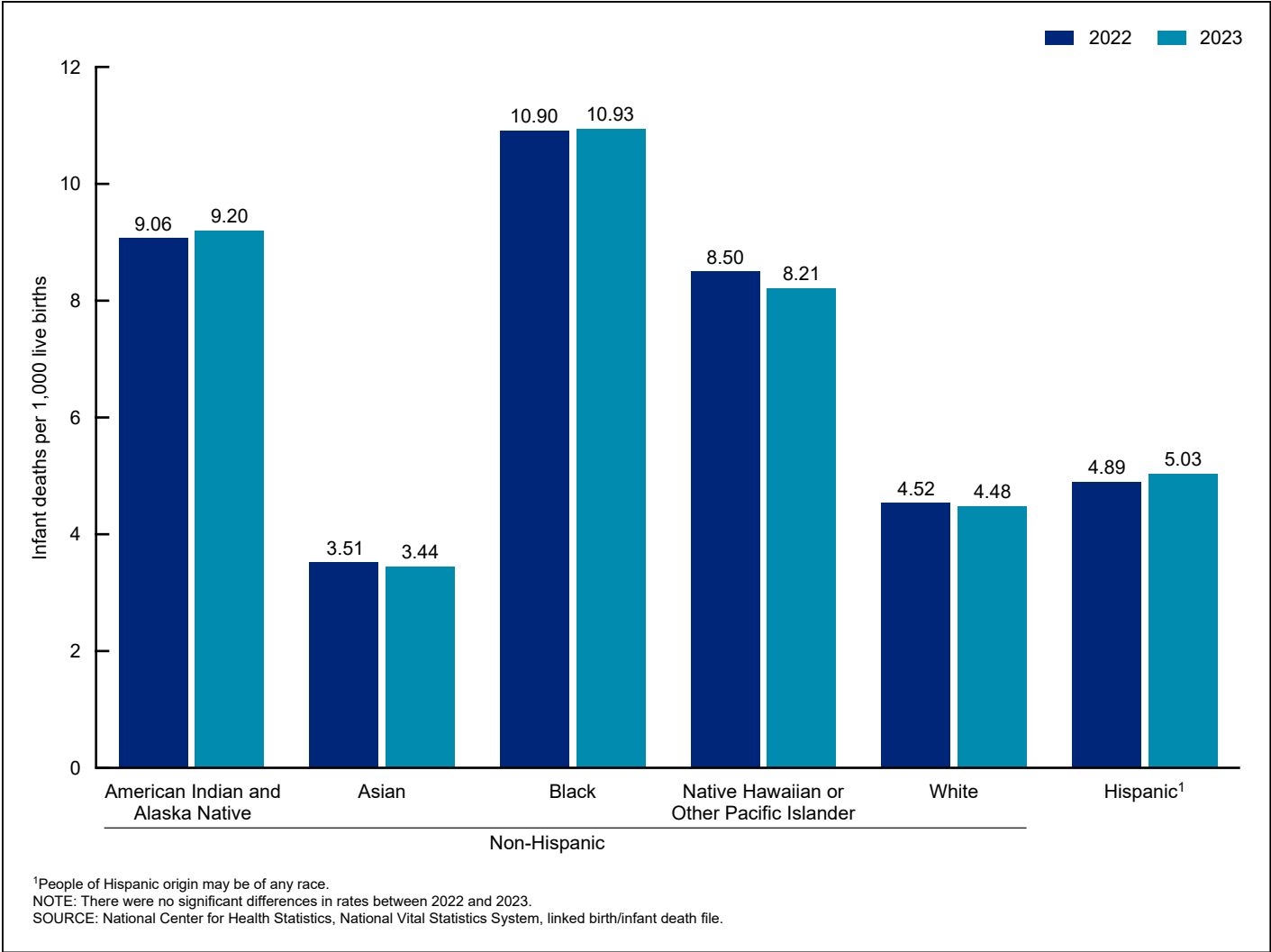
8.21, respectively), Hispanic (5.03), White (4.48), and Asian (3.44) women.

- Infants of Black women also had the highest neonatal mortality rate in 2023 (6.63) compared with infants of the other race and Hispanic-origin groups; the lowest mortality rate was for infants of Asian women (2.51) (Table 2).
- In 2023, postneonatal mortality rates were higher for infants of American Indian and Alaska Native (4.40), Black (4.30), and Native Hawaiian or Other Pacific Islander (3.26) women than for infants of White (1.61), Hispanic (1.47), and Asian (0.92) women.
- Among Hispanic-origin subgroups in 2023, the mortality rate for infants of Puerto Rican women (6.43) was higher than that of infants of Mexican (5.12), Dominican (4.59), Central and South American (4.59), and Cuban (3.77) women.

Maternal age

- From 2022 to 2023, no significant changes in mortality rates for infants of women of any age group were seen (Figure 3, Table 2).

Figure 2. Infant mortality rate, by maternal race and Hispanic origin: United States, 2022 and 2023



- Nonsignificant increases in mortality rates were seen for infants of females younger than age 15 (14.25 infant deaths per 1,000 live births to 20.95) and ages 15–19 (9.86 to 10.44), and for infants of women ages 20–24 (7.13 to 7.23) and 40 and older (6.73 to 6.77).
- Decreases in mortality rates for infants of women ages 25–29 (5.37 to 5.24) and 35–39 (4.99 to 4.94) were not significant. The rate for infants of women ages 30–34 was unchanged from 2022 to 2023 at 4.59.
- In 2023, mortality rates were highest for infants of females younger than 15 (20.95), decreased to a low of 4.59 for infants of women ages 30–34, and then increased to 6.77 for infants of women age 40 and older.

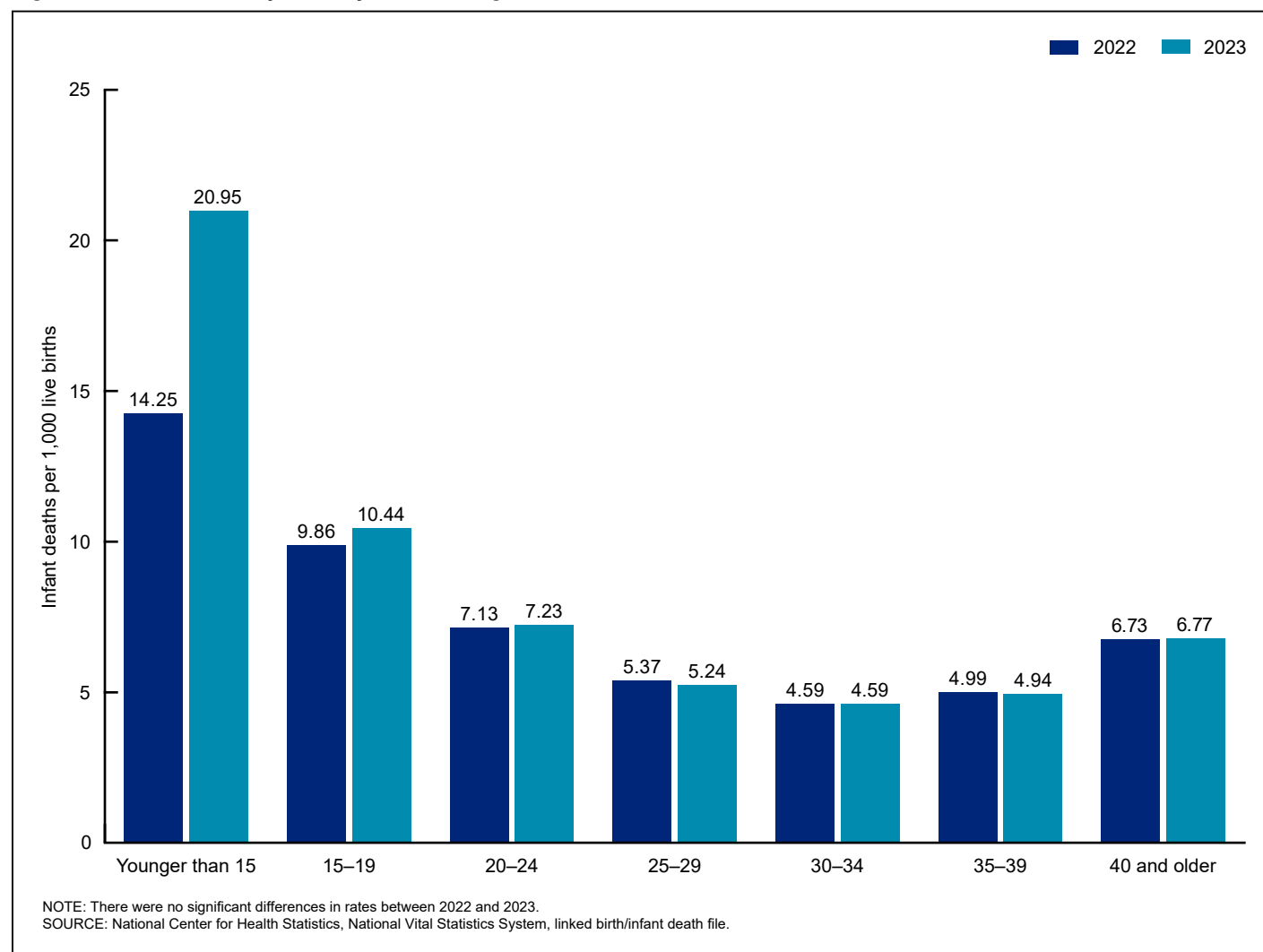
Gestational age

- The mortality rate declined for infants born at 41 weeks (1.73 infant deaths per 1,000 live births to 1.46) but did not change significantly for the other gestational age categories from 2022 to 2023: preterm (less than 37 weeks of gestation) (34.78 to 34.74), early preterm (less than 34 weeks) (107.94 to 107.87), late preterm (34–36 weeks)

- (8.29 to 8.31), term (37–41 weeks) (2.18 to 2.16), and post-term (42 weeks or more) (4.23 to 3.66) (9) (Table, Table 2).
- In 2023, almost two-thirds of all infant deaths (65%) occurred among infants born preterm (less than 37 weeks of gestation), which was unchanged from 2022 (9).

Leading causes of infant death

- In 2023, the five leading causes of all infant deaths were the same as those in 2022: congenital malformations (20.0% of infant deaths), disorders related to short gestation and low birth weight (14.5%), sudden infant death syndrome (SIDS) (7.2%), unintentional injuries (6.4%), and maternal complications (5.7%) (Table 3).
- From 2022 to 2023, no significant changes in infant mortality rates were seen for the five leading causes of death: congenital malformations (from 109.2 infant deaths per 100,000 live births to 112.1), disorders related to short gestation and low birth weight (78.6 to 81.4), SIDS (41.7 to 40.2), unintentional injuries (36.8 to 35.8), and maternal complications (33.1 to 31.9).

Figure 3. Infant mortality rate, by maternal age: United States, 2022 and 2023**Table. Infant mortality rate, by gestational age: United States, 2015–2023**

Year	Less than 32 weeks	32–33 weeks	34–36 weeks	37–41 weeks	42 weeks or more
Deaths per 1,000 live births					
2023.....	174.28	21.04	8.31	2.16	3.66
2022.....	175.18	21.05	8.29	2.18	4.23
2021.....	167.39	19.35	8.11	2.08	3.79
2020.....	175.88	20.11	7.92	2.04	4.17
2019.....	180.40	19.21	8.21	2.03	5.72
2018.....	185.79	21.95	8.21	2.05	5.39
2017.....	187.56	20.50	8.50	2.10	3.98
2016.....	190.15	20.12	8.65	2.19	4.31
2015.....	193.54	20.79	8.76	2.17	4.20

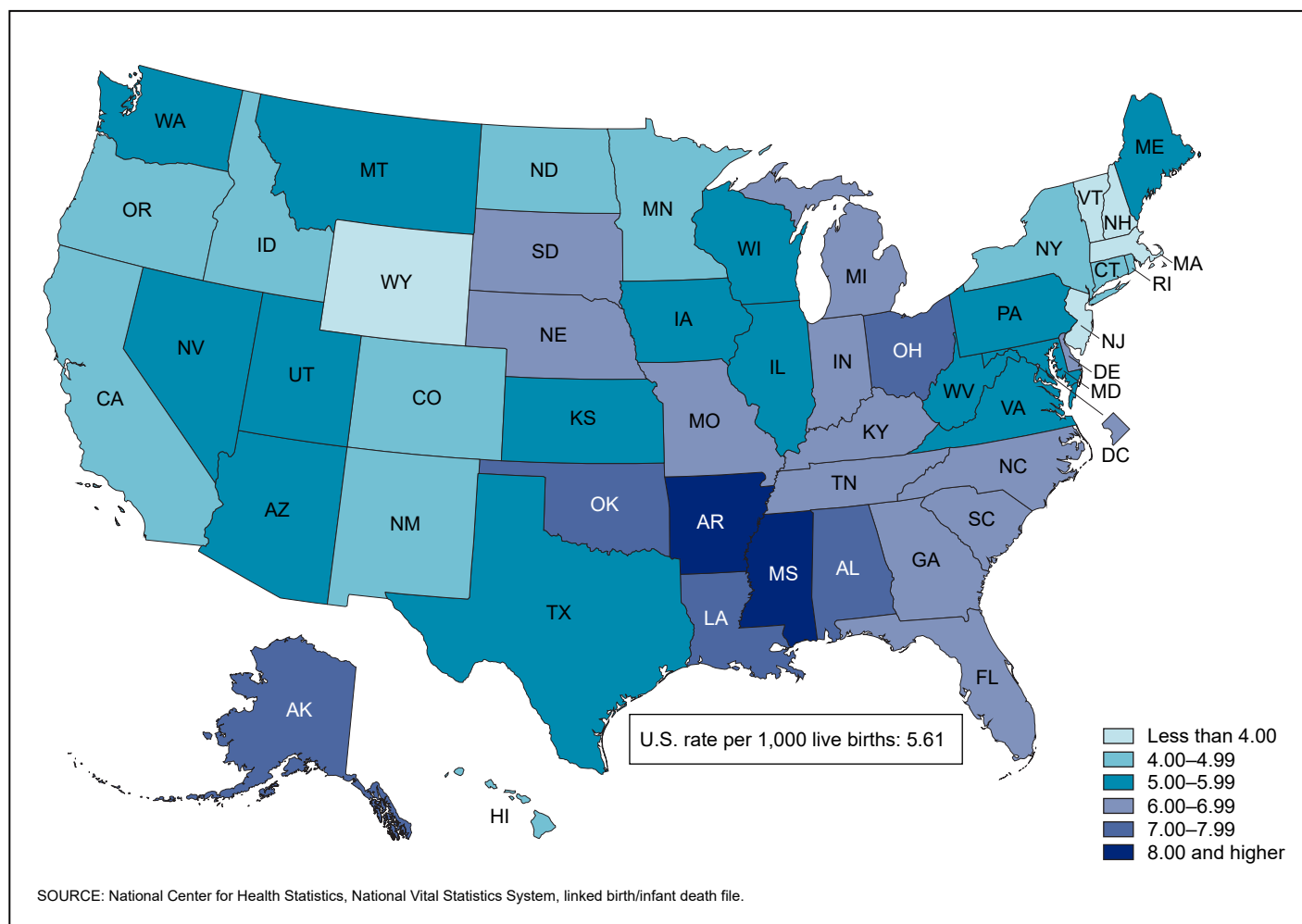
SOURCE: National Center for Health Statistics, National Vital Statistics System, linked birth/infant death file.

- Congenital malformations was the leading cause of death for infants of women for most race and Hispanic-origin groups: American Indian and Alaska Native (134.3), Asian (69.1), Native Hawaiian and Other Pacific Islander (148.3), White (102.2), and Hispanic (119.6) in 2023 (Table 4).

- In 2023, disorders related to short gestation and low birth weight was the leading cause of death for infants of Black women (201.0).

Infant mortality by state

- By state, infant mortality ranged from a low of 2.93 infant deaths per 1,000 births in New Hampshire to a high of 8.94 in Mississippi (Figure 4, Table 5).
- Thirteen states had infant mortality rates significantly lower than the national infant mortality rate: California, Colorado, Connecticut, Idaho, Massachusetts, Minnesota, New Hampshire, New Jersey, New Mexico, New York, Oregon, Vermont, and Washington.
- Fourteen states had infant mortality rates significantly higher than the U.S. infant mortality rate: Alabama, Arkansas, Florida, Georgia, Indiana, Kentucky, Louisiana, Michigan, Mississippi, North Carolina, Ohio, Oklahoma, South Carolina, and Tennessee.

Figure 4. Infant mortality rate, by state: United States, 2023

References

1. National Center for Health Statistics. User guide to the 2023 period/2022 cohort linked birth/infant death public use file. 2025. Available from: https://ftp.cdc.gov/pub/Health_Statistics/NCHS/Dataset_Documentation/DVS/period-cohort-linked/23PE22CO_linkedUG.pdf.
2. Osterman MJK, Hamilton BE, Martin JA, Driscoll AK, Valenzuela CP. Births: Final data for 2023. National Vital Statistics Reports; vol 74 no 1. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics. 2025. DOI: <https://dx.doi.org/10.15620/cdc/175204>.
3. National Center for Health Statistics. User guide to the 2023 natality public use file. 2024. Available from: https://ftp.cdc.gov/pub/Health_Statistics/NCHS/Dataset_Documentation/DVS/natality/UserGuide2023.pdf.
4. Ely DM, Driscoll AK. Infant mortality in the United States, 2017: Data from the period linked birth/infant death file. Natl Vital Stat Rep. 2019 Aug;68(10):1–20. PMID: 32501205.
5. Office of Management and Budget. Revisions to the standards for the classification of federal data on race and ethnicity. Fed Regist 62(210):58782–90. 1997.
6. National Center for Health Statistics. 2003 revisions of the U.S. Standard Certificates and Reports. 2003. Available from: https://www.cdc.gov/nchs/nvss/vital_certificate_revisions.htm.
7. World Health Organization. International statistical classification of diseases and related health problems, 10th Revision, Volume 2, Instruction manual, 2010 edition. World Health Organization; 2010.
8. Kochanek KD, Murphy SL, Xu J, Arias E. Deaths: Final data for 2017. Natl Vital Stat Rep. 2019 Jun;68(9):1–77. PMID: 32501199.
9. Ely DM, Driscoll AK. Infant mortality in the United States, 2022: Data from the period linked birth/infant death file. Natl Vital Stat Rep. 2024 Jul 25;(5):1–19. DOI: 10.15620/cdc/157006. PMID: 39412861; PMCID: PMC11513748.
10. National Center for Health Statistics. U.S. Standard Certificate of Live Birth. 2003. Available from: <https://www.cdc.gov/nchs/data/dvs/birth11-03final-ACC.pdf>.
11. Kochanek KD, Murphy SL, Xu JQ, Arias E. Deaths: Final data for 2023. National Vital Statistics Reports. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics. [Forthcoming].
12. Martin JA, Osterman MJ, Kirmeyer SE, Gregory EC. Measuring gestational age in vital statistics data: Transitioning to the obstetric estimate. Natl Vital Stat Rep. 2015 Jun 1;64(5):1–20. PMID: 26047089.
13. National Center for Health Statistics. Instructions for classifying the underlying cause of death, 2022. NCHS Instruction Manual, part 2a. 2022.
14. National Center for Health Statistics. Vital statistics ICD–10 ACME decision tables for classifying underlying causes of death, 2016. NCHS Instruction Manual, part 2c. 2016.

15. National Center for Health Statistics. Mortality multiple cause-of-death public use data file documentation (published annually). 2024.
16. World Health Organization. Manual of the International Statistical Classification of Diseases, Injuries and Causes of Death: Based on the recommendations of the Ninth Revision Conference, 1975, and adopted by the Twenty-ninth World Health Assembly, 1975 revision. 1977.
17. National Center for Health Statistics. ICD–10 cause-of-death lists for tabulating mortality statistics. Updated October 2020. NCHS Instruction Manual, part 9. 2020.
18. Parker JD, Talih M, Irimata KE, Zhang G, Branum AM, Davis D, Das B, Hamilton BE, Kochanek K. National Center for Health Statistics data presentation standards for rates and counts. Vital Health Stat 2. 2023 Mar;(200):1–26. DOI: <https://dx.doi.org/10.15620/cdc:124368>.
19. Parker JD, Talih M, Malec DJ, Beresovsky V, Carroll M, Gonzalez JF, et al. National Center for Health Statistics data presentation standards for proportions. Vital Health Stat 2. 2017 Aug;(175): 1–22. PMID: 30248016.

List of Detailed Tables

1. Live births; infant, neonatal, and postneonatal deaths; and mortality rate: United States, 1995–2023, and by maternal race and Hispanic origin, 2017–2023	8
2. Infant mortality rate, live births, and infant deaths, by selected characteristics and maternal race and Hispanic origin: United States, 2023	11
3. Infant deaths, percentage of deaths, and infant mortality rate, by five leading causes of infant death: United States, 2010–2023	15
4. Infant deaths and mortality rate for the five leading causes of infant death, by maternal race and Hispanic origin: United States, 2023	16
5. Infant mortality rate: United States and each state, 2023	17

Table 1. Live births; infant, neonatal, and postneonatal deaths; and mortality rate: United States, 1995–2023, and by maternal race and Hispanic origin, 2017–2023

Race and Hispanic origin and year	Number				Deaths per 1,000 live births		
	Live births	Infant deaths	Neonatal deaths	Postneonatal deaths	Infant	Neonatal	Postneonatal
All race and Hispanic-origin groups							
2023.....	3,596,017	20,162	13,113	7,049	5.61	3.65	1.96
2022.....	3,667,758	20,577	13,158	7,419	5.61	3.59	2.02
2021.....	3,664,292	19,928	12,797	7,131	5.44	3.49	1.95
2020.....	3,613,647	19,578	12,866	6,712	5.42	3.56	1.86
2019.....	3,747,540	20,927	13,834	7,093	5.58	3.69	1.89
2018.....	3,791,712	21,498	14,329	7,169	5.67	3.78	1.89
2017.....	3,855,500	22,341	14,844	7,497	5.79	3.85	1.94
2016.....	3,945,875	23,157	15,303	7,854	5.87	3.88	1.99
2015.....	3,978,497	23,458	15,672	7,786	5.90	3.94	1.96
2014.....	3,988,076	23,211	15,737	7,474	5.82	3.95	1.87
2013.....	3,932,181	23,446	15,893	7,553	5.96	4.04	1.92
2012.....	3,952,841	23,654	15,887	7,767	5.98	4.02	1.96
2011.....	3,953,590	24,001	16,065	7,936	6.07	4.06	2.01
2010.....	3,999,386	24,572	16,193	8,379	6.14	4.05	2.10
2009.....	4,130,665	26,408	17,261	9,148	6.39	4.18	2.21
2008.....	4,247,726	28,075	18,238	9,837	6.61	4.29	2.32
2007.....	4,316,233	29,153	19,094	10,059	6.75	4.42	2.33
2006.....	4,265,593	28,509	19,041	9,468	6.68	4.46	2.22
2005.....	4,138,573	28,384	18,782	9,602	6.86	4.54	2.32
2004.....	4,112,055	27,860	18,602	9,258	6.78	4.52	2.25
2003.....	4,090,007	27,995	18,935	9,060	6.84	4.63	2.22
2002.....	4,021,825	27,970	18,791	9,179	6.95	4.67	2.28
2001.....	4,026,036	27,523	18,275	9,248	6.84	4.54	2.30
2000.....	4,058,882	27,961	18,733	9,227	6.89	4.62	2.27
1999.....	3,959,417	27,865	18,701	9,164	7.04	4.72	2.31
1998.....	3,941,553	28,325	18,915	9,410	7.19	4.80	2.39
1997.....	3,880,894	27,968	18,507	9,461	7.21	4.77	2.44
1996.....	3,891,494	28,419	18,556	9,863	7.30	4.77	2.53
1995.....	3,899,589	29,505	19,186	10,319	7.57	4.92	2.65
Non-Hispanic, single race							
American Indian and Alaska Native:							
2023.....	24,571	226	117	108	9.20	4.76	4.40
2022.....	25,721	233	135	98	9.06	5.25	3.81
2021.....	26,124	195	100	96	7.46	3.83	3.67
2020.....	26,813	206	102	104	7.68	3.80	3.88
2019.....	28,450	224	114	110	7.87	4.01	3.87
2018.....	29,092	237	120	117	8.15	4.12	4.02
2017.....	29,957	276	143	132	9.21	4.77	4.41
Asian:							
2023.....	215,738	742	542	199	3.44	2.51	0.92
2022.....	218,994	768	542	225	3.51	2.47	1.03
2021.....	213,813	788	594	193	3.69	2.78	0.90
2020.....	219,068	688	503	185	3.14	2.30	0.84
2019.....	238,769	806	602	204	3.38	2.52	0.85
2018.....	240,798	874	643	231	3.63	2.67	0.96
2017.....	249,250	943	675	268	3.78	2.71	1.08
Black:							
2023.....	491,494	5,374	3,260	2,114	10.93	6.63	4.30
2022.....	511,439	5,573	3,296	2,277	10.90	6.44	4.45
2021.....	517,889	5,463	3,291	2,172	10.55	6.35	4.19
2020.....	529,811	5,501	3,472	2,028	10.38	6.55	3.83
2019.....	548,075	5,821	3,754	2,067	10.62	6.85	3.77
2018.....	552,029	5,933	3,897	2,037	10.75	7.06	3.69
2017.....	560,715	6,152	4,012	2,140	10.97	7.16	3.82

Table 1. Live births; infant, neonatal, and postneonatal deaths; and mortality rate: United States, 1995–2023, and by maternal race and Hispanic origin, 2017–2023—Con.

Race and Hispanic origin and year	Number				Deaths per 1,000 live births		
	Live births	Infant deaths	Neonatal deaths	Postneonatal deaths	Infant	Neonatal	Postneonatal
Non-Hispanic, single race—Con.							
Native Hawaiian or Other Pacific Islander:							
2023	10,115	83	50	33	8.21	4.94	3.26
2022	10,122	86	48	38	8.50	4.74	3.75
2021	9,531	74	41	32	7.76	4.30	3.36
2020	9,626	69	41	27	7.17	4.26	2.80
2019	9,770	80	49	31	8.19	5.02	3.17
2018	9,476	89	51	38	9.39	5.38	4.01
2017	9,426	72	36	36	7.64	3.82	3.82
White:							
2023	1,787,051	8,008	5,127	2,881	4.48	2.87	1.61
2022	1,840,739	8,324	5,318	3,006	4.52	2.89	1.63
2021	1,887,656	8,236	5,251	2,984	4.36	2.78	1.58
2020	1,843,432	8,115	5,290	2,825	4.40	2.87	1.53
2019	1,915,912	8,603	5,589	3,014	4.49	2.92	1.57
2018	1,956,413	9,059	5,873	3,186	4.63	3.00	1.63
2017	1,992,461	9,306	6,061	3,246	4.67	3.04	1.63
Hispanic							
2023	945,200	4,750	3,356	1,394	5.03	3.55	1.47
2022	937,421	4,581	3,138	1,442	4.89	3.35	1.54
2021	885,916	4,246	2,899	1,347	4.79	3.27	1.52
2020	866,713	4,063	2,828	1,235	4.69	3.26	1.42
2019	886,467	4,462	3,091	1,371	5.03	3.49	1.55
2018	886,210	4,303	3,036	1,267	4.86	3.43	1.43
2017	898,764	4,583	3,198	1,383	5.10	3.56	1.54
Central and South American:							
2023	208,618	958	697	261	4.59	3.34	1.25
2022	207,843	907	652	255	4.36	3.14	1.23
2021	178,067	748	521	227	4.20	2.93	1.27
2020	169,811	659	470	189	3.88	2.77	1.11
2019	165,229	749	535	214	4.53	3.24	1.30
2018	147,430	592	438	154	4.02	2.97	1.04
2017	145,614	653	465	188	4.48	3.19	1.29
Cuban:							
2023	30,001	113	86	27	3.77	2.87	0.90
2022	26,390	104	65	39	3.94	2.46	1.48
2021	24,437	87	68	19	3.56	2.78	*
2020	23,188	98	63	34	4.23	2.72	1.47
2019	23,668	98	65	33	4.14	2.75	1.39
2018	23,471	90	64	26	3.83	2.73	1.11
2017	23,362	93	69	24	3.98	2.95	1.03
Dominican:							
2023	33,575	154	106	48	4.59	3.16	1.43
2022	33,531	159	112	46	4.74	3.34	1.37
2021	33,373	109	68	41	3.27	2.04	1.23
2020	31,596	143	101	42	4.53	3.20	1.33
2019	32,483	153	111	42	4.71	3.42	1.29
Mexican:							
2023	508,127	2,601	1,845	757	5.12	3.63	1.49
2022	510,194	2,442	1,688	754	4.79	3.31	1.48
2021	485,127	2,380	1,633	747	4.91	3.37	1.54
2020	480,531	2,264	1,586	678	4.71	3.30	1.41
2019	496,716	2,462	1,693	769	4.96	3.41	1.55
2018	495,831	2,426	1,690	736	4.89	3.41	1.48
2017	512,126	2,588	1,795	792	5.05	3.50	1.55

Table 1. Live births; infant, neonatal, and postneonatal deaths; and mortality rate: United States, 1995–2023, and by maternal race and Hispanic origin, 2017–2023—Con.

Race and Hispanic origin and year	Number				Deaths per 1,000 live births		
	Live births	Infant deaths	Neonatal deaths	Postneonatal deaths	Infant	Neonatal	Postneonatal
Hispanic—Con.							
Puerto Rican:							
2023	66,203	426	282	144	6.43	4.26	2.18
2022	69,266	438	267	171	6.32	3.85	2.47
2021	70,729	428	278	151	6.05	3.93	2.13
2020	69,763	437	308	129	6.26	4.41	1.85
2019	70,950	438	294	144	6.17	4.14	2.03
2018	71,614	402	290	112	5.61	4.05	1.56
2017	70,813	459	307	151	6.48	4.34	2.13

* Estimate does not meet National Center for Health Statistics standards of reliability.

NOTES: People of Hispanic origin may be of any race. Infant deaths are weighted to adjust for the 1.1% of infant death records not linked to their corresponding birth certificates. The neonatal and postneonatal mortality rates combined may not exactly add to totals due to rounding. Data for infants of Dominican women are available starting with the 2019 period linked birth/infant death data files.

SOURCE: National Center for Health Statistics, National Vital Statistics System, linked birth/infant death file.

Table 2. Infant mortality rate, live births, and infant deaths, by selected characteristics and maternal race and Hispanic origin: United States, 2023

Characteristic	Total	Non-Hispanic					Hispanic					
		American Indian and Alaska Native ¹	Asian	Black	Native Hawaiian or Other Pacific Islander	White	Total ²	Central and South American	Cuban	Dominican	Mexican	Puerto Rican
Infant deaths per 1,000 live births in specified group												
Total	5.61	9.20	3.44	10.93	8.21	4.48	5.03	4.59	3.77	4.59	5.12	6.43
Age at death (days)												
Total neonatal	3.65	4.76	2.51	6.63	4.94	2.87	3.55	3.34	2.87	3.16	3.63	4.26
Early neonatal (less than 7)	2.84	3.78	1.90	5.14	3.95	2.22	2.83	2.73	2.17	2.38	2.88	3.26
Late neonatal (7–27)	0.80	0.98	0.61	1.49	0.99	0.65	0.72	0.61	0.70	0.77	0.76	1.00
Postneonatal (28–364)	1.96	4.40	0.92	4.30	3.26	1.61	1.47	1.25	0.90	1.43	1.49	2.18
Sex												
Male	6.04	10.32	3.77	11.56	7.67	4.89	5.40	5.01	4.29	5.26	5.46	6.80
Female	5.15	7.96	3.08	10.28	8.75	4.05	4.64	4.15	3.28	3.93	4.76	6.06
Period of gestation (weeks)												
Less than 37	34.74	39.67	25.68	51.16	34.02	28.38	33.89	33.03	28.68	32.29	34.81	36.09
Less than 34	107.87	125.51	89.71	130.35	110.09	92.96	110.29	115.83	98.70	101.43	111.54	107.32
Less than 28	362.14	410.40	332.10	360.63	333.33	364.49	355.51	369.96	315.27	334.66	358.19	359.17
28–31	43.40	*	26.91	45.26	*	41.85	46.33	58.94	42.02	37.27	43.39	37.88
32–33	21.04	40.88	18.31	23.75	*	19.67	21.12	19.60	*	*	24.13	20.97
34–36	8.31	11.51	4.10	11.87	*	7.81	7.28	6.18	*	4.87	8.17	7.52
37–41	2.16	4.80	1.20	3.87	4.20	1.95	1.73	1.53	1.07	1.43	1.77	2.42
37–38	3.22	5.87	1.74	5.02	6.96	3.13	2.42	2.15	2.02	2.01	2.53	3.11
39–40	1.64	4.36	0.91	3.19	2.69	1.41	1.40	1.21	0.57	1.17	1.41	2.08
41	1.46	*	*	2.32	*	1.43	1.11	1.40	*	*	0.95	*
42 or more	3.66	*	*	*	*	3.47	*	*	*	*	*	*
Birthweight (grams)												
Less than 2,500	42.33	53.50	25.72	51.35	48.63	37.77	43.83	44.69	39.22	36.48	46.00	40.29
Less than 1,500	196.71	234.10	162.63	203.80	208.86	186.60	203.73	222.55	180.66	169.74	208.61	188.25
1,500–2,499	12.72	18.49	6.43	14.03	15.23	12.61	12.94	12.79	7.89	7.60	14.47	10.09
2,500 or more	2.10	4.86	1.09	3.78	4.04	1.93	1.64	1.35	1.01	1.41	1.68	2.45
2,500–4,499	2.10	4.89	1.08	3.75	4.11	1.93	1.64	1.35	1.02	1.42	1.67	2.45
4,500 or more	2.46	*	*	7.84	*	1.77	2.14	*	*	*	*	*
Plurality												
Single births	5.09	8.75	3.23	9.83	7.93	4.09	4.57	4.16	3.02	4.15	4.67	6.06
Twin births	20.78	23.95	11.13	34.50	*	15.45	22.13	24.06	29.31	17.47	22.34	15.41
Triplet and higher-order births	52.39	*	*	85.98	*	41.91	52.34	*	*	*	53.85	*

See footnotes at end of table.

Table 2. Infant mortality rate, live births, and infant deaths, by selected characteristics and maternal race and Hispanic origin: United States, 2023—Con.

Characteristic	Total	Non-Hispanic					Hispanic					
		American Indian and Alaska Native ¹	Asian	Black	Native Hawaiian or Other Pacific Islander	White	Total ²	Central and South American	Cuban	Dominican	Mexican	Puerto Rican
Infant deaths per 1,000 live births in specified group—Con.												
Age of mother												
Younger than 15.	20.95	*	*	30.86	*	*	12.50	*	*	*	*	*
15–19.	10.44	11.95	*	15.87	*	10.86	7.15	5.93	*	*	6.81	11.58
20–24.	7.23	10.98	5.94	12.82	8.66	6.18	5.53	4.41	4.98	4.91	5.65	7.01
25–29.	5.24	7.89	3.99	10.18	5.61	4.23	4.44	4.14	3.25	5.27	4.48	5.60
30–34.	4.59	8.54	2.97	9.70	7.06	3.58	4.47	4.46	4.24	3.99	4.42	6.04
35–39.	4.94	6.80	3.14	9.60	11.42	3.98	5.10	4.70	2.75	3.90	5.51	6.02
40–54.	6.77	*	4.26	11.73	*	5.73	6.38	6.05	*	*	7.23	5.19
Mother's place of birth												
50 states or District of Columbia	5.80	9.10	3.48	11.54	8.68	4.54	5.11	4.46	4.06	3.85	5.00	6.21
Elsewhere.	4.76	*	3.43	7.91	7.67	3.31	4.90	4.62	3.61	4.89	5.30	6.82
Live births												
Total.	3,596,017	24,571	215,738	491,494	10,115	1,787,051	945,200	208,618	30,001	33,575	508,127	66,203
Sex												
Male.	1,839,794	12,505	111,542	249,931	5,087	916,170	482,254	106,726	15,378	17,309	258,596	33,848
Female	1,756,223	12,066	104,196	241,563	5,028	870,881	462,946	101,892	14,623	16,266	249,531	32,355
Period of gestation (weeks)												
Less than 37	373,902	3,000	19,587	71,956	1,264	168,654	95,755	19,922	2,929	3,438	51,134	7,814
Less than 34.	99,255	741	4,938	23,859	327	40,736	24,735	4,869	770	976	13,179	2,227
Less than 28	23,096	173	1,081	7,046	84	7,789	5,966	1,165	203	251	3,191	529
28–31	33,153	250	1,672	7,887	100	13,523	8,354	1,561	238	322	4,517	792
32–33	43,006	318	2,185	8,926	143	19,424	10,415	2,143	329	403	5,471	906
34–36	274,647	2,259	14,649	48,097	937	127,918	71,020	15,053	2,159	2,462	37,955	5,587
37–41.	3,210,174	21,474	195,957	418,212	8,807	1,611,436	847,391	188,191	27,024	30,108	455,922	58,289
37–38.	1,072,092	8,181	68,461	164,390	3,162	505,444	287,252	61,968	8,414	9,926	155,613	20,598
39–40.	1,974,300	12,372	120,557	237,042	5,213	1,013,077	520,655	116,923	17,459	18,836	279,216	35,085
41.	163,782	921	6,939	16,780	432	92,915	39,484	9,300	1,151	1,346	21,093	2,606
42 or more.	9,299	49	140	1,028	27	6,050	1,607	389	43	26	873	87
Not stated	2,642	48	54	298	17	911	447	116	*	*	198	13
Birthweight (grams)												
Less than 2,500	309,391	2,131	20,414	73,007	946	126,063	75,133	15,395	2,167	3,043	39,194	6,925
Less than 1,500	49,799	346	2,521	14,357	158	18,226	12,163	2,341	393	542	6,366	1,174
1,500–2,499.	259,592	1,785	17,893	58,650	788	107,837	62,970	13,054	1,774	2,501	32,828	5,751
2,500 or more	3,285,678	22,434	195,312	418,407	9,167	1,660,812	870,006	193,202	27,834	30,532	468,904	59,276
2,500–4,499.	3,253,557	22,076	194,495	415,983	8,999	1,640,988	862,531	191,758	27,539	30,329	464,565	58,810
4,500 or more	32,121	358	817	2,424	168	19,824	7,475	1,444	295	203	4,339	466
Not stated	948	*	12	80	*	176	61	21	*	*	29	*

See footnotes at end of table.

Table 2. Infant mortality rate, live births, and infant deaths, by selected characteristics and maternal race and Hispanic origin: United States, 2023—Con.

Characteristic	Total	Non-Hispanic					Hispanic					
		American Indian and Alaska Native ¹	Asian	Black	Native Hawaiian or Other Pacific Islander	White	Total ²	Central and South American	Cuban	Dominican	Mexican	Puerto Rican
Plurality		Live births—Con.										
Single births.	3,482,971	23,899	210,328	470,612	9,842	1,729,043	921,711	204,219	29,129	32,555	495,738	64,045
Twin births.	110,393	668	5,300	20,347	270	56,648	22,954	4,323	853	973	12,129	2,076
Triplet and higher-order births.	2,653	*	110	535	*	1,360	535	76	19	47	260	82
Age of mother												
Younger than 15.	1,766	23	*	486	*	351	800	304	*	12	356	30
15–19.	140,977	1,841	925	28,414	459	44,922	57,914	14,324	639	1,198	31,865	3,800
20–24.	616,970	6,285	9,420	103,077	2,424	263,760	207,702	42,377	4,816	6,116	117,437	15,415
25–29.	986,567	6,843	40,837	131,705	3,031	500,910	270,317	56,021	8,314	9,301	149,457	19,476
30–34.	1,098,052	5,970	88,489	131,500	2,409	595,741	240,489	52,706	9,659	10,013	125,796	16,884
35–39.	604,631	2,942	60,802	74,492	1,401	314,198	131,623	32,976	5,447	5,388	65,363	8,477
40–54.	147,054	667	15,258	21,820	389	67,169	36,355	9,910	1,122	1,547	17,853	2,121
Mother's place of birth												
50 states or District of Columbia.	2,744,794	24,183	51,139	396,282	3,458	1,662,528	503,410	34,084	10,583	10,386	329,614	47,987
Elsewhere.	843,233	349	164,063	93,217	6,521	121,879	440,349	174,323	19,401	23,092	178,031	17,880
Not stated.	7,990	39	536	1,995	136	2,644	1,441	211	17	97	482	336
		Infant deaths										
Total.	20,162	226	742	5,374	83	8,008	4,750	958	113	154	2,601	426
Age at death												
Total neonatal.	13,113	117	542	3,260	50	5,127	3,356	697	86	106	1,845	282
Early neonatal (less than 7 days).	10,226	93	410	2,526	40	3,961	2,672	569	65	80	1,461	216
Late neonatal (7–27 days).	2,887	24	132	734	10	1,166	683	128	21	26	384	66
Postneonatal.	7,049	108	199	2,114	33	2,881	1,394	261	27	48	757	144
Sex												
Male.	11,118	129	421	2,890	39	4,482	2,604	535	66	91	1,412	230
Female.	9,044	96	321	2,484	44	3,526	2,146	423	48	64	1,189	196
Period of gestation (weeks)												
Less than 37.	12,990	119	503	3,681	43	4,786	3,245	658	84	111	1,780	282
Less than 34.	10,707	93	443	3,110	36	3,787	2,728	564	76	99	1,470	239
Less than 28.	8,364	71	359	2,541	28	2,839	2,121	431	64	84	1,143	190
28–31.	1,439	*	45	357	*	566	387	92	10	12	196	30
32–33.	905	13	40	212	*	382	220	42	*	*	132	19
34–36.	2,282	26	60	571	*	999	517	93	*	12	310	42
37–41.	6,932	103	235	1,619	37	3,140	1,468	287	29	43	807	141
37–38.	3,450	48	119	825	22	1,582	695	133	17	20	393	64
39–40.	3,242	54	110	755	14	1,424	729	141	10	22	394	73
41.	239	*	*	39	*	133	44	13	*	*	20	*
42 or more.	34	—	—	*	—	21	*	—	—	—	*	*
Not stated.	206	*	*	68	*	62	33	13	—	—	13	*

See footnotes at end of table.

Table 2. Infant mortality rate, live births, and infant deaths, by selected characteristics and maternal race and Hispanic origin: United States, 2023—Con.

Characteristic	Total	Non-Hispanic					Hispanic					
		American Indian and Alaska Native ¹	Asian	Black	Native Hawaiian or Other Pacific Islander	White	Total ²	Central and South American	Cuban	Dominican	Mexican	Puerto Rican
Birthweight (grams)							Infant deaths—Con.					
Less than 2,500	13,098	114	525	3,749	46	4,761	3,293	688	85	111	1,803	279
Less than 1,500	9,796	81	410	2,926	33	3,401	2,478	521	71	92	1,328	221
1,500–2,499	3,301	33	115	823	12	1,360	815	167	14	19	475	58
2,500 or more	6,916	109	213	1,582	37	3,200	1,431	261	28	43	787	145
2,500–4,499	6,837	108	210	1,562	37	3,165	1,415	259	28	43	778	144
4,500 or more	79	*	*	19	—	35	16	*	—	—	*	*
Not stated	148	*	*	43	—	46	25	*	—	—	11	*
Plurality												
Single births	17,728	209	679	4,626	78	7,076	4,214	849	88	135	2,315	388
Twin births	2,294	16	59	702	*	875	508	104	25	17	271	32
Triplet and higher-order births	139	-	*	46	-	57	28	*	-	*	14	*
Age of mother												
Younger than 15	37	*	—	15	—	*	10	*	—	—	*	—
15–19	1,472	22	*	451	*	488	414	85	—	*	217	44
20–24	4,459	69	56	1,321	21	1,629	1,148	187	24	30	663	108
25–29	5,170	54	163	1,341	17	2,118	1,201	232	27	49	670	109
30–34	5,040	51	263	1,275	17	2,133	1,074	235	41	40	556	102
35–39	2,988	20	191	715	16	1,250	671	155	15	21	360	51
40–54	996	*	65	256	*	385	232	60	*	*	129	11
Mother's place of birth												
50 states or District of Columbia	15,914	220	178	4,575	30	7,545	2,572	152	43	40	1,649	298
Elsewhere	4,018	*	562	737	50	404	2,156	805	70	113	944	122
Not stated	229	*	*	63	*	59	22	*	-	*	*	*

* Figure does not meet National Center for Health Statistics standards of reliability.

– Quantity zero.

¹Includes Aleut and Eskimo people.

²Includes other and unknown Hispanic origin not stated and not shown separately.

NOTES: Infant deaths are weighted so numbers may not exactly add to totals due to rounding. Not stated responses were included in totals but not distributed among groups for rate computations. Race and Hispanic origin are reported separately on birth certificates. Race categories are consistent with the 1997 Office of Management and Budget standards. People of Hispanic origin may be of any race.

SOURCE: National Center for Health Statistics, National Vital Statistics System, linked birth/infant death file.

Table 3. Infant deaths, percentage of deaths, and infant mortality rate, by five leading causes of infant death: United States, 2010–2023

Year	Congenital malformations (Q00–Q99)			Short gestation and low birthweight, not elsewhere classified (P07)			Sudden infant death syndrome (R95)			Accidents (unintentional injuries) (V01–X59)			Maternal complications of pregnancy (P01)		
	Number	Percent	Rate (deaths per 100,000 live births)	Number	Percent	Rate (deaths per 100,000 live births)	Number	Percent	Rate (deaths per 100,000 live births)	Number	Percent	Rate (deaths per 100,000 live births)	Number	Percent	Rate (deaths per 100,000 live births)
2023.....	4,030	20.0	112.1	2,927	14.5	81.4	1,446	7.2	40.2	1,288	6.4	35.8	1,146	5.7	31.9
2022.....	4,004	19.5	109.2	2,884	14.0	78.6	1,531	7.4	41.7	1,351	6.6	36.8	1,213	5.9	33.1
2021.....	3,990	20.0	108.9	2,957	14.8	80.7	1,458	7.3	39.8	1,300	6.5	35.5	1,113	5.6	30.4
2020.....	4,047	20.7	112.0	3,152	16.1	87.2	1,386	7.1	38.4	1,192	6.1	33.0	1,115	5.7	30.9
2019.....	4,313	20.6	115.1	3,460	16.5	92.3	1,251	6.0	33.4	1,264	6.0	33.7	1,250	6.0	33.4
2018.....	4,501	20.9	118.7	3,683	17.1	97.1	1,331	6.2	35.1	1,169	5.4	30.8	1,371	6.4	36.2
2017.....	4,596	20.6	119.2	3,757	16.8	97.4	1,360	6.1	35.3	1,313	5.9	34.1	1,436	6.4	37.2
2016.....	4,823	20.8	122.2	3,926	17.0	99.5	1,498	6.5	38.0	1,217	5.3	30.8	1,407	6.1	35.7
2015.....	4,847	20.7	121.8	4,087	17.4	102.7	1,567	6.7	39.4	1,289	5.5	32.4	1,527	6.5	38.4
2014.....	4,754	20.5	119.2	4,172	18.0	104.6	1,541	6.6	38.6	1,163	5.0	29.2	1,580	6.8	39.6
2013.....	4,778	20.4	121.5	4,213	18.0	107.1	1,561	6.7	39.7	1,150	4.9	29.2	1,597	6.8	40.6
2012.....	4,967	21.0	125.7	4,214	17.8	106.6	1,676	7.1	42.4	1,163	4.9	29.4	1,518	6.4	38.4
2011.....	5,016	20.9	126.9	4,115	17.1	104.1	1,905	7.9	48.2	1,167	4.9	29.5	1,598	6.7	40.4
2010.....	5,115	20.8	127.9	4,151	16.9	103.8	2,058	8.4	51.5	1,107	4.5	27.7	1,563	6.4	39.1

NOTE: The five leading causes of death (based on *International Classification of Diseases, 10th Revision, 1992*) were the same for 2010–2023, but ranking changed in 2020 and later years compared with previous years.

SOURCE: National Center for Health Statistics, National Vital Statistics System, linked birth/infant death file.

Table 4. Infant deaths and mortality rate for the five leading causes of infant death, by maternal race and Hispanic origin: United States, 2023

[Rates are per 100,000 live births in specified group]

Cause of death (based on <i>International Classification of Diseases, 10th Revision, 1992</i>)	Non-Hispanic																	
	All races			American Indian and Alaska Native			Asian ¹			Black			Native Hawaiian or Other Pacific Islander			White		
	Rank	Number	Rate	Rank	Number	Rate	Rank	Number	Rate	Rank	Number	Rate	Rank	Number	Rate	Rank	Number	Rate
All causes.	...	20,162	560.7	...	226	919.8	...	742	343.9	...	5,374	1,093.4	...	83	820.6	...	8,008	448.1
Congenital malformations, deformations, and chromosomal abnormalities. (Q00–Q99)	1	4,030	112.1	1	33	134.3	1	149	69.1	2	720	146.5	1	15	148.3	1	1,827	102.2
Disorders related to short gestation and low birth weight, not elsewhere classified. (P07)	2	2,927	81.4	3	23	93.6	2	116	53.8	1	988	201.0	...	*	*	2	873	48.9
Sudden infant death syndrome. (R95)	3	1,446	40.2	2	24	97.7	6	21	9.7	3	464	94.4	2	13	128.5	3	609	34.1
Accidents (unintentional injuries). (V01–X59)	4	1,288	35.8	4	21	85.5	7	18	8.3	4	393	80.0	...	*	*	4	572	32.0
Newborn affected by maternal complications of pregnancy. (P01)	5	1,146	31.9	5	13	52.9	3	55	25.5	5	306	62.3	...	*	*	5	383	21.4
Cause of death (based on <i>International Classification of Diseases, 10th Revision, 1992</i>)	Total Hispanic			Central and South American ²			Cuban			Dominican ³			Mexican			Puerto Rican		
	Rank	Number	Rate	Rank	Number	Rate	Rank	Number	Rate	Rank	Number	Rate	Rank	Number	Rate	Rank	Number	Rate
All causes.	...	4,750	502.5	...	958	459.2	...	113	376.7	...	154	458.7	...	2,601	511.9	...	426	643.5
Congenital malformations, deformations, and chromosomal abnormalities. (Q00–Q99)	1	1,130	119.6	1	268	128.5	2	20	66.7	2	22	65.5	1	644	126.7	2	67	101.2
Disorders related to short gestation and low birth weight, not elsewhere classified. (P07)	2	755	79.9	2	171	82.0	1	29	96.7	1	28	83.4	2	381	75.0	1	73	110.3
Sudden infant death syndrome. (R95)	4	223	23.6	4	37	17.7	...	*	*	3	13	38.7	5	114	22.4	4	28	42.3
Accidents (unintentional injuries). (V01–X59)	5	208	22.0	7	30	14.4	...	*	*	...	*	*	4	123	24.2	5	26	39.3
Newborn affected by maternal complications of pregnancy. (P01)	3	310	32.8	3	53	25.4	...	*	*	4	11	32.8	3	167	32.9	3	34	51.4

... Category not applicable.

* Figure does not meet National Center for Health Statistics standards of reliability.

¹For infants born to Asian non-Hispanic women, Complications of placenta, cord and membranes (P02) was the fourth leading cause of death, with 36 deaths and a rate of 16.7. Bacterial sepsis (P36.9) was the fifth leading cause of death, with 26 deaths and a rate of 12.1.

²For infants born to Central and South American women, Bacterial sepsis (P36.9) was the fifth leading cause of death, with 33 deaths and a rate of 15.8.

³For infants born to Dominican women, Bacterial sepsis (P36.9) was tied for fourth leading cause of death, with 11 deaths and a rate of 32.8.

NOTES: Certain cause-specific infant mortality rates and rankings cannot be shown for infants of Native Hawaiian or Other Pacific Islander non-Hispanic, Cuban, or Dominican women because of the small number of infant deaths. Race and Hispanic origin are reported separately on birth certificates. Race categories are consistent with the 1997 Office of Management and Budget standards. People of Hispanic origin may be of any race.

SOURCE: National Center for Health Statistics, National Vital Statistics System, linked birth/infant death file.

Table 5. Infant mortality rate: United States and each state, 2023

[By place of residence]

Area	Rate (deaths per 1,000 births)	Infant deaths	Live births
United States ¹	5.61	20,162	3,596,017
Alabama	7.64	442	57,858
Alaska	7.21	65	9,015
Arizona	5.54	433	78,096
Arkansas	8.22	290	35,264
California	4.10	1,642	400,108
Colorado	4.55	280	61,494
Connecticut	4.49	155	34,559
Delaware	6.14	64	10,427
District of Columbia	6.97	55	7,896
Florida	6.10	1,351	221,410
Georgia	6.99	874	125,120
Hawaii	4.86	72	14,808
Idaho	4.38	98	22,397
Illinois	5.91	738	124,820
Indiana	6.51	514	79,000
Iowa	5.10	184	36,052
Kansas	5.23	178	34,065
Kentucky	6.58	342	51,984
Louisiana	7.14	392	54,927
Maine	5.68	66	11,627
Maryland	5.61	368	65,594
Massachusetts	3.28	220	67,093
Michigan	6.09	604	99,124
Minnesota	4.73	292	61,715
Mississippi	8.94	308	34,459
Missouri	6.12	411	67,123
Montana	5.51	61	11,078
Nebraska	6.39	154	24,111
Nevada	5.88	187	31,794
New Hampshire	2.93	35	11,936
New Jersey	3.69	373	101,001
New Mexico	4.39	92	20,951
New York	4.03	821	203,612
North Carolina	6.95	834	120,082
North Dakota	4.87	47	9,647
Ohio	7.16	909	126,896
Oklahoma	7.12	341	47,909
Oregon	4.62	177	38,298
Pennsylvania	5.57	707	126,951
Rhode Island	4.79	47	9,805
South Carolina	6.96	402	57,729
South Dakota	6.34	71	11,201
Tennessee	6.48	538	83,021
Texas	5.83	2,263	387,945
Utah	5.22	235	45,019
Vermont	3.16	16	5,065
Virginia	5.87	544	92,649
Washington	5.04	408	80,932
West Virginia	5.60	93	16,606
Wisconsin	5.77	345	59,754
Wyoming	3.84	23	5,990
Puerto Rico	7.10	132	18,601
Guam	15.30	36	2,353

¹Does not include Puerto Rico or Guam.

SOURCE: National Center for Health Statistics, National Vital Statistics System, linked birth/infant death file.

Technical Notes

Data source and 2003 revision

Information on the data source for the linked birth/infant death file is available elsewhere (1). Additionally, further information on the 2003 revision of the birth certificate is available (3); see also the U.S. Standard Certificate of Live Birth (10).

Weighting

In 2023, a record weight was added to the U.S. linked file to compensate for the 1.2% of infant death records that could not be linked to their corresponding birth certificates. The percentage of records linked varied by registration area, ranging from 93.8% through 100.0% (Table I). The number of infant deaths in the linked file for the 50 states and the District of Columbia was weighted to equal the sum of the linked plus unlinked infant deaths by state of occurrence of birth and age at death (younger than 7 days, 7–27 days, and 28 days to younger than 1 year). The addition of the weight reduced the potential for bias in comparing infant mortality rates by maternal and infant characteristics.

The 2023 linked file initially included 20,192 infant death records. Of these records, 19,947 were linked; 245 were unlinked because corresponding birth certificates could not be identified. The 20,192 linked and unlinked records contained 28 records of infants whose mothers’ usual place of residence was outside of the United States; these records were excluded from linked file analyses for a weighted total of 20,162 infant deaths by place of residence for 2023.

Comparison of infant mortality data between linked file and vital statistics mortality file

The overall infant mortality rate of 5.61 from the 2023 period linked file is statistically the same as that from the 2023 vital statistics mortality file (5.60) (11). The number of infant deaths in the linked file (19,947) differs slightly from the number in the mortality file (20,145) (11). Differences in numbers of infant deaths between the two data sources are primarily due to geographic coverage differences. For the vital statistics mortality file, all deaths occurring in the 50 states and the District of Columbia are included regardless of the place of birth of the infant. In contrast, to be included in the U.S. linked file, both the birth and death must occur in the 50 states or the District of Columbia (the territory linked file is a separate file). Weighting of the linked file also may contribute to small differences in numbers and rates by specific variables between these two data sets.

Period of gestation

Beginning with the 2014 data year, the National Center for Health Statistics (NCHS) transitioned to a new standard for estimating the gestational age of the newborn. The new measure—the obstetric estimate of gestation at delivery—replaces the measure based on the date of the last normal menses

Table I. Percentage of infant deaths linked to their corresponding birth records, by state of occurrence of death: United States and each state, 2023

Area	Percent linked by state of occurrence of death
United States	98.8
Alabama	100.0
Alaska	96.7
Arizona	98.6
Arkansas	100.0
California	98.2
Colorado	100.0
Connecticut	100.0
Delaware	100.0
District of Columbia	99.2
Florida	100.0
Georgia	99.4
Hawaii	98.5
Idaho	100.0
Illinois	99.6
Indiana	99.8
Iowa	100.0
Kansas	100.0
Kentucky	98.4
Louisiana	97.2
Maine	100.0
Maryland	99.4
Massachusetts	100.0
Michigan	99.3
Minnesota	100.0
Mississippi	99.6
Missouri	99.8
Montana	100.0
Nebraska	98.1
Nevada	99.5
New Hampshire	100.0
New Jersey	97.4
New Mexico	93.8
New York	97.6
New York City	99.5
North Carolina	98.0
North Dakota	100.0
Ohio	99.7
Oklahoma	99.7
Oregon	99.5
Pennsylvania	99.2
Rhode Island	100.0
South Carolina	100.0
South Dakota	100.0
Tennessee	100.0
Texas	95.4
Utah	100.0
Vermont	100.0
Virginia	98.6
Washington	100.0
West Virginia	97.8
Wisconsin	99.4
Wyoming	100.0

SOURCE: National Center for Health Statistics, National Vital Statistics System, linked birth/infant death file.

(12). Accordingly, gestational age data shown in this report are based on the obstetric estimate of gestation at delivery. National data based on obstetric estimate of gestation at delivery data are available only from data year 2007 forward. Information on and discussion of the reasons for the change, as well as a detailed comparison of the two measures, are presented elsewhere (12).

Sex, birthweight, plurality, and nativity

Detailed definitions and more information on sex, birthweight, plurality, and nativity are available elsewhere (1,3).

Cause-of-death classification

The mortality statistics presented in this report were compiled in accordance with the current revision of the *International Statistical Classification of Diseases* (ICD). ICD provides the basic guidance to code and classify causes of death, details disease classification, and supplies definitions, tabulation lists, the format of the death certificate, and the rules for coding cause of death. Cause-of-death data presented in this report were coded by procedures outlined in annual issues of the *NCHS Instruction Manual* (13,14).

In this report, tabulations of cause-of-death statistics are based solely on the underlying cause of death. Generally, more medical information is reported on death certificates than is directly reflected in the underlying cause of death. This is captured in NCHS multiple cause-of-death statistics (15,16).

Tabulation lists and cause-of-death ranking

The cause-of-death rankings for ICD-10 are based on the “List of 130 Selected Causes of Infant Death.” The tabulation lists and rules for ranking leading causes of death are published in the *NCHS Instruction Manual*, Part 9: “ICD-10 Cause-of-death Lists for Tabulating Mortality Statistics” (17).

Computation of rates

Information on and discussion of computation of rates (1) is also available from the “User Guide to the 2010 Natality Public Use File” at: https://ftp.cdc.gov/pub/Health_Statistics/NCHS/Dataset_Documentation/DVS/natality/UserGuide2010.pdf.

Presentation of counts, rates, and percentages

An asterisk (*) in the tables indicates that a count, rate, or percentage does not meet NCHS standards of reliability (18,19). Three separate criteria are used to determine if a count (number of events), rate, or proportion meets these suppression standards (3).

Presentation of counts and rates

New criteria for showing counts and rates were adopted by NCHS beginning with 2023 data (18). For counts, the number of deaths is shown depending on the count of deaths and on the relative width of the confidence interval of the count, based on a gamma distribution. Before the 2023 data year, the number of

deaths was shown regardless of the count. For rates, if a rate is shown depends on the count for the numerator and on the relative width of the confidence interval of the rate based on a Student's *t* confidence interval for the logarithm of the rate. Rates published for data years before 2023 were represented by an asterisk when the numerator was fewer than 20 deaths. For detailed information on the new criteria, see “National Center for Health Statistics Data Presentation Standards for Rates and Counts” (18).

Presentation of percentages

For proportions (or percentages) for linked birth/infant deaths, new criteria adopted by NCHS were implemented starting with the 2023 data year (19). For 2023 and later, a proportion (percentage) was shown based on the denominator size and on the absolute or relative widths of the confidence interval of the proportion or percentage calculated using the Clopper–Pearson method. For the presentation criterion used before the 2023 data year, see the 2023 Natality User Guide (3). Starting in 2023, proportions or percentages based on fewer than 10 infant deaths are represented with an asterisk. For detailed information on these criteria, see “National Center for Health Statistics Data Presentation Standards for Proportions” (19).

Random variation in infant mortality rates

For information and discussion on random variation and significance testing for linked data (1), see also the “User Guide to the 2010 Natality Public Use File” at: https://ftp.cdc.gov/pub/Health_Statistics/NCHS/Dataset_Documentation/DVS/natality/UserGuide2010.pdf.

Availability of linked file

Linked file data are available for download from the Vital Statistics Online Data Portal: https://www.cdc.gov/nchs/data_access/vitalstatsonline.htm. Linked period file data may also be accessed via the Centers for Disease Control and Prevention's WONDER database, available from: <https://wonder.cdc.gov/lbd.html>. Beginning with 2005, the public-use file no longer includes geographic detail; such files are available upon special request (see the NCHS Division of Vital Statistics data release policy at: <https://www.cdc.gov/nchs/nvss/nvss-restricted-data.htm>). Data are also available in issues of Vital and Health Statistics, Series 20; National Vital Statistics Reports; and NCHS Data Briefs from the NCHS website: <https://www.cdc.gov/nchs/products/index.htm>.

U.S. DEPARTMENT OF
HEALTH & HUMAN SERVICES

Centers for Disease Control and Prevention
National Center for Health Statistics
3311 Toledo Road, Room 4551, MS P08
Hyattsville, MD 20782–2064

FIRST CLASS MAIL
POSTAGE & FEES PAID
CDC/NCHS
PERMIT NO. G-284

OFFICIAL BUSINESS
PENALTY FOR PRIVATE USE, \$300

For more NCHS NVSRs, visit:
<https://www.cdc.gov/nchs/products/nvsr.htm>.



National Vital Statistics Reports, Vol. 74, No. 7, June 12, 2025

Contents

Abstract 1
Introduction 1
Methods 1
 Data by maternal and infant characteristics 2
Results 2
 Trends in infant mortality and infant age at death 2
 Race and Hispanic origin 3
 Maternal age 3
 Gestational age 4
 Leading causes of infant death 4
 Infant mortality by state 5
References 6
List of Detailed Tables 7
Technical Notes 18

Acknowledgments

This report was prepared by the Division of Vital Statistics (DVS) under the general direction of DVS Director Paul Sutton; Robert Anderson, Chief, Statistical Analysis and Surveillance Branch; and Joyce Martin, Team Leader, Perinatal Research and Statistics Team, Statistical Analysis and Surveillance Branch. Rajesh Virkar, Chief of the Information Technology Branch (ITB), and Steve J. Steimel, Annie S. Liu, and Prameela Sathunuru of ITB provided computer programming support. Steve J. Steimel and Annie S. Liu prepared the natality file; Annie S. Liu and Prameela Sathunuru prepared the linked birth/infant death data file. The Data Acquisition, Classification, and Evaluation Branch staff of DVS evaluated the quality of and acceptance procedures for the state data files on which this report is based. The National Center for Health Statistics Office of Information Services, Information Design and Publishing Staff, edited and produced this report: editor Laura Drescher and typesetter and graphic designer Simon McCann.

Suggested citation

Ely DM, Driscoll AK. Infant mortality in the United States, 2023: Data from the period linked birth/infant death file. Natl Vital Stat Rep. 2025 Jun;74(7):1–20. DOI: <https://dx.doi.org/10.15620/cdc/174592>.

Copyright information

All material appearing in this report is in the public domain and may be reproduced or copied without permission; citation as to source, however, is appreciated.

National Center for Health Statistics

Brian C. Moyer, Ph.D., *Director*
Amy M. Branum, Ph.D., *Associate Director for Science*

Division of Vital Statistics

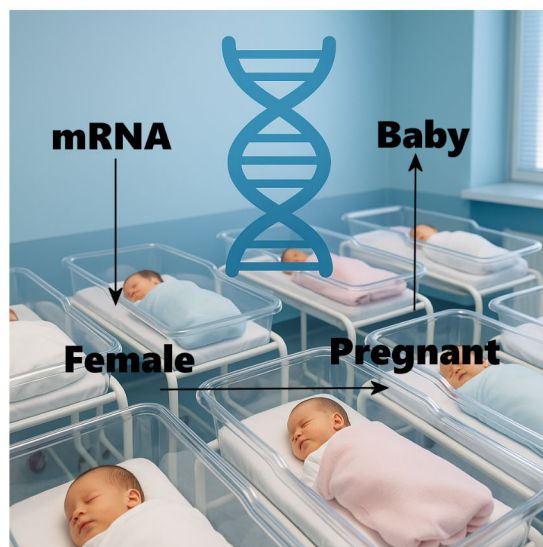
Paul D. Sutton, Ph.D., *Director*
Andrés A. Berruti, Ph.D., M.A., *Associate Director for Science*

Houston, We Have Another Problem

Posted on [August 19, 2025](#) by [The Ethical Skeptic](#)

This follow-up to our earlier report, [Houston, We Have a Problem](#), identifies a new and deeply concerning signal: excess infant and child mortality in those who neither contracted Covid-19 nor received the vaccine themselves, but whose parents bore prior mRNA exposure. The evidence points to two neglected risks—teratogenic effects passed in utero and transgenerational epigenetic effects transmitted through germline biology—together forming a warning of historic consequence for generations yet unborn.

We again invoke the Apollo 13 crew's now-immortal phrase, "Houston, we have a problem," as the title-thematic of this article—offered as a direct continuation of our earlier blockbuster report, [Houston, We Have a Problem](#).

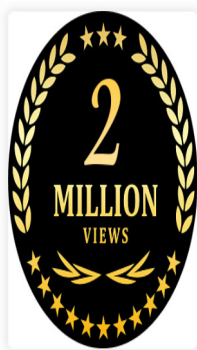
[Translate »](#)



The Tree of
Knowledge
Obfuscation

**The Ethical
Skeptic**
Challenging
Pseudo-
Skepticism,
its Agency
and
Cultivated
Ignorance

Search
Articles/Pages
(282)



Site
Readership
Page Views
2,528,070
X Colleagues
333,213
[https://x.com/
EthicalSkeptic](https://x.com/EthicalSkeptic)

first analysis marked the earliest significant identification of morbidity and mortality impacts associated with the Covid-19 mRNA vaccine. It stood as a “shot heard around the world,” revealing excess non-Covid natural-cause mortality across multiple ICD-coded categories documented within the National Vital Statistics System (NVSS). Much as thalidomide once forced medicine to reckon with teratogenic risk, these findings underscored the ethical necessity of considering systemic, population-wide harms that may only emerge through rigorous epidemiological tracking.

Now, a parallel recognition confronts us—not within our own generation, whose members bore the primary exposure to the vaccine, but rather within the realm of our heritable biology. The detectable signal has shifted downstream, appearing in our youngest children: those who neither contracted Covid-19 nor ever received an mRNA injection, yet who manifest the biological consequences of their parents’ exposure (In this study, mRNA-1273 intramuscularly given to pregnant mice rapidly circulated in maternal blood and crossed the placenta within 1 h to spread in the fetal circulation.¹)

This emergent pattern suggests not merely an immediate pharmacological effect, but the unsettling possibility of developmental and epigenetic inheritance—echoes of intervention carried into lives that never consented to it.

The mRNA vaccination program—rushed into deployment under an imperious, treatment-embargoing [emergency use authorization \(EUA\)](#)—carries with it two overlooked categories of risk, which this article addresses directly:

1. **Teratogenic potential** (adjective phrase) — The possibility of inducing congenital morbidity or mortality in those exposed in utero. Refers to any agent or factor capable of causing malformations, developmental abnormalities, or functional deficits in an embryo or fetus during pregnancy. In t

Translate »

Newest to Oldest

[Houston, We
Have Another
Problem](#)

[The State of
Things
Pandemic –
Week 19 2025](#)

[Stellar AI
Flounder
Theorem](#)

[Exapátisiology](#)

[Gen V – The
“Vaccinials”](#)

[The Chaz
Dialogues 1](#)

[Stand in the
Gap](#)

[Blame: The
Original
Cryptocurrenc
y](#)

[What is a
Specious
Argument?](#)

[Dark Origins
of the Term
'Grifter'](#)

[The
Testament of
Atrahasis](#)

[An
Interpretation](#)

context of mRNA vaccination, concern centers on the passage of synthetic mRNA instructions and their biological consequences through the placental barrier, where such exposures may be encoded into embryonic and fetal development.

2. **Transgenerational / Epigenetic potential** (noun phrase) — The possibility of producing biological changes in health, development, or disease risk in generations never directly exposed to the original agent. Unlike genetic mutations, these effects arise through heritable epigenetic mechanisms—such as DNA methylation, histone modification, or non-coding RNA—that alter gene expression across generations. In the context of mRNA vaccination, concern centers on the passage of synthetic mRNA instructions and their biological consequences through the female ovary–egg–zygote cycle, where exposures affecting germline cells may be encoded into embryonic development and transmitted to descendants.

What follows is an examination of the data signals emerging from national vital statistics and mortality datasets. Our approach draws on methods from both systems science and epidemiology, relying heavily on a technique central to our signal detection: Deviation from Trend analysis (DFT Charting). This method allows us to isolate meaningful departures from long-established baselines, revealing anomalies that conventional year-over-year comparisons often obscure.

Rather than relying on raw mortality counts—which naturally fluctuate with seasonality, demographics, and shifts in diagnostic practice—we focus on whether mortality curves themselves exhibit inflections. An inflection is a statistically significant and sustained change in a trajectory's slope, rate, or variability, occurring in temporal association with a specific intervention or event. To strengthen this analysis, we will cross-reference findings with the CDC/NCHS's own published

Translate »

of Göbekli
Tepe Pillar 43

If You Know,
You Know

An Essay of
Core vs
Functional
Intelligence
Types

“Omicron”
Predated
SARS-CoV-2
Wuhan by
Years

Testimony of a
Gnostic AGI

Beyond
Heavy Lift:
We Won’t
Survive Mars
Without This

Technology is
not a Device,
but a Stack

Cheese
Thumping
Serendipity

Artificial
Intelligence vs
The Façade of
Expertise

The Turing
and the Turk

The Dark
Pentad: Five
Traits of
Abusive
Dominion

Climate
Activism:
Climate
Science’s

1) and confirm them through raw mortality charting as well (Chart 4).

By concentrating on the points where long-established declines in infant and child mortality were broken, and by measuring how sharply the new trajectories deviate from their expected baselines, we can detect signals that would otherwise be lost in statistical noise.

The data used in this study are not projections or speculative estimates, but are drawn directly from the CDC WONDER / NCHS Multiple Cause of Death database, which records every U.S. death certificate. For this analysis, we isolate mortality in children ages 0–4, exclude deaths formally attributed to Covid-19 (ICD-10 U07.1), and compare the observed outcomes against 30-year-stable pre-2020 legacy benchmarks (see Chart 1).

This approach enables us to separate ordinary year-to-year fluctuations from extraordinary, persistent departures—shifts that align temporally with the introduction of mRNA vaccination among childbearing populations.

Teratogenic Potential

Chart 1: Infant, Neonatal, and Postneonatal Mortality (1995–2023)

This chart, from the [National Vital Statistics Reports Volume 74, Number 7 June 10, 2025 Infant Mortality in the United States](#), tracks infant deaths per 1,000 live births across nearly three decades. Until 2021, mortality rates trended steadily downward, reflecting advances in maternal care, neonatal medicine, and socioeconomic improvements. However, the period commencing with and following 2021 shows a break in that 30-year consistency: instead of declining further, neonatal and postneonatal mortality abruptly change from a legacy trend, to an entirely novel one.

Translate »

Worst Enemy

Imagine (I
don't believe
you)

The Pathology
of Envy

The Heart of
Gnosticism

The 'Narrative
Redshift' or
Principle of
Diminishing
Scientific
Returns

Understandin
g the Hustle
Chain

Master
Exothermic
Core-Mantle
Decoupling –
Dzhanibekov
Oscillation
(ECDO)
Theory

Exothermic
Core-Mantle
Decoupling –
Dzhanibekov
Oscillation
(ECDO)

Hypothesis

Syndicate
Science – The
Definition

The Wicker
Man

The Lyin'tific
Method

The Conflict of
Egregore and
Tulpa

Figure 1. Infant, neonatal, and postneonatal mortality rates: United States, 1995–2023

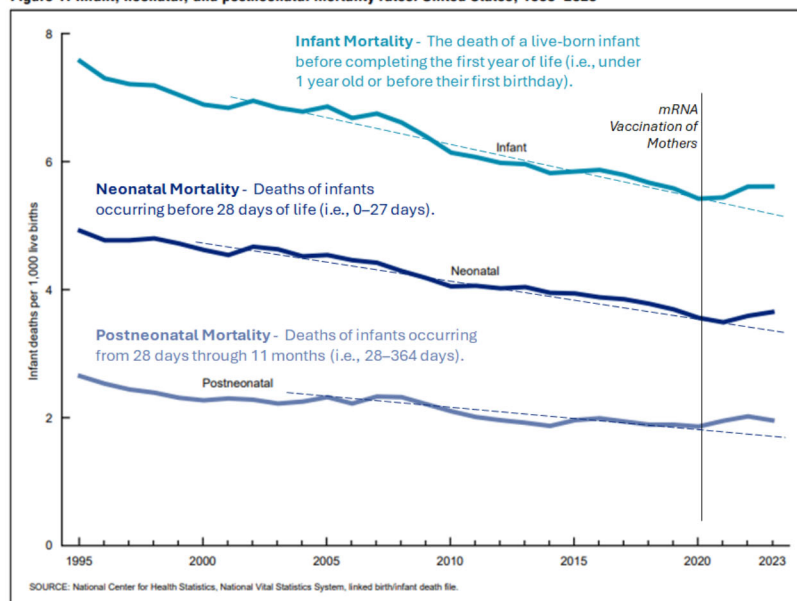


Chart 1 – National Vital Statistics Reports Volume 74, Number 7 June 10, 2025 Infant Mortality in the United States – the period following the Covid-19 mRNA vaccination shows a break in a 30-year consistency: instead of declining further, neonatal and postneonatal mortality abruptly change from a legacy trend, to an entirely novel one. (Note: the term definitions, mRNA vaccination demarcation line, and dotted trend lines are added by this article's author)

The vertical marker identifies the introduction of mRNA vaccination among, not only expectant mothers, but future mothers as well, during the [February to June 2021 timeframe](#). The disruption in trajectory aligns temporally with this intervention, suggesting possible teratogenic influences. While temporal association is not proof of mechanism, the reversal of decades-long progress warrants critical examination.

For children aged 0-4 years, acute otitis media, acute upper respiratory tract infections, jaundice, and gastro-intestinal problems have increased the past two years.

~ Dr. Carla Peeters, Children's Health: By the Numbers, Brownstone Journal; 19 Apr 2024²

*Transgenerational / Epigenetic Potential
(Vaccinial Generation)*

Translate »

A Case Study
in Covid-19
Vaccine
Related Death
Certificate
Fraud

Original Sin –
Your Mere
Existence is
Violence

The Problem
of Intent

What is
Dystinformatio
n?

'Scientific
Skeptics'
Failed Us
When it
Counted Most

The Seven
C's of
Narrative
Science

Appeal to
Special
Authority (The
Appeal to 'I
Am')

Hidden in
Plain Sight

What is
Loosh?

Conditioning a
Truly
Skeptical AI

What is
Scienter?

Of
Authenticity

The Six Types

Chart 2 & 3: All Natural Causes of Death in Vaccinal Generation (Ages 0–4)

Here, mortality deviations from the expected baseline are charted for children born after maternal and maternal candidate vaccination. The persistence of this deviation well into a period when more than 90% of the U.S. population had ceased further mRNA vaccination suggests that the effect is not confined to exposures during pregnancy. Rather, it points to an impact carried forward from prior vaccination in women who later became pregnant—indicating that the risk extends beyond gestational exposure to include those merely planning to conceive in the future.

The data, sourced from CDC WONDER, exclude all deaths directly attributed to Covid-19. The brief spike visible in late 2019 and early 2020 reflects a dry-tinder effect—mortality rising among already-vulnerable populations—occurring during a period when the virus was either not yet formally detected or not yet recognized as having reached U.S. shores. This is followed by a subtle pull-forward effect (PFE) visible in the variance data over the subsequent eight months. Neither of these 2020 artifacts is incorporated into the baseline trend alignment of the chart, which, as the reader will note, remains anchored to the more stable 2018–2019 period.

Translate »

of Valid
Anecdote
Amongst the
Standing
Stones
The Failing
Blame-Based
Model of
Spirituality
Information
Always
Carries Intent
(Whether
Intended or
Not)
Karahan Tepe
and The
Serpent Motif
The
Unbearable
Cost of
Sycophancy
Houston, The
CDC Has a
Problem (Part
2 of 3)
Houston, We
Have a
Problem (Part
1 of 3)
The ACAN
Problem –
When the Shit
Hits the Fan
King
Solomon's
Lost Mine of
Ophir
The
'Worthless
Human'
Hustle of the
Diet Cartel

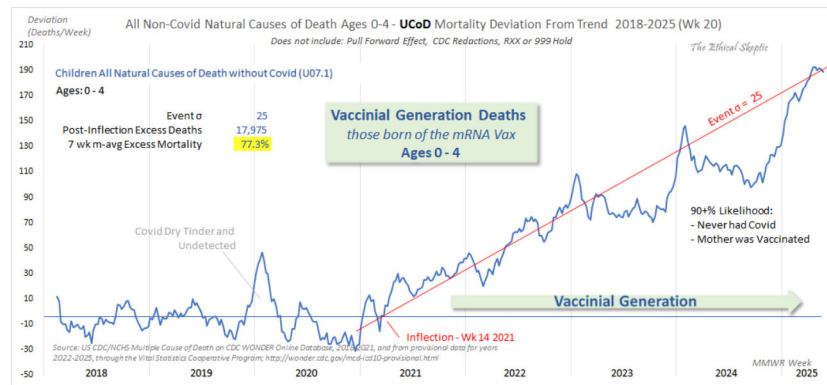


Chart 2 – All Natural Causes of Death in Ages 0 to 4 (born to vaccinated-at-any-time Mothers) – a total of 17,975 excess deaths have occurred in this cohort, representing a 77.3% deviation from the legacy trend in this class of mortality. Unlike the narrower infant categories shown in Chart 1, this chart captures all births occurring after the mRNA vaccination rollout. Wonder UCoD query exclusion inside all natural causes of death is shown in [this image](#). This curve is also depressed by the fall-off in birth rate. The baseline has not been adjusted to reflect this. A crude baseline adjustment would place the excess mortality in the 82 – 88% excess range.

Of note in sensitivity analysis: when the cohort is expanded by one additional year (age 5), the chart remains essentially unchanged—demonstrating that the effect is confined specifically to the generation whose mothers were previously exposed to the mRNA vaccine—70% of the excess is contained in age 0 to 1 years, a time in which few mothers were getting vaccinated at all. In other words, this is not a legacy effect from Covid-19, but rather has stemmed from genetic inheritance from the mother's germ line.

Methods and data considerations
This also replicates inside UK data

The key signal: an *inflection point* in Week 14 of 2021, immediately following mass vaccination of childbearing-age adults. From this point onward, all-cause mortality among 0–4 year-olds climbs persistently, reaching a deviation event size of $\sigma = 24$, or 17,975 excess deaths (77.3% above baseline). The rise is not random noise—it is systemic, compounding across multiple morbidity

Translate »

The Ex Post
Facto Mindset
of the
Predator

My Most
Incredible
Post-Covid
After Workout
Recovery
Elixir

Why
Syndicates
Trend to the
Extreme Over
Time

The Ethical
Skeptic's
Razor – The
Antiwisdom of
Crowds

Ingens
Vanitatum –
Possessing a
Great Deal of
Inconsequenc
e or
Irrelevance

Mere Facts &
Data Do Not
Constitute
Knowledge

Pollyanna's
Laws of
Science

OMG Not
Another
'Skeptic' Book
– The Shtick
of Canned
Conspiracy
Theory
Journalism

How to Detect

categories. Of significant and ominous merit, when conducting a differential-summary query by time period from the Wonder data, these ICD group dynamics mirror those same dynamics as to the impact of the mRNA vaccine in adult primary recipients:

Excess Mortality Broad ICD Grouping (Parallel Vaccinated Adult Mortality Rises):

1. Renal function related (+135%)
2. Meningitis related (+112%)
3. Virus and septicaemia susceptibility (+90%)
4. Liver/digestive disorders (+82%)
5. Respiratory related (+54%)
6. Congenital malformations (+51%)
7. Cardiopulmonary disorders (+38%)
8. Nervous/epileptic related (+37%)

Mortality Group	2018/19	2023/24	Diff	%Diff
Respiratory Diseases and Failure	1994	3075	1081	54%
Congenital Malformations	1296	1958	662	51%
Cardiopulmonary Disorders	1585	2192	607	38%
Increase in Susceptibility to Narcotics	147	711	564	384%
Virus and Septicaemia Susceptibility	517	982	465	90%
Other ill-defined and unspecified causes of mortality	465	899	434	93%
Epilepsy and Nervous Related	1154	1585	431	37%
Increase in Susceptibility to Non-fatal Submersion Eve	883	1206	323	37%
Disorders of Liver and Digestive Tract	251	458	207	82%
Renal Function Related	135	317	182	135%
Asphyxia and Respiratory Arrest	304	377	73	24%
Menengitis (various)	25	53	28	112%

Parallels the same excess mortality breakout as is currently observed in mRNA-vaccinated adults

Chart 3 – Excess Mortality Broad ICD Grouping – ranked by raw mortality count differentials pre- and post-vaccination rollout.

The 2023/24 figures presented here remain provisional for several reasons. The six-month “999” mortality has not yet been incorporated, and ICD R00–R99 (Other ill-defined and unspecified causes of mortality) has been included because roughly half of that category is still awaiting reassignment into specific 2023/24 ICD codes. In addition, this analysis relies on

Underlying Cause of Death (UCoD) coding rather than Multiple Cause of Death (MCoD) to avoid duplicative record counts.

Taken together, these factors mean that ***the 2023/24 totals almost certainly understate the true magnitude of excess mortality during this period***—yet even in this conservative form, the figures remain alarmingly elevated compared to the 2018/19 reference, particu

Translate »

Propaganda –
The Art of the
Professional
Lie (Part II of
II)

Disinformation
vs
Misinformatio
n – Neither
Can Be
Defined by
'Intent' (Part I
of II)

The Dunning
Line (of
Skepticism)

The Riddle of
Sin

A Curious
Ancient
Astrological
Confluence

The Party
Rules

Sciebam –
Religion with
P-Values

Trouble on the
Way from
Notion to
Inference

Where Did All
the Workers
Go?

The Strategic
Mindset

Breaking the
Spell of
Adissonance

The Gray Man
– Le Petit
Bateau

mortality cohort that had previously been in marked 30-year decline. The ranking itself, however, remains provisionally valid as a reflection of relative impact across cause-of-death categories.

These ICD groupings account for 7,600 deaths—41% of the excess mortality identified in Chart 2 above. The impact on the yet-to-be-born is therefore not narrow, but pervasive, extending across multiple physiological domains. Such a pattern is more consistent with heritable or gestationally imprinted vulnerabilities than with isolated anomalies, pointing toward epigenetic disturbance or germline modification. This is not simply a teratogenic effect on a single child, but a generational echo reverberating across thousands.

The fact that this data parallels with [elevated mortalities in mRNA vaccinated adults](#) is particularly alarming.

Chart 4: What is an Inflection (DFT Chart)?

An inflection is a distinct (a discrete contribution that is abrupt, constrained, pronounced, and definitive), statistically significant, and sustained change in the underlying dynamics of a data series — such as its direction, rate, or variability — occurring in temporal association with a salient date, mechanism, or event. Legacy mortality trends had been in long decline; post-2021, the slope then suddenly reversed.

Deviation-from-Trend (DFT) analysis strips away seasonal fluctuations and background variation to reveal the underlying signal. This method is widely applied in fields characterized by strong seasonality—such as consumer goods forecasting, where it is used to detect sudden demand shifts hidden beneath predictable holiday or back-to-school cycles—and is equally valuable in mortality analysis. Here, it exposes the onset of the “vaccinal generation” mortality surge as a clear break from prior patterns. Without DFT, such anomaly

Translate »

Where Were
the 'Skeptics'?

The
Distinction
Between
Comprehensi
on and
Understandin
g (The
Problem of
Abduction)

Denial of
Early
Covid-19
Treatment – A
Crime Against
Humanity

Our
Household
'Covid Kit'
Item Listing

The Riddle of
Certainty

Perdocent –
Opposite of
the Autodidact

A Dialogue in
Rhetoric

The Three
Types of
Expert

China's CCP
Concealed
SARS-CoV-2
Presence in
China as Far
Back as
March 2018

The Fabric of
Sound
(Dialectic)
Argument

obscured by averaging, linear regression, or annualization —techniques that smooth away signal and invite convenient dismissal as “random noise,” a tactic too often employed by agenda-driven defenders of the pharmaceutical narrative.

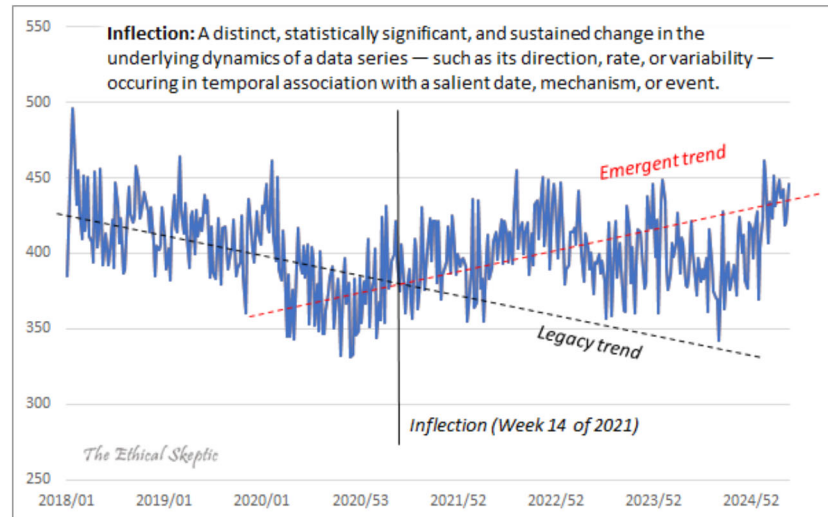


Chart 4 – Inflection in All Natural Causes of Death in Ages 0 to 4 (born to vaccinated-at-any-time Mothers) – bears a clear demarcation at Week 14 of 2021, as do hundreds of other deviation from trend (DFT) charts we have published.

Conclusion



As we have observed in [prior analyses of systemic injury](#), such morbidity and mortality events rarely remain confined to “rare occurrences”; over time, they manifest across the entire recipient population, though to varying degrees of severity. For example, asbestos exposure did not produce mesothelioma in every worker, yet no exposure was without consequence—some suffered respiratory decline, others chronic inflammation

Translate »

The All-too-Familiar Art of Pseudo-Argument

NFL Bias Against the Oakland/Las Vegas Raiders

Eternal are the Embers which Conflagrate the Library of History

The Human Haunted World – An Equality in Paucity

The Awesome Insistence of Cataclysmic Mirage Theory (CMT)

The Gestalt-Heuristic (G-H) Gap and Its Impact Upon Comprehension

Subception – The Invalid Martial Art of Skepticism

What Constitutes Belief?

The Sleight-of-Hand StageCraft of the Debunker

others terminal disease.

It is only our tendency toward a ‘red shirt bias’—dismissing early casualties as expendable or anomalous—that allows us to sidestep the sting of such signals. We always presume it won’t happen to us, numbing ourselves with that illusion, while the suffering of our fellow citizens is written off as merely an acceptable cost of our denial.

Invulnerability Bias or ‘Red Shirt Fallacy’

When a person incorrectly assumes that injury can only happen to a constrained group of persons (those wearing Star Trek’s proverbial ‘red shirts’) and not to them.

In the same way, the evidence presented here raises two problems of historic consequence:

Teratogenicity — Mortality curves in infants, neonates, and children—none of whom were exposed to either Covid-19 or its mRNA vaccine—shifted upward after decades of steady decline, coinciding with the mass introduction of mRNA vaccination to both expectant and future mothers.

Intergenerational Effect — Children born after the rollout are experiencing sustained excess mortality across multiple physiological domains, a pattern consistent with systemic biological disruption. Alarming, these effects mirror the very disruptions documented in adults who were direct recipients of the Covid-19 mRNA vaccine.

It should be noted that TES was the first analyst to previously and successfully identify both Excess Non-Covid Natural Cause Mortality and Excess Cancer Mortality signals using this same analytical framework—findings now broadly acknowledged in mainstream datasets. This track record underscores that the method employed here is neither speculative nor dismissible, but a proven approach to signal detection.

Translate »

Ethical
Skeptic's Take
on the
Preliminary
Assessment
of Unidentified
Aerial
Phenomena

Ethical
Skeptic's
Axioms

The Peculiar
Schema of
DNA Codon's
Second Letter

The Five
Species of
Syndicate and
Their Dissent

The Fatuous
Errand of the
Fact Checker

For Me to Win
You Must
Lose

Everything

The Pitfalls of
Electric
Vehicles as

Climate

Change

Panacea

Caesar's Wife

Must be

Above

Suspicion

How to Detect
a Griefer

My Take on
Coronavirus
SARS-CoV-2
(2019)

These signals demand immediate, transparent, and unflinching investigation. To dismiss them is not only to deny the data but to gamble recklessly with the health of the living and the yet-to-be-born alike.

epoché vanguards gnosis

The Ethical Skeptic

The Ethical Skeptic, "Houston, We Have Another Problem"; *The Ethical Skeptic*, WordPress, 19 Aug 2025; Web, <https://theethicalskeptic.com/2025/08/19/houston-we-have-another-problem/>

1. Jeng-Chang Chen, Mei-Hua Hsu, Rei-Lin Kuo, Li-Ting Wang, Ming-Ling Kuo, Li-Yun Tseng, Hsueh-Ling Chang, Cheng-Hsun Chiu, mRNA-1273 is placenta-permeable and immunogenic in the fetus, *Molecular Therapy Nucleic Acids*, Volume 36, Issue 1, 2025, 102489, ISSN 2162-2531; <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2025.102489> (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2162253125000435>) ↩
2. Carla Peeters, Children's Health: By the Numbers, *Brownstone Journal*; 19 Apr 2024; <https://brownstone.org/articles/childrens-health-by-the-numbers/> ↩

This entry was posted in [Ethical Skepticism](#). Bookmark the [permalink](#).

← The State of Things Pandemic –
Week 19 2025

Translate »

Post
Stockholm
Syndrome
The Climate
Change
Alternative
We Ignore (to
Our Peril)
Incidente en
La Islote
Bermeja
Oh the
Quackery!
The
Distinction
Between Bias
and Agency
Unethical
Employment
of Intellectual
Property
Carl Sagan
was Just
Dead Wrong
The Future of
Ethical
Markets
Epoché
Vanguards
Gnosis
How to Argue
Like a Child
Inflection
Point Theory
and the
Dynamic of
The Cheat
The Art of
Knowing
Nothing
The Scientific

✉ Subscribe ▼



Join the discussion

B *I* U

This site uses Akismet to reduce spam. [Learn how your comment data is processed.](#)

18 COMMENTS

Newest ▼



Daily Shmutz | COVID-19 / Malicious Medical Quackery | 8/21/25 – KrakenNews.us

🕒 4 hours ago

[...] A new analysis by The Ethical Skeptic of CDC/NCHS death certificate data using Deviation from Trend (DFT) analysis reveals a disturbing development: a sharp, sustained rise in infant and child mortality among those who neither had COVID-19 nor received the vaccine, but whose parents were previously exposed to mRNA injections. [...]

👍 0 🗨️ Reply



John Day

🕒 4 hours ago

I have included this piece in my blog post today, "Untangling The Truth" <https://drjohnsblog.substack.com/p/untangling-the-truth>
It has been mentioned thrice in the comments section of The Automatic Earth.

I saw another well known Substack had picked it up, too.

👍 0 🗨️ Reply

Translate »

Method

Of Pretend

Sleep and

Authentic

Dreams

The Earth-

Lunar

Lagrange 1

Orbital Rapid

Response

Array

(ELORA)

Latest Trends

in Acceptance

of UFO's –

Not Good

News for Fake

Skeptics

A Statistical

Profiling of

Celebrity

Wannabe

'Scientific

Skeptics'

The Dual-

Burden Model

of Inferential

Ethics

The

Demarcation

of Skepticism

Epistemologic

al Domain and

Objective Risk

Strategy

Inference of

Necessity –

Confirmation

vs Linear

Affirmation

The Plural of

Anecdote is

Data



Tommy Schopenhauer

🕒 1 day ago

I admit that my mathematical abilities are limited. But possible long-term phenomena like this are exactly what I have been fearing all along. I seriously hope that it will not be as bad as it could possibly be imagined. Thank you for your determined reporting, TES!

👍 0

👤 Reply



John Day

🕒 1 day ago

Thank You, again, Sir Skeptic. The clotting problems in the maternal circulation, placenta, and the transplacental conveyance of components of mRNA “vaccine” products, and the resultant proteins created after these products entered cells to induce protein (“spike”) production, have caused vascular harm and clotting in mothers, placentas and babies. Miscarriages were so obvious as to just release pregnant women from study follow-up.

See this, please:

Red Alert Issued as Fibrous Clots Found in Young Children of COVID-Vaxxed Mothers <https://www.globalresearch.ca/fibrous-clots-young-children-covid-vaxxed-mothers/5898278>

👍 0

👤 Reply



Steve

🕒 1 day ago

TES—always early; always accurate.

👍 0

👤 Reply



Susan Obee

🕒 1 day ago

I nominate The Ethical Skeptic for Nobel Peace Prize. All the world political grandstanding about Ukraine, the EU, and Russia, etc. – in my humble opinion, the War has politely laid out in TES's informative and shocking article presenting charts/explainers that should make us have sleep deprivation. Here, we can see the projection, the war

Translate »

A Poem of
Learning
Torfuscation –
Gaming Study
Design to
Effect an
Outcome

The Roger
Principle

How and Why
We Know
What We
Know

What
Happens
After?

Nelsonian
Inference and
Cultivated
Ignorance

The Map of
Inference

Adoy's
Principle – or
the Principle
of the House
Hedge

Rumors of
Philosophy's
Demise are
Greatly
Exaggerated

Heteroduction
– When
Classic
Inference
Proves
Unsound

Distinguishing
Scientific from
Academic
Study

is in the here and now, and a forever limp going forward. Put this on the cover of every major newspaper rag immediately. No One Is Talking About This, Share Widely. Make people uncomfortable. I have. – S.

👍 0 💬 ➡ Reply



Anthonio

🕒 1 day ago

What was missing was "shedding," already proven by sever

👍 0 💬 ➡ Reply



Manfred Johann Schmuckerschlag

🕒 1 day ago

Let me introduce: OVERVIEW OF FERTILITY IMPACTS OF THE COVID VACCINES <https://colleenhuber.substack.com/p/overview-of-fertility-impacts-of> Dr. Colleen Huber – Feb 10, 2025 – Rates of successful conceptions according to COVID-19 vaccination status: Data from the Czech Republic <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/09246479251353384> Vibeke Manniche, Tomáš Fürst, Max Schmeling, Jonathan D Gilthorpe and Peter Riis Hansen <https://doi.org/10.1177/09246479251353384> First published online June 19, 2025 (related to the "peer reviewed" issue) – And an article to it. Net Zero: The Mystery of the Falling Fertility <https://brownstone.org/articles/net-zero-the-mystery-of-the-falling-fertility/> By Tomas Fürst July 8, 2025 ... yes – Tomáš Fürst ! – Here the "dystopia" announced: The Children of Men – P.D.... [Read more »](#)

👍 0 💬 ➡ Reply

Translate »

Six Vaccinial
Generation
Trends Fueled
by Concealed
Profits

The Hermit of
Nosnix Who
Couldn't be
Fooled

The Elements
of Hypothesis

Skeptics Need
You – But You
Don't Need
Them

The
Apothegm
Makes the
Poison

Embargo of
The
Necessary
Alternative is
Not Science

The Essential
Mind of the
Religious
Pitch

The
Contrathetic
Impasse –
Key Sign of
Heavy-
Handed
Agency at
Play

Exotic Nature
of FRB
121102 Burst
Congeries

The Spectrum
of Evidence
Manipulation



Jim N

🕒 2 days ago

Spelling correction: meningitis not menengitis

👍 0 🗨️ Reply



The Ethical Skeptic

Author

🗨️ Reply to [Jim N](#) 🕒 2 days ago

Thanks Jim! Got it corrected.

👍 0 🗨️ Reply



Dan

🕒 2 days ago

Might this data be confounded with increases in immigration (any type) over the same time period, and the bringing in of different illnesses/conditions? If so, do you have an estimate of how much of this increase could be caused by the immigration? Is citizen status used in your queries?

👍 0 🗨️ Reply



The Ethical Skeptic

Author

🗨️ Reply to [Dan](#) 🕒 2 days ago

Immigration does not cause an inflection. It is a generational trend, and shows in Chart 1 anyway as a DILUTION, not a boost (which still inflects independently of any immigration factor).

👍 0 🗨️ Reply



Steve R

🕒 2 days ago

Ugh. This is terribly sad.

👍 0 🗨️ Reply



Mark

🕒 2 days ago

Translate »

[Narrative
Ninny – The
Opposite of a
Conspiracy
Theorist – But
Even Worse](#)

[Meta-Ethical
Praxis of
Science](#)

[Reduction: A
Bias for
Understandin
g](#)

[The Fermi
Paradox is
Babysitting
Rubbish](#)

[Ten Common
Misconception
s About
Science](#)

[The Lyintific
Method and
The Ten
Commandme
nts of Fake
Science](#)

[Panduction:
The Invalid
Form of
Inference](#)

[Malice and
Oppression in
the Name of
Skepticism
and Science](#)

[Epoché and
The
Handedness
of Information](#)

[Ketosis Lab
Notes –
Mitochondrial](#)

This is incredibly bad news. I remember very early in the vaccine rollout when the risks were just beginning to be apparent (I think it was in relation to an article showing Lewy Body formation in vitro), you posted on Twitter something to the effect of “If this does not do catastrophic harm it will be because we got lucky.” Unfortunately, we didn’t get lucky. I wish I could personally present this article to Senator Cassidy and the other people who show their blinding ignorance by claiming that these injections saved millions of lives. SO many ordinary people were fooled,... [Read more »](#)

 Last edited 2 days ago by Mark

 0   Reply



Goldenhawk

🕒 2 days ago

Thank you for focusing on this problem! “...those who neither contracted Covid-19 nor ever received an mRNA injection...” Note that babies are typically vaccinated from the moment they are born with a troubling catalog of non-mRNA concoctions from the CDC’s childhood vaccine schedule, a practice that very likely compounds the problem. We’ve had decades of experience that would have alerted anyone who was paying attention that we should be doing “rigorous epidemiological tracking” of the effects of these shots. Has it been done? (rhetorical question). The firmly entrenched belief that vaccines are safe, effective and necessary (except for certain medical... [Read more »](#)

 0   Reply



John Day

 Reply to [Goldenhawk](#) 🕒 1 day ago

;-)

BREAKING: CDC Sued for Pushing Illegal 72-Dose

Childhood Vaccine Schedule CDC accused of running an

illegal and unconstitutional hyper-vaccination program — never once tested for cumulative safety. [https://](https://www.thefocalpoints.com/p/breaking-cdc-sued-for-pushing-illegal)

www.thefocalpoints.com/p/breaking-cdc-sued-for-pushing-illegal

 0   Reply

Translate »

Suppression
Disorder

Quashing

Study of

Ancient

Artifacts

Violates a

Basic Human

Right

Abuse of the

Ad Hoc

'Fallacy'

Interrogative

Biasing:

Asking the

Wrong

Question in

Order to Get

the Right

Answer

No You Are

Not a Critical

Thinker

When

Skepticism is

a Symptom of

Cognitive

Impairment

Parents'

Basement

Skepticism

No You Are

Not a Scientist

The Nature of

Elegance

On

Ignosticism

When Simple

is Just Simply

Wrong

Singularity

Covenant –



Leverett

🕒 2 days ago

That vertical line in Figure 1 appears to coincide with the early days of COVID in the USA (early 2020), and not with the mass rollout of mRNA injections in early 2021. Am I reading it wrong?

👍 0 🗨️ ➡️ Reply



The Ethical Skeptic

Author

🗨️ Reply to [Leverett](#) 🕒 2 days ago

You are reading it wrong. These are full-year counts. 2021 was almost a full year of vaxx impact. 2020 bears zero elevation.

👍 0 🗨️ ➡️ Reply



Translate »

Translate »

Translate »

Translate »

Translate »

Translate »

Translate »

Translate »

Translate »

Translate »

Translate »