

Convegno SIPNEI

Le vaccinazioni e il sistema immunitario infantile.

Evidenze, ipotesi, proposte.

Roma > 18 novembre 2017

Testo pubblicato su SIPNEI-News (Franco Angeli), n. 1-2018, pp 18-40

<http://sipnei.it/pnei-review/01-2018-oltre-vaccini-prendersi-cura-del-sistema-immunitario-infantile/>

La complessità in immunologia, dalla molecola al gregge

Paolo Bellavite

Medico chirurgo, già Professore Associato di Patologia generale, Dipartimento di Medicina, Università di Verona, Strada Le Grazie 8, 37134 Verona. Mail: paolo.bellavite@univr.it

Riassunto

Per quanto la complessità del sistema immunitario sia fuori discussione, le applicazioni pratiche della vaccinologia sono spesso improntate a strategie semplicistiche e basate su un pensiero "lineare". In questo lavoro sono evidenziati i meccanismi di base delle difese dalle infezioni, con un particolare approfondimento sui meccanismi molecolari di riconoscimento degli antigeni del virus dell'influenza. Identificando alcuni tipi di anticorpi contro l'emoagglutinina si è iniziato a comprendere anche le basi molecolari dell'autoimmunità verso tali antigeni. L'autoimmunità, in generale, può essere indotta dalle infezioni in particolari soggetti predisposti, ma può essere una rara conseguenza anche della vaccinazione, per l'interazione tra antigeni specifici, adiuvanti aspecifici, macrofagi e sistema immunitario. La complessità in vaccinologia deriva da molti fattori, legati all'intervento vaccinale vero e proprio (efficacia del vaccino, coperture, effetto gregge) oppure emergenti dallo stesso uso dei vaccini su larga scala (comparsa di ceppi resistenti, vaccinati portatori, spostamento dell'insorgenza di malattie ad età adulte, preoccupazioni per eventi avversi). Identificare i punti critici che ancora ostacolano un unanime giudizio sui vari vaccini è la premessa per promuovere un loro uso più efficace ed indirizzare la ricerca verso obiettivi utili a tal fine.

Abstract

Although the complexity of the immune system is out of the question, the practical applications of vaccinology are often based on simplistic strategies based on "linear" thinking. In this paper the basic mechanisms of infection defenses are highlighted, with a particular study of the molecular mechanisms of recognition of influenza virus antigens. By identifying some types of antibodies against hemagglutinin, the molecular basis of autoimmunity to these antigens has also begun to be understood. Autoimmunity, in general, can be induced by infections in particular predisposed subjects, but it can also be a rare consequence of vaccination, due to the interaction between specific antigens, nonspecific adjuvants, macrophages and immune system. The complexity in vaccinology derives from many factors, related to the actual vaccination intervention (vaccine efficacy, coverage, herd effect) or emerging from the very use of large-scale vaccines (appearance of resistant strains, vaccinated people as carriers, shift of disease onset at adult age, concerns for adverse events). Identifying the critical points that still hinder a unanimous opinion on the various vaccines is the premise to promote their more effective use and to direct research towards objectives useful for this purpose.

Parole chiave

Sistemi complessi, difese biologiche, influenza, autoimmunità, adiuvanti, vaccinazioni

Key-words

Complex systems, biological defenses, influenza, autoimmunity, adjuvants, vaccinations

Introduzione

Quanto più si indagano le proprietà tipiche dei sistemi viventi, dei sistemi sociali e dell'ambiente naturale, tanto più vengono alla luce i molteplici, complessi e fini meccanismi di regolazione, fatto che rende ultimamente difficile prevedere il risultato di un intervento basato sulla modifica di uno o pochi componenti del sistema stesso. Il termine *complessità* è molto generico e non è facilmente definibile: con esso s'intende identificare quelle problematiche o quei fenomeni, emergenti in qualunque ambito scientifico, che si presentano come *non interamente riducibili*, cioè non scomponibili in problemi o fenomeni più elementari: *“Un sistema complesso ed adattativo è un insieme di agenti individuali liberi di agire in modi non totalmente predicibili e le cui modificazioni dinamiche sono così interconnesse che l'azione di un fattore cambia il contesto per gli altri fattori”* (Plsek and Greenhalgh 2001). Nella visione della complessità si attribuisce particolare rilevanza alle interazioni all'interno di un sistema e con altri sistemi, non solo alle componenti individuali. Infatti, dalle interazioni emergono comportamenti nuovi e spesso imprevedibili e “non-lineari”, nel senso che il risultato finale non dipende dall'intensità del cambiamento di un solo fattore. Il dualismo tra riduzionismo e complessità è evidente in ogni campo della medicina e non può essere risolto, né teoricamente, né sul piano pratico. Sia l'approfondimento delle conoscenze sul livello molecolare, sia il tentativo di costruire modelli più complessi ed onnicomprensivi hanno una loro importanza ed una loro utilità. In questo breve lavoro si cercherà di tratteggiare solo alcuni aspetti di tali problematiche, vale a dire quelli che toccano più da vicino il problema della resistenza alle malattie infettive e la vaccinologia.

Patologia generale delle malattie infettive

Il rischio di contrarre una malattia infettiva dipende da molti fattori genetici ed acquisiti, che potrebbero essere compendati nel “*rapporto*” tra la patogenicità del microbo e le resistenze individuali. La figura 1 illustra i principali fattori determinanti tale rapporto. Per ragioni di brevità non è qui possibile descrivere in dettaglio ciascuna di tali variabili, ma è evidente che esse comprendono, per la parte che riguarda i microbi, sia la virulenza del microbo sia l'igiene e l'incidenza della malattia. La storia della medicina e l'epidemiologia moderna concordano nel dare importanza fondamentale all'igiene ambientale e alla potabilizzazione delle acque nella scomparsa della maggior parte delle malattie infettive e delle epidemie che hanno afflitto l'umanità nei secoli.

Per la parte dell'ospite, va sottolineata innanzitutto l'importanza delle componenti delle difese “aspecifiche” o “innate”, le quali si oppongono all'aggressione microbica ben prima che insorga l'immunità vera e propria. Tra questi meccanismi biologici si trovano i protagonisti del processo infiammatorio, che è il primo sistema di difesa e di riparazione dei danni esogeni o endogeni. In altre parole, se è vero che il sistema immunitario specificamente si occupa della difesa verso tossine e virus come “seconda linea”, è anche vero che gran parte del lavoro di protezione avviene prima che il microbo riesca a penetrare e diffondersi nell'organismo. Un altro aspetto delle difese biologiche, che spesso viene trascurato in favore di una visione “centrata sugli anticorpi”, riguarda le citochine e gli interferoni, proteine potentissime prodotte dal nostro organismo. Esse sono capaci di “incentivare” o “controllare” (secondo il tipo) lo sviluppo della risposta immunitaria, ma anche di difendere le cellule dall'infezione virale in modo aspecifico, prima ancora che si sviluppino gli anticorpi. D'altra parte, i microbi hanno sviluppato dei sistemi per indebolire o neutralizzare tali difese: ad esempio, la tossina della pertosse è un fattore di virulenza in quanto blocca i sistemi di trasduzione dei segnali cellulari, mentre le proteine P e V del morbillo, interagendo con STAT1 e Jak1, bloccano il segnale dei recettori degli interferoni di tipo 1 (Gerlier and Valentin 2009).

Un altro aspetto di grande importanza, illustrato in Figura 1, è l'*interazione* tra i vari attori delle difese biologiche. È ben noto che l'immunità innata collabora con quella specifica (ad esempio mediante la presentazione degli antigeni, la produzione di citochine, la flora batterica saprofitica, il ruolo delle cellule NK)

e viceversa l'immunità acquisita (anticorpi e linfociti specificamente attivati) potenzia quella innata (ad esempio mediante l'opsonizzazione dei batteri, la neutralizzazione delle tossine, la barriera sopra e sottomucosale). Va segnalato inoltre il fatto che lo stato di nutrizione svolge un ruolo fondamentale nella salute e specificamente nelle difese biologiche, tanto che le campagne di vaccinazione nei Paesi a risorse limitate sono accompagnate da interventi quali la somministrazione di vitamina A, che aumenta la resistenza ai virus e l'efficacia del vaccino. Inoltre, diversi studi suggeriscono che anche la vitamina C (Nahas and Balla 2011) e la vitamina D (Gois *et al.* 2017) hanno un ruolo nella prevenzione o difesa contro le infezioni virali, le quali certamente sono accompagnate da stress ossidativo a livello cellulare (Camini *et al.* 2017; Valyi-Nagy and Dermody 2005).

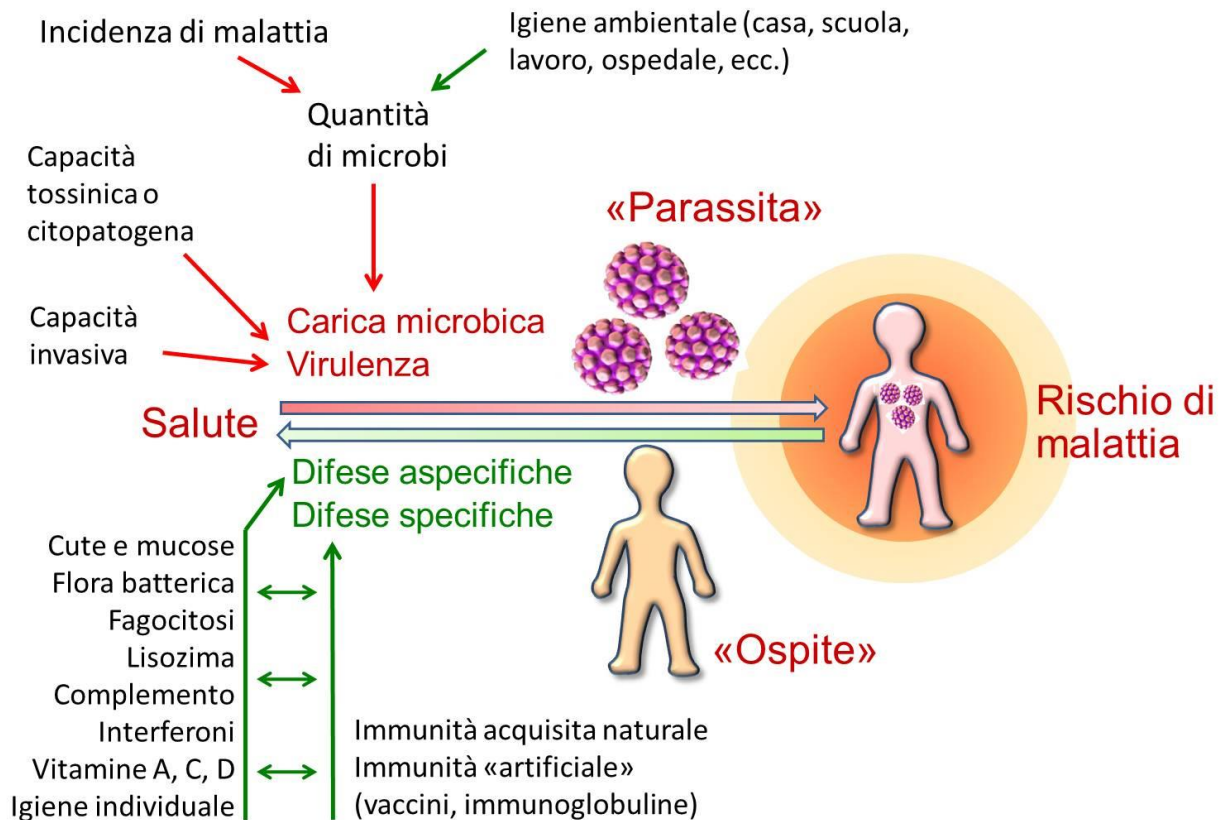


Figura 1. Rappresentazione dei principali fattori determinanti il rischio di contrarre una malattia infettiva

Poiché gli organismi viventi si trovano perennemente sottoposti a stress ed aggressioni di vario tipo, lo sviluppo di processi infiammatori, più o meno evidenti, è inevitabile e può persino essere considerato come un fatto positivo, in quanto contribuisce ad incrementare le difese naturali stesse. Vi sono manifestazioni del processo infiammatorio che si inquadrano con gran facilità come uno “scotto da pagare” al fine di raggiungere l'effetto dell'eliminazione degli agenti patogeni. Queste sono, ad esempio, gran parte delle sintomatologie che accompagnano le malattie infettive acute (febbre moderata, astenia, anoressia, dolore della parte colpita, esantemi). D'altra parte, vi sono fenomeni infiammatori francamente ingiustificati e, quindi, prevalentemente dannosi all'organismo, e questi sono, ad esempio, quelli legati all'autoimmunità, alle suppurazioni di tipo ascessuale, o a quei difetti dei sistemi inibitori dell'infiammazione (es. angioedema ereditario), o al rigetto dei trapianti. In mezzo, fra questi due estremi, si trova un'ampia serie di situazioni fisiopatologiche in cui l'infiammazione, pur iniziata a fini difensivi e/o riparativi, diviene per varie ragioni un meccanismo patogenetico che condiziona, anche pesantemente, l'evolvere della malattia stessa. In questi casi, i processi fisiopatologici innescati oscillano tra il dannoso e il difensivo in continuo disequilibrio. Il processo infiammatorio non riesce a raggiungere il suo scopo riparativo e viene coinvolto in un “disordine organizzativo” generale dell'organismo per cui il finalismo originario va perduto. Ciò avviene nelle principali

malattie croniche che affliggono la popolazione dei Paesi ricchi ed ha luogo spesso in modo subdolo, mediante piccoli passaggi che possono passare inosservati (Bellavite 2009).

La risposta immunitaria specifica a una sollecitazione antigenica è un processo complesso per eccellenza, la cui regolazione coinvolge l'interazione di parecchi tipi cellulari tra cui linfociti B, T, macrofagi, senza dimenticare le mucose ma anche il sistema neuroendocrino. Le interazioni tra cellule e molecole da esse prodotte sono spesso del tipo a feed-back o, meglio, a rete. Ad esempio, gli anticorpi prodotti sono a loro volta antigeni per altri anticorpi (gli anticorpi che riconoscono come antigene il sito combinatorio di altri anticorpi si chiamano anti-idiotipi), il tutto composto di una catena di reazioni che coinvolge un gran numero di cloni che formano il repertorio immunoglobulinico. È accertato che il network formato dall'interazione idiotipo-antiidiotipo gioca un importante ruolo nella regolazione della risposta immune, potendo alternativamente assumere carattere soppressivo o stimolatorio e quindi divenendo fonte di oscillazioni. Un'altra fonte di variabilità e oscillazioni può essere data dalle cellule T che sono in grado di regolare altre cellule in grado, a loro volta, di amplificare la risposta immune. Analizzando le dinamiche dell'andamento della produzione di un certo anticorpo specifico e dell'anticorpo anti-anticorpo, si è visto che esse presentano sempre delle oscillazioni in cui si vedono le loro concentrazioni fluttuare con picchi ricorrenti. È interessante il fatto che simili oscillazioni siano molto irregolari (Andrighetto and Zoller 1987; Bellavite *et al.* 1995). Tale andamento irregolare potrebbe essere dovuto all'interazione fra più sistemi oscillanti ciascuno singolarmente e in modo antagonistico. Il fatto che le dinamiche del sistema immunitario siano finemente regolate e rispondano a meccanismi omeodinamici che generano oscillazioni potrebbe spiegare le diversità inter-individuali di risposta agli antigeni e persino stati di immunodeficienza transitoria dopo la malattia infettiva o dopo la vaccinazione.

Influenza

Per illustrare, con un esempio di una patologia comune, i problemi legati alla complessità delle malattie infettive ed alcune sfide che si pongono all'immunologia, si presenta qualche spunto sull'influenza, malattia respiratoria acuta che si trasmette per via aerea. Va precisato che, nella comune pratica clinica, si parla più correttamente di "sindromi simil-influenzali", perché esistono tanti tipi diversi di virus che provocano sintomi simili e, nella maggioranza dei casi considerati come influenza, mancano l'isolamento del virus e la conferma sierologica.

A seguito dell'infezione virale, scattano una serie di fenomeni biologici e patogenetici che rappresentano la reazione al danno cellulare causato dal virus. Sono queste reazioni, inizialmente finalizzate alla difesa e alla riparazione, che causano i sintomi e che possono anche causare notevoli complicazioni: a) Attivazione di meccanismi aspecifici di infiammazione (istamina, chinine, complemento) con edema e difficoltà respiratorie per ostruzione bronchiale; b) attacco degli anticorpi e di linfociti T a virus e a cellule infettate da virus, le quali espongono proteine virali sulla loro superficie; c) formazione di un ampio fronte di focolai infiammatori linfomonocitari mucosi e sottomucosi con generazione di citochine pro-infiammatorie (es.: IL-1, IL-6, TNF, ecc.) che si diffondono in sede locale e generale; d) Violenta attivazione secondaria di fenomeni sistemici da parte delle citochine: febbre con brividi, mialgie, attivazione della sintesi di proteine della fase acuta nel fegato, alterazione delle proteine sieriche e della sedimentazione ematica, aumento del metabolismo basale, aumento di coagulazione e di fibrinolisi, attivazione del sistema adrenergico e cardiovascolare.

Almeno per le forme più gravi, si è visto che il quadro immunopatologico dipende da un'eccessiva induzione delle citochine infiammatorie e da una disregolazione dei loro segnali. Il fenomeno è stato denominato "tempesta di citochine" (*cytokine storm*) (Chan *et al.* 2005; Wong and Yuen 2006). Fra l'altro, un'eccessiva produzione di citochine induce anche l'apoptosi delle cellule della mucosa respiratoria, in paradossale sinergia con il virus stesso ed induce danni al sistema cardiovascolare. La complessità di un quadro acuto di questo genere è tale che, di fatto, gli interventi normalmente si limitano alla prescrizione del riposo a letto ed eventualmente al controllo di alcuni sintomi. Tutto ciò non fa che confermare la difficoltà di intervenire in una malattia apparentemente così semplice come eziologia ma così complessa come patogenesi.

La difesa dai virus e la guarigione dalla malattia dipendono in gran parte, ma non solo, dall'efficienza del sistema immunitario, vale a dire dalla produzione di anticorpi specificamente diretti contro il virus e particolarmente contro le sue proteine di superficie, che il virus stesso usa per intercettare i recettori delle

cellule da parassitare (Figura 2). Quando il virus riesce ad entrare nella cellula, intervengono i sistemi di difesa basati sull'interferenza virale (qui solo menzionati, in Figura 1).

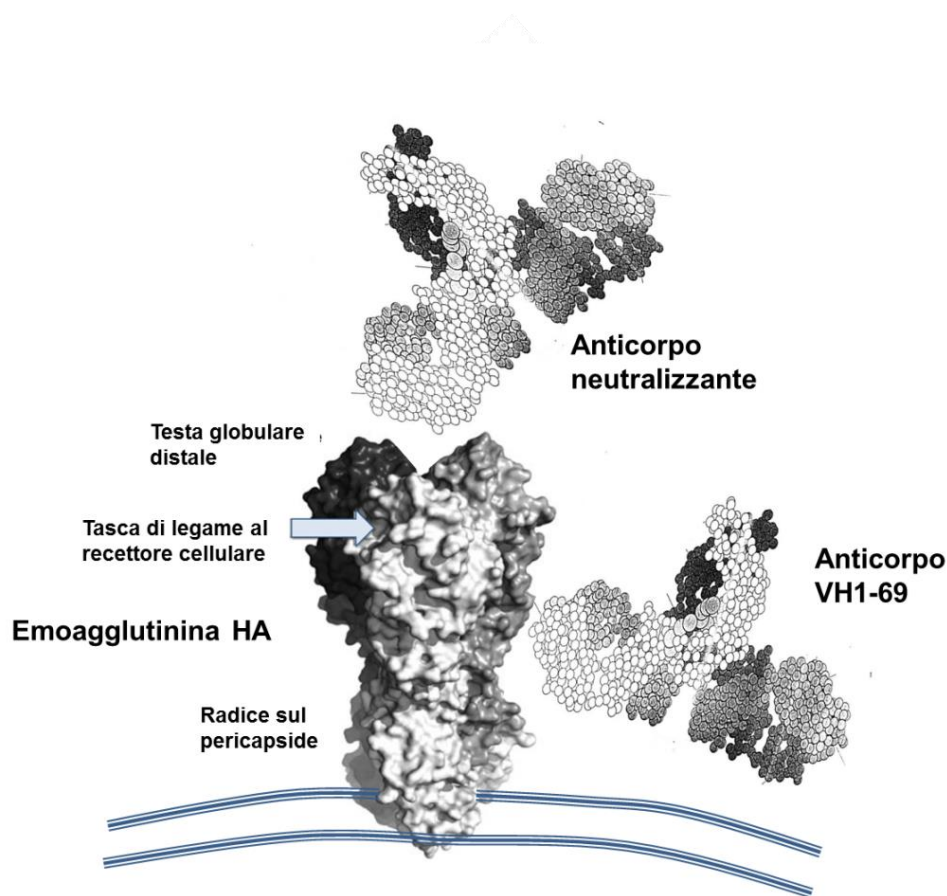


Figura 2. Anticorpi anti-emoagglutinina (HA) del virus dell'influenza

Gli anticorpi neutralizzanti diretti contro l'emoagglutinina (HA) sono necessari per proteggere dalla malattia, in quanto inibiscono il legame con le cellule epiteliali respiratorie. La testa globulare della HA contiene il dominio che lega il recettore cellulare (RBD) ed è l'obiettivo degli anticorpi con la più alta attività in vivo. In generale, questi anticorpi sono indotti facilmente dalla vaccinazione, ma purtroppo solo raramente mostrano attività di neutralizzazione incrociata contro varianti di deriva antigenica. Inoltre, il potenziale di reattività crociata di tali anticorpi è limitato dai contatti dei residui di HA ipervariabili all'esterno del RBD.

Gli esseri umani possono generare anticorpi anche contro lo "stelo" dell'HA influenzale, molti dei quali sono codificati dal gene della linea germinale VH1-69, che specifica gli aminoacidi che sembrano idealmente configurati per raggiungere una tasca idrofobica sullo stelo. Questo tipo di anticorpi sono diretti prevalentemente verso i domini conservati e non molto verso quelli nuovi, che in tal modo sfuggono al controllo anticorpale. Questo fenomeno è detto "peccato originale", perché la formazione di anticorpi dipende dai precedenti contatti con il virus e quindi la ripetuta immunizzazione alla fine potrebbe favorire il virus che è mutato, anziché bloccarlo (Krause and Crowe, Jr. 2014).

Un gruppo di ricerca del San Raffaele (Cappelletti *et al.* 2015), ha dimostrato che gli anticorpi VH1-69 "neutralizzano" diversi virus, ma purtroppo questi anticorpi sono anche responsabili di reazioni autoimmuni originate dalle infezioni. Il meccanismo, ben noto agli specialisti, si basa essenzialmente sul fatto che lo stesso anticorpo che è stato formato per legarsi al virus "riconosce" una sostanza presente sulle cellule normali e sbaglia il bersaglio, dirigendosi verso componenti normali del nostro organismo e, di conseguenza, danneggiandole. Lo stesso lavoro riporta anche il caso ancora più preoccupante: ci sono degli anticorpi, stimolati dall'infezione virale, che mancano completamente di una capacità protettiva. Un esempio sono gli anticorpi detti VH4-34, che evidentemente sono diretti ad intercettare una sequenza virale che non è implicata nell'infezione. Purtroppo, tali anticorpi non sono solo inutili ma anche dannosi, perché hanno un

ruolo patogenetico nelle malattie autoimmuni come il Lupus eritematoso sistemico (Tipton *et al.* 2015). Quest'ultimo lavoro dimostra che i malati di Lupus Eriematoso Sistemico (LES) sono più propensi a sviluppare anticorpi "patogeni" VH4-34, visto che li si ritrova nel sangue di circa il 20% dei malati, ma è stato riportato che anche alcuni soggetti normali vaccinati con antiinfluenzale o antitetanica (da 1 a 10 % dei casi) sviluppano tali anticorpi.

Autoimmunità e vaccini

Lo sviluppo di autoimmunità è una delle conseguenze più deleterie, in quanto croniche, delle infezioni in soggetti geneticamente predisposti. Il problema non riguarda solo le infezioni naturali ma anche i vaccini, perché la vaccinazione è fatta con antigeni comuni ai microbi "wild-type" e non vi è motivo per pensare che il fenomeno di reattività incrociata riguardi solo antigeni di componenti patogene. Ad esempio, uno degli anticorpi maggiormente stimolati dalla vaccinazione antiinfluenzale è proprio il VH1-69 (Krause and Crowe, Jr. 2014). È stato riportato che i vaccini antiinfluenzali (anti-H1N1) aumentano il rischio di sviluppo di autoanticorpi in un sottogruppo di pazienti con malattie reumatiche e anche in adulti sani (Perdan-Pirkmajer *et al.* 2012).

È noto che le risposte del sistema immunitario ai microbi o a loro componenti contenute nei vaccini si basano su tratti genetici comuni e su altri che sono tipici dei singoli individui. Ad esempio, è stato riportato che la risposta immune indotta dalla somministrazione del vaccino anti-influenzale, anche nei soggetti sani, è estremamente eterogenea (Cardinale *et al.* 2012). Di conseguenza, sia per i tratti comuni, sia per quelli individuali, in una popolazione si determina certamente una diversità nelle risposte alle infezioni e ai vaccini, tale per cui ci sono degli individui che sviluppano risposte anticorpali deboli e altri molto forti. I primi risulteranno più suscettibili all'infezione, mentre i secondi risulteranno più protetti. Tuttavia, questa superiore "protezione" si paga perché la "sovraespressione" della risposta anticorpale a specifici antigeni in alcuni casi è correlata con una maggiore probabilità di sviluppare patologie autoimmuni. Le componenti specifiche possono innescare un'immunità contro gli antigeni microbici, ma anche un'auto-immunità nel caso esista un mimetismo molecolare (somiglianza) tra sequenze proteiche dell'antigene e sequenze proteiche di componenti dell'organismo o recettori HLA (Cruz-Tapias *et al.* 2012; De *et al.* 2013; Israeli *et al.* 2012; Rinaldi *et al.* 2014). Come spesso succede in medicina, il confine tra risposta "adattativa" e risposta "patologica" è molto sottile e dipende da una molteplicità di fattori.

Il LES è una malattia dovuta a una complessità di fattori (genetici, ormonali e ambientali) caratterizzata dalla presenza di autoanticorpi. È noto che il LES è una delle malattie autoimmuni in cui è stata dimostrata un'associazione con la vaccinazione statisticamente significativa, mediante una meta-analisi di 12 pubblicazioni, (rischio relativo nei vaccinati rispetto ai non vaccinati = 1.5) (Wang *et al.* 2017). Va precisato che in quest'ultimo lavoro si sono considerate assieme tutte le varie vaccinazioni, mentre l'analisi dei singoli vaccini è più debole a causa della scarsa numerosità di lavori specifici. Certo, si tratta di percentuali basse (per fortuna) ma, visto che la profilassi vaccinale è somministrata a milioni di persone, il problema non può essere considerato indifferente. Le reazioni autoimmuni ai vaccini per fortuna sono rare, ma certamente possibili (Perricone *et al.* 2014; Soriano *et al.* 2015; Toussirot and Bereau 2015; Wang *et al.* 2017).

L'induzione di autoimmunità è uno dei rischi emergenti evidenziati dalla "adversomica", la scienza che studia le reazioni negative alle vaccinazioni (Poland *et al.* 2009; Poland *et al.* 2013; Whitaker *et al.* 2015). Queste considerazioni valgono in procedure di vaccinazione ancor più che nelle malattie naturali, perché i vaccini utilizzano adiuvanti proprio per rompere i meccanismi di auto-tolleranza di protezione. I dati consentono di sostenere la possibilità di crossreazioni tra antigeni virali e proteine umane che potrebbero essere implicati nella patogenesi di malattie neuropsichiatriche, cardiovascolari e metaboliche quali la sclerosi multipla, sclerosi laterale amiotrofica, diabete e morte improvvisa. Ovviamente, maggiore è l'estensione della sequenza condivisa tra microbo e uomo, maggiore sarà il rischio di subire danni autoimmuni e sequele patologiche. Il risvolto positivo di queste ricerche è che sarebbe possibile concepire la produzione di vaccini basati solo su sequenze uniche dei patogeni, cosa che potrebbe vanificare i potenziali rischi di crossreattività presenti nelle attuali formulazioni vaccinali (Kanduc and Shoefeld, 2016).

Ma non si deve pensare solo al sistema immunitario: certamente le risposte alle infezioni e ai vaccini – positive o negative – dipendono anche dal sistema nervoso e da quello endocrino (Bellavite 2009; Bottaccioli 2003). È stato riportato recentemente che parecchi casi di malattie autoimmuni indotte da HPV sono dovuti probabilmente ad una disfunzione neuroendocrina (Jara *et al.* 2017). Gli ormoni, come gli estrogeni, l'ormone della crescita, la prolattina, gli ormoni tiroidei e l'insulina, stimolano la risposta immunitaria. Al

contrario, il cortisolo, l'ormone che rilascia la corticotrofina, l'ormone adrenocorticotropico, gli androgeni e il progesterone diminuiscono le risposte immunitarie innate e adattative. Anche in questo caso è stato suggerito un ruolo dello stress, e in particolare quello del periodo neonatale (Avitsur *et al.* 2006; Kinsey *et al.* 2007): quando i topi sono separati dalla madre nel periodo neonatale, hanno per il resto della vita un sistema immunitario mal regolato tale per cui sono maggiormente suscettibili all'infezione causata dal virus dell'influenza, hanno maggiore produzione di citochine pro-infiammatorie e hanno anche maggiori punteggi di ansietà nei test comportamentali.

Adiuvanti

Escluso quelli a virus attenuati, normalmente i vaccini contengono degli adiuvanti per aumentare l'efficacia dell'immunizzazione. Tali sostanze possono aumentare la reazione infiammatoria in modo aspecifico, soprattutto tramite l'azione delle cellule del sistema dei fagociti mononucleati. Infatti gli adiuvanti possono essere trasportati in varie sedi del corpo dalle cellule macrofagiche e le componenti endogene delle reazioni infiammatorie (particolarmente le citochine) si diffondono nell'organismo e possono andare a stimolare, oltre alla reazione immunitaria specifica desiderata, anche altri processi reattivi preesistenti innescati da qualsiasi altro fattore patogeno acuto o cronico. È plausibile che le varie componenti di origine batterico (incluse le endotossine), gli antigeni e le citochine interagiscano in modo sinergico andando a creare le condizioni per l'incremento delle risposte infiammatorie locali (iperemia, edema, granulomi) o sistemiche (febbre, emostasi).

Gli adiuvanti "classici" come quello di Freund, ma anche l'alluminio, sono in grado di indurre reazioni autoimmuni nei topi "proni" a sviluppare il LES (Favoino *et al.* 2014). Sempre su modelli animali, si è visto che il vaccino per HBV aumenta gli anticorpi anti-nucleo in topi femmina geneticamente suscettibili a Lupus (Ravel *et al.* 2004), che il vaccino anti-HBV induce una malattia simile al LES (Agmon-Levin *et al.* 2014) e che un adiuvante a base di alluminio induce una malattia simile alla sindrome di Sjogren nel topo (Bagavant *et al.* 2014; Ruiz *et al.* 2016). L'alluminio in forma nanoparticolata è uno degli adiuvanti più comunemente usati nei vaccini ed alcuni autori lo considerano potenzialmente coinvolto nelle reazioni autoimmuni (Toussiroit and Bereau 2015) o in reazioni anafilattiche IgE-mediate (Terhune and Deth 2013). Per evitare questo problema, è stato suggerito di sostituire l'alluminio con nanoparticelle di fosfato di calcio, più tollerato essendo componente dello stesso organismo, o di utilizzare antigeni polimerizzati che non richiedano adiuvanti (Lin *et al.* 2017; Relyveld *et al.* 1998).

Indipendentemente dal problema delle reazioni al vaccino, nel nostro laboratorio abbiamo studiato la risposta degli astrociti (cellule della struttura e regolazione del sistema nervoso) alle endotossine (lipopolisaccaridi, LPS), componenti generiche, ubiquitarie e aspecifiche dei batteri gram negativi. Sostanze lipopeptidiche hanno anche attività di adiuvanti (Kleine *et al.* 1994). Come illustrato in figura 3, in un preciso modello cellulare da noi utilizzato tali sostanze sono "inerti" se vengono a contatto con cellule che si trovano in uno stato basale o di riposo, ma se contemporaneamente è presente l'interferone-gamma, che è il principale prodotto dei linfociti T attivati, ecco che le stesse cellule rispondono con una fortissima produzione di ossido nitrico. Quest'ultimo, a sua volta, è considerato una sostanza che, se presente in alte concentrazioni, può avere conseguenze di tossicità sulle cellule del sistema nervoso centrale (Chang *et al.* 2013; Quintas *et al.* 2014). Per questi motivi la presenza in circolo o nei tessuti di sostanze lipopolisaccaridiche o di adiuvanti potrebbe attivare o riattivare focolai dove per altre ragioni siano presenti interferoni o altre citochine capaci di dare risposte infiammatorie sinergiche.

In questo contesto, un ulteriore grado di complessità deriva dal ruolo del microbioma intestinale (Rea *et al.* 2016). C'è un crescente interesse sulla relazione tra la diversità dei microrganismi che abitano il nostro intestino (microbiota gastrointestinale umano) e la salute, compresa la salute del cervello e i disturbi del sistema nervoso centrale. L'asse del microbiota-intestino-cervello è un sistema dinamico di tessuti e organi tra cui il cervello, le ghiandole endocrine, le cellule immunitarie, l'intestino e il microbiota gastrointestinale, che comunicano in modo complesso e multidirezionale per mantenere l'omeostasi. I cambiamenti in questo ambiente possono portare ad un ampio spettro di effetti fisiologici e comportamentali tra cui l'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA) e l'attività alterata dei sistemi di neurotrasmettitori e della funzione immunitaria. Mentre una risposta fisiologica appropriata e coordinata, come una risposta immunitaria o di stress sono necessarie per la sopravvivenza, una risposta disfunzionale può essere dannosa e generare un certo numero di disturbi neurologici. Il passaggio di LPS dall'intestino alla linfa o al sangue, a causa di un

aumento di permeabilità della barriera intestinale, può certamente complicare l'andamento di processi infiammatori acuti e cronici, eventualmente dovuti ad altri meccanismi eziopatogenetici.

Lo stress ossidativo è uno dei fattori predisponenti nei disturbi neurologici degli adulti e nei disturbi del cervello dello sviluppo (Caksen *et al.* 2014; Hayashi 2009); agenti antiossidanti potrebbero rivelarsi utili per il trattamento di pazienti con tali disturbi. Secondo un recente lavoro (Saeedan *et al.* 2018) sul ratto, i cuccioli trattati con vaccino contro morbillo parotite rosolia (MMR), oppure contro la difterite e pertosse (DPT), oppure con lipopolisaccaride (LPS) hanno mostrato un'alterazione significativa nei cambiamenti comportamentali con comportamenti simil-autistici e aumento dei marcatori ossidativi e infiammatori. Il paracetamolo però non solo non era in grado di prevenire ma addirittura aumentava tali sintomi.

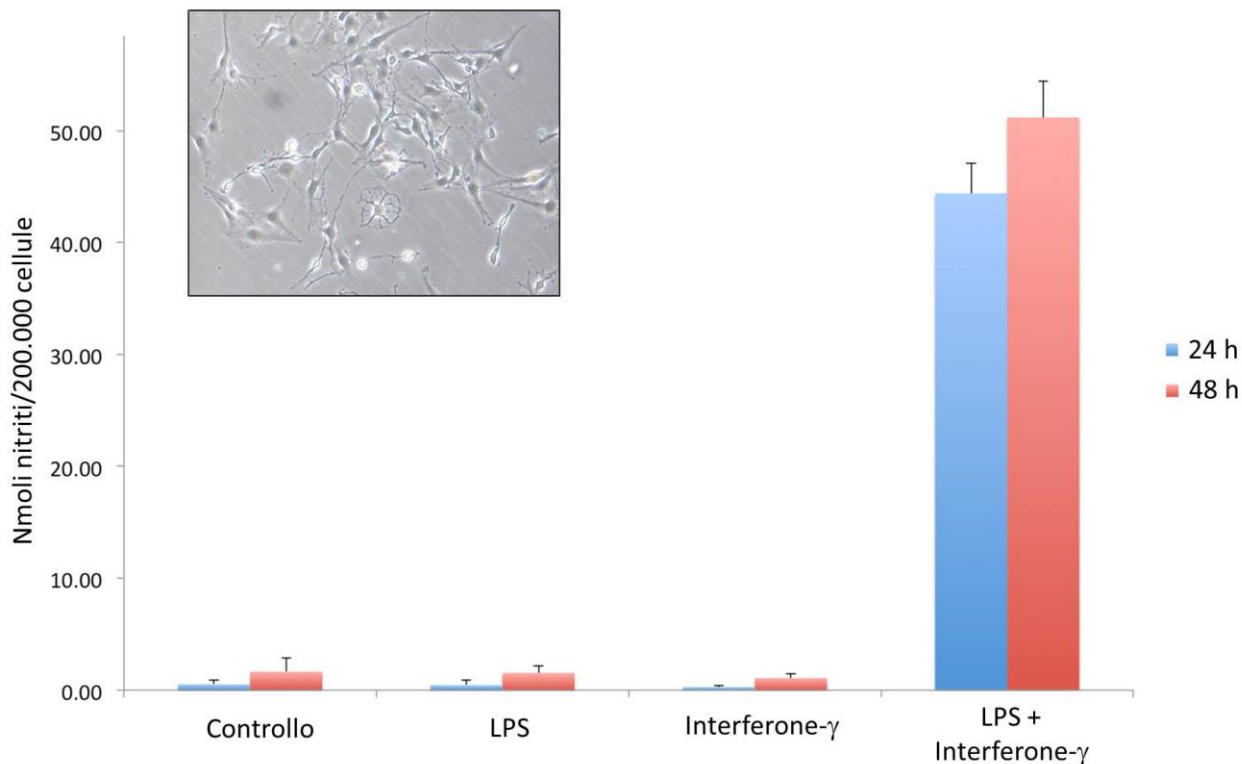


Figura 3. Produzione di ossido nitrico da parte di cellule astrogliali umane in coltura, in presenza o assenza di endotossine batteriche (lipopolisaccaride, LPS) e Interferone- γ . 2×10^5 cellule di astroglioma di ratto (C6) al 2° passaggio sono state seminate in piastra da 24 in DMEM F12 10% FBS 100u/ml penicillina 100ug/ml di streptomycin. Dopo 24 ore le cellule sono state incubate in terreno completo al FBS al 2%. Dopo altre 24 ore le cellule sono state trattate con IFN- γ 100 ng/ml o LPS 1 μ g/ml o IFN- γ 100 ng/ml + LPS 1 μ g/ml. La concentrazione di nitriti nel terreno di coltura è stata valutata dopo 24 e 48 ore di trattamento usando il metodo Griess. Brevemente, 50 μ l di surnatante sono stati aliquotati in piastra da 96 well e uniti a 25 μ l di sulfanilamide 1% in 5% acido fosforico e a 25 μ l di naphthylenediamine dihydrochloride 0,1% in acqua. La piastra è stata incubata 10' al buio a temperatura ambiente. La concentrazione di nitriti è stata quantificata nei campioni da un sistema automatico di lettore di micropiastre (Victor 3 Perkin Elmer) a 550 nm attraverso taratura con una curva standard di sodio nitrito (NaNO_2). Nell'insero: fotografia al microscopio ottico (100X) delle cellule in coltura. Si ringrazia la dott.ssa Clara Bonafini (Università di Verona) per la figura.

La complessità in vaccinologia

Sebbene le vaccinazioni abbiano costituito e costituiscano, in generale, un presidio indispensabile di profilassi, il loro uso su larga scala ha fatto emergere dei problemi complessi, che qui sono sinteticamente presentati, utilizzando una grafica in cui i vari aspetti critici sono rappresentati come connessi tra loro (Figura 4). Non vi è lo spazio per una trattazione di ogni singolo vaccino, in cui ciascuno dei fattori in gioco può avere diversa importanza, per cui ci limitiamo ad alcune considerazioni generali ed a qualche esempio significativo.

Le coperture vaccinali sono usualmente considerate come il fattore-chiave dell'efficacia della vaccinazione come mezzo di prevenzione delle malattie infettive: Quanto più alta è la copertura vaccinale, tanto più bassi sono l'incidenza della malattia ed il rischio di verificarsi di episodi epidemici. Tale idea è da vedersi come un principio generale, ma non come una proporzionalità diretta che vale in qualsiasi caso. E' ovvio che se le coperture sono inferiori alla soglia critica dell'effetto gregge, il rischio di epidemia non è scongiurato: le persone vaccinate sono protette, ma il microbo continua a circolare nella massa della popolazione suscettibile. D'altra parte, l'obiettivo di portare a zero l'incidenza ed il rischio di epidemia ("eradicare" la malattia) mediante una copertura altissima e prossima al 100% potrebbe non essere raggiungibile, per la presenza di altri fattori ostacolanti. Il principale problema, a questo proposito, è dato dall'efficacia del vaccino. Se tale efficacia non è ottimale si possono avere conseguenze negative: comparsa di resistenze microbiche, spostamento dell'età di comparsa della malattia da età infantili verso l'età adulta (in cui di solito le malattie esantematiche sono più gravi), trasporto del microbo da parte anche di soggetti vaccinati che hanno la malattia in forme meno evidenti, aumento del dubbio vaccinale ("vaccine hesitancy"). Quest'ultimo ad esempio è il caso della vaccinazione anti-influenzale che ha una bassa efficacia ed è questo il motivo per cui circa la metà della popolazione non ricorre a tale profilassi pur essendo la malattia molto frequente e piuttosto seria.

La presenza di variabili difficilmente controllabili e tra loro intrecciate, rende difficile prevedere l'esito di un intervento basato su un singolo fattore, come sarebbe quello teso ad aumentare "a tutti i costi" la copertura vaccinale. Come è ben esemplificato dall'andamento del morbillo negli ultimi 20 anni in Italia, le epidemie si verificano spesso in cicli apparentemente irregolari, non completamente imprevedibili, per cui sono stati applicati modelli complessi che tengono conto anche della sensibilità a piccole perturbazioni (Bolker and Grenfell 1993; Philippe and Mansi 1998; Rhodes and Anderson 1996). La teoria suggerisce che questi cicli possono essere interrotti da ampie fluttuazioni stagionali di ampiezza nei tassi di trasmissione, con conseguente caos deterministico, su cui intervengono indubbiamente dei disturbi "stocastici", totalmente imprevedibili, piccole differenze climatiche (Dalziel *et al.* 2016; Trottier *et al.* 2006; Yang *et al.* 2014) e nella struttura socio-demografica della popolazione (Ferrari *et al.* 2006; Trottier 2005).

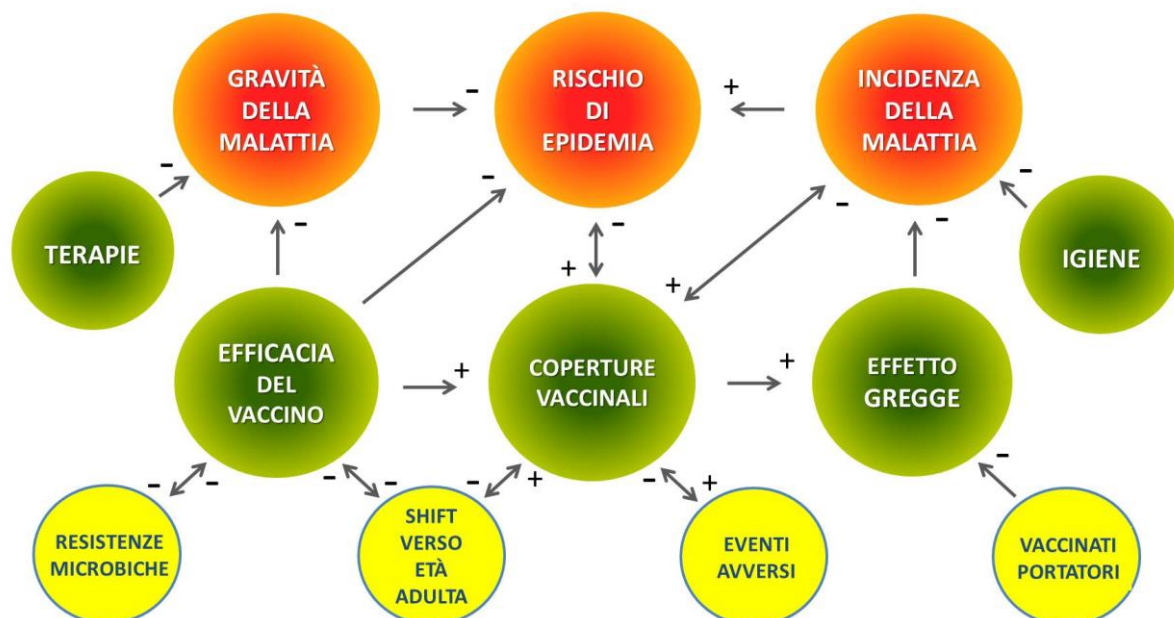


Figura 4. Fattori coinvolti nei risultati delle vaccinazioni (in generale) e loro interazioni. Cerchi rossi: fattori della malattia; cerchi verdi: fattori della protezione; cerchi gialli: fattori problematici. Le frecce indicano le prevalenti direzioni degli effetti. (-): effetti in diminuzione o inibizione; (+): effetti in aumento o stimolazione.

Inoltre, sussiste incertezza sul valore di soglia critica per l'immunità di gregge, che varia in base all'agente patogeno (Fine 1993). I valori di "coperture vaccinali critiche" che erano stati indicati in una pubblicazione dell'Istituto Superiore di Sanità¹ sono: Morbillo 95%, Polio 80-86%, Parotite 75-86%, Difterite 85%, Rosolia 83-85%, Vaiolo 80-85%, Hib 70%. È tuttavia chiaro che i valori dell'immunità di gregge diffusi e usati finora sono tratti da studi sulle malattie naturali, mentre non esistono valori attendibili calcolati sull'effetto reale della maggior parte dei vaccini. La differenza è notevole, perché l'immunità conseguita dalla malattia naturale è spesso permanente, o quasi, per tutta la vita, mentre quella conseguita col vaccino può non esserlo per il fenomeno della "waning immunity", che è particolarmente importante per alcuni vaccini come quelli della pertosse e della parotite.

La difficoltà di determinare la soglia critica in modo preciso, deriva dal fatto che essa dipende da una complessa serie di fattori: la copertura, l'efficacia del vaccino, l'incidenza della malattia, l'omogeneità della popolazione, la patogenicità e virulenza del ceppo di microrganismo, i serbatoi naturali. Questi parametri non sono facili da determinare e possono variare geograficamente, oltre che cronologicamente. Un recente lavoro di autori italiani ha evidenziato come la caratterizzazione epidemiologica del morbillo sia ancora insufficiente e che servono strategie diverse dalle attuali nei Paesi ad alto reddito e bassa natalità (Trentini *et al.* 2017). Viene sostenuto che quasi la metà della riduzione di incidenza del morbillo negli ultimi decenni è stata dovuta alla riduzione della natalità, mentre le strategie vaccinali seguite finora hanno portato a forti variazioni epidemiologiche con comparsa della maggior parte dei casi tra giovani e adulti. Gli autori suggeriscono che la vaccinazione dei soli bambini in età scolare non è certo sufficiente alla eliminazione della malattia.

Un altro problema che ostacola la vaccinazione, aumentando il dubbio vaccinale, è l'incidenza di eventi avversi, percepito dalla popolazione come un rischio incombente, vago e incontrollabile per tanti motivi, più o meno giustificati. A ben vedere, dal punto di vista del genitore che deve decidere se vaccinare o meno il figlio o la figlia, la decisione finale dipende non da tutti i fattori elencati in figura 4 (che sono di competenza degli specialisti e delle autorità sanitarie), ma solo da tre di essi: a) gravità della malattia, b) incidenza, quindi probabilità di contrarla realmente e c) rischio degli effetti avversi. Proprio per questo, risulta di grande importanza la conoscenza dell'incidenza delle malattie, dei rischi di epidemia e dell'incidenza degli effetti avversi. Quanto più precisa e documentata è la conoscenza di tali fattori, tanto più corretta e consapevole sarà la scelta vaccinale da parte del genitore. Un grosso problema, da tale prospettiva, sta nel fatto che i sistemi di farmacovigilanza sono alquanto inefficienti, con grosse disparità tra le diverse Regioni.

Se da una parte è ovvio che un maggior numero di vaccinati contribuisca ad una più rapida diminuzione di casi, dall'altra stanno emergendo dei dubbi sul fatto che la vaccinazione di un'intera popolazione, limitandosi alla fascia pediatrica e con vaccini "imperfetti" (nel senso che non danno un'immunità duratura), comporti delle conseguenze indesiderate:

- Nel caso di immunità di minore durata della naturale (problema emerso con i vaccini per la pertosse, la meningite, l'influenza e la parotite (Gu *et al.* 2017; Vygen *et al.* 2016) e in parte anche per il morbillo (He *et al.* 2013; Ovsyannikova *et al.* 2017; Viana *et al.* 2010)), ci si attende un aumento dei casi di persone protette nell'infanzia ma esposte al contagio in età adulta e quindi maggiormente suscettibili di complicanze. Ciò è stato dimostrato recentemente anche per la varicella (Donzelli and Demicheli 2018).
- Alcuni studi dimostrano che l'immunità transplacentare, assieme a quella conferita dagli anticorpi IgA presenti nel colostro e nel latte materno, diminuisce più velocemente nei figli di madri vaccinate per morbillo rispetto a quelle che hanno contratto naturalmente l'infezione (Szenborn *et al.* 2003). Quindi quelle madri, vaccinate in età infantile, potrebbero avere pochi anticorpi da passare ai propri figli e potrebbero di conseguenza non essere in grado di garantire loro una protezione efficace. Il modo più sicuro e provato, per le madri, di salvaguardare i loro figli che rischierebbero di morire per il morbillo, sarebbe l'aver contratto naturalmente il morbillo.
- Si registra la comparsa di ceppi resistenti al vaccino, un problema ben noto nell'influenza (deriva antigenica) ma che sta verificandosi anche con la pertosse e pneumococco (Barnett *et al.* 2015; Croucher *et al.* 2014). Il reale impatto di questa evoluzione sull'efficacia dei vaccini antipertossici acellulari dovrebbe essere valutato attraverso la sorveglianza standardizzata e l'isolamento di *B. pertussis* e *B. parapertussis* in tutto il mondo (Hegerle and Guiso 2014). Infatti, l'aumento della frequenza

dell'isolamento dei ceppi di PRN-negativi è stato correlato al periodo di vaccinazione di routine con vaccini acellulari (Polak and Lutynska 2017).

- Per alcuni vaccini è documentata la presenza di soggetti portatori del germe, che la vaccinazione non ha eliminato, i quali quindi sono potenzialmente fonte di contagio. Vari studi sperimentali e clinici hanno dimostrato che i vaccini acellulari per la pertosse (quelli attualmente in uso) non prevengono la colonizzazione delle vie aeree né la trasmissione della malattia (Bolotin *et al.* 2015; Warfel and Edwards 2015). Dunque i vaccinati possono essere asintomatici e al tempo stesso portatori, cosa che non solo vanifica ogni possibilità di effetto gregge, ma potrebbe addirittura facilitare i contagi (Kilgore *et al.* 2016). Anche per il morbillo è stato riportato il caso di persone vaccinate che hanno presentato la malattia paucisintomatica (addirittura senza le manifestazioni cutanee) (Hickman *et al.* 2011), cosa preoccupante perché in tali casi la diagnosi sarebbe più difficile e la diffusione del virus nella popolazione più probabile.
- Uno dei motivi dell'insufficienza di alte percentuali di copertura nel bloccare totalmente l'infezione del morbillo è il fatto che il valore della soglia critica di gregge, stimato inizialmente, si riferiva alla popolazione di soggetti di età pediatrica, praticamente gli unici colpiti in era pre-vaccinale, e alla previsione di un'immunità permanente come quella naturale. Essendo colpiti i bambini, si prevedeva che vaccinando tutti i bambini la malattia si sarebbe estinta. Tale previsione, a distanza di 30 anni si è rivelata infondata, non solo in Italia ma in tutti i Paesi del mondo. La letteratura sul reproductive number è infatti vasta e contempla modelli più complessi che caratterizzano i diversi gruppi sociali (Ball *et al.* 2016; Goldstein *et al.* 2009), come le comunità di famiglie e tengono conto dei vaccini di diversa efficacia. Tali modelli consentono di stimare che nell'ipotetica scelta tra aumentare l'efficacia del vaccino o i livelli di copertura, la preferenza dovrebbe andare all'aumento di efficacia.

Chiaramente, i problemi legati all'efficacia degli interventi vaccinali sono diversi se osservati con l'ottica delle autorità sanitarie, che sono giustamente preoccupate delle coperture e dell'effetto gregge, rispetto all'ottica del comune cittadino, che è preoccupato del rapporto tra rischio vaccinale e beneficio reale derivante dall'evitare una malattia infettiva mediante un vaccino efficace. Quando la malattia è molto rara, indipendentemente dal fatto che ciò sia dovuto alla vaccinazione di massa o ad altri fattori, è ovvio che la scelta di sottoporsi (o sottoporre il figlio) ad un rischio vaccinale, benché piccolo, divenga molto delicata. D'altra parte, anche per una malattia molto frequente come l'influenza, l'esitazione a vaccinarsi può originare dalla consapevolezza che l'efficacia del vaccino è scarsa.

Queste sono le principali ragioni per cui è necessario continuare a perfezionare le conoscenze sia sul lato dell'epidemiologia (per conoscere la reale incidenza di malattia e l'efficacia dei vaccini "sul campo"), sia della farmacovigilanza (potenziandola con l'introduzione di meccanismi più efficienti di segnalazione e valutazione) e, *last but not least*, incrementare la ricerca per migliorare i vaccini, rendendoli sempre più efficaci e sicuri.

Bibliografia

- Agmon-Levin N, Arango MT, Kivity S, Katzav A, Gilburd B, Blank M, Tomer N, Volkov A, Barshack I, Chapman J, Shoenfeld Y (2014) Immunization with hepatitis B vaccine accelerates SLE-like disease in a murine model. *J Autoimmun.* **54**, 21-32.
- Andrighetto G, Zoller M (1987) Activation of help and contrasuppression as essential prerequisites for immune response. *J.Mol.Cell.Immunol.* **3**, 214.
- Avitsur R, Hunzeker J, Sheridan JF (2006) Role of early stress in the individual differences in host response to viral infection. *Brain Behav.Immun.* **20**, 339-348.
- Bagavant H, Nandula SR, Kaplonek P, Rybakowska PD, Deshmukh US (2014) Alum, an aluminum-based adjuvant, induces Sjogren's syndrome-like disorder in mice. *Clin.Exp Rheumatol.* **32**, 251-255.
- Ball F, Pellis L, Trapman P (2016) Reproduction numbers for epidemic models with households and other social structures II: Comparisons and implications for vaccination. *Math.Biosci.* **274**, 108-139.
- Barnett TC, Lim JY, Soderholm AT, Rivera-Hernandez T, West NP, Walker MJ (2015) Host-pathogen interaction during bacterial vaccination. *Curr.Opin.Immunol.* **36**, 1-7.
- Bellavite P (2009) 'La complessità in medicina. Fondamenti di un approccio sistemico e dinamico alla salute, alla malattia e alle terapie integrate.' (Tecniche Nuove: Milano)
- Bellavite P, Andrighetto GC, Zatti M (1995) 'Omeostasi, Complessità e Caos. Un'introduzione.' (Franco Angeli: Milano.)
- Bolker BM, Grenfell BT (1993) Chaos and biological complexity in measles dynamics. *Proc.Biol.Sci* **251**, 75-81.
- Bolotin S, Harvill ET, Crowcroft NS (2015) What to do about pertussis vaccines? Linking what we know about pertussis vaccine effectiveness, immunology and disease transmission to create a better vaccine. *Pathog.Dis.* **73**, ftv057.
- Bottaccioli F (2003) 'Psiconeuroimmunologia.' (Edizioni Red: Como)

- Caksen H, Ozkan M, Cemek M, Cemek F (2014) Oxidant and antioxidant status in children with subacute sclerosing panencephalitis. *J Child Neurol.* **29**, 1448-1452.
- Camini FC, da Silva Caetano CC, Almeida LT, de Brito Magalhaes CL (2017) Implications of oxidative stress on viral pathogenesis. *Arch.Virol.* **162**, 907-917.
- Cappelletti F, Clementi N, Mancini N, Clementi M, Burioni R (2015) Virus-induced preferential antibody gene-usage and its importance in humoral autoimmunity. *Semin.Immunol.* **27**, 138-143.
- Cardinale F, Ciofi degli Atti M, Bartolozzi G, Martire B, Moschese V, Rizzo C (2012) Basi genetiche della risposta immune alle vaccinazioni. *Riv.Immunol.Allergol.Pediatr.* **4**, 38-54.
- Chan MC, Cheung CY, Chui WH, Tsao SW, Nicholls JM, Chan YO, Chan RW, Long HT, Poon LL, Guan Y, Peiris JS (2005) Proinflammatory cytokine responses induced by influenza A (H5N1) viruses in primary human alveolar and bronchial epithelial cells. *Respir.Res.* **6**, 135.
- Chang CY, Choi DK, Lee DK, Hong YJ, Park EJ (2013) Resveratrol confers protection against rotenone-induced neurotoxicity by modulating myeloperoxidase levels in glial cells. *PLoS.ONE.* **8**, e60654.
- Croucher NJ, Chewapreecha C, Hanage WP, Harris SR, McGee L, van der Linden M, Song JH, Ko KS, de LH, Turner C, Yang F, Sa-Leao R, Beall B, Klugman KP, Parkhill J, Turner P, Bentley SD (2014) Evidence for soft selective sweeps in the evolution of pneumococcal multidrug resistance and vaccine escape. *Genome Biol.Evol.* **6**, 1589-1602.
- Cruz-Tapias P, Blank M, Anaya JM, Shoenfeld Y (2012) Infections and vaccines in the etiology of antiphospholipid syndrome. *Curr.Opin.Rheumatol.* **24**, 389-393.
- Dalziel BD, Bjornstad ON, van Panhuis WG, Burke DS, Metcalf CJ, Grenfell BT (2016) Persistent Chaos of Measles Epidemics in the Prevacination United States Caused by a Small Change in Seasonal Transmission Patterns. *PLoS.Comput.Biol.* **12**, e1004655.
- De MM, Chiappini E, Galli L (2013) Vaccines and autoimmunity. *Int J Immunopathol.Pharmacol* **26**, 283-290.
- Donzelli A, Demicheli V (2018) Varicella vaccination: scientific reasons for a different strategic approach. *Epidemiol.Prev.* **40**, -(In press).
- Favoino E, Favia EI, Digiglio L, Racanelli V, Shoenfeld Y, Perosa F (2014) Effects of adjuvants for human use in systemic lupus erythematosus (SLE)-prone (New Zealand black/New Zealand white) F1 mice. *Clin.Exp Immunol.* **175**, 32-40.
- Ferrari MJ, Bansal S, Meyers LA, Bjornstad ON (2006) Network frailty and the geometry of herd immunity. *Proc.Biol.Sci* **273**, 2743-2748.
- Fine PE (1993) Herd immunity: history, theory, practice. *Epidemiol.Rev.* **15**, 265-302.
- Gerlier D, Valentin H (2009) Measles virus interaction with host cells and impact on innate immunity. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* **329**, 163-191.
- Gois PHF, Ferreira D, Olenki S, Seguro AC (2017) Vitamin D and Infectious Diseases: Simple Bystander or Contributing Factor? *Nutrients.* **9**.
- Goldstein E, Paur K, Fraser C, Kenah E, Wallinga J, Lipsitch M (2009) Reproductive numbers, epidemic spread and control in a community of households. *Math.Biosci.* **221**, 11-25.
- Gu XX, Plotkin SA, Edwards KM, Sette A, Mills KHG, Levy O, Sant AJ, Mo A, Alexander W, Lu KT, Taylor CE (2017) Waning Immunity and Microbial Vaccines - Workshop of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases. *Clin.Vaccine Immunol.* **24**(7): e00034-17
- Hayashi M (2009) Oxidative stress in developmental brain disorders. *Neuropathology.* **29**, 1-8.
- He H, Chen EF, Li Q, Wang Z, Yan R, Fu J, Pan J (2013) Waning immunity to measles in young adults and booster effects of revaccination in secondary school students. *Vaccine* **31**, 533-537.
- Hegerle N, Guiso N (2014) Bordetella pertussis and pertactin-deficient clinical isolates: lessons for pertussis vaccines. *Expert.Rev.Vaccines* **13**, 1135-1146.
- Hickman CJ, Hyde TB, Sowers SB, Mercader S, McGrew M, Williams NJ, Beeler JA, Audet S, Kiehl B, Nandy R, Tamin A, Bellini WJ (2011) Laboratory characterization of measles virus infection in previously vaccinated and unvaccinated individuals. *J Infect.Dis.* **204 Suppl 1**, S549-S558.
- Israeli E, Agmon-Levin N, Blank M, Chapman J, Shoenfeld Y (2012) Guillain-Barre syndrome--a classical autoimmune disease triggered by infection or vaccination. *Clin.Rev.Allergy Immunol.* **42**, 121-130.
- Jara LJ, Izquierdo E, Medina G (2017) Is the immune neuroendocrine system the connection between epipharyngitis and chronic fatigue syndrome induced by HPV vaccine? : Editorial. *Immunol.Res* **65**, 5-7.
- Kilgore PE, Salim AM, Zervos MJ, Schmitt HJ (2016) Pertussis: Microbiology, Disease, Treatment, and Prevention. *Clin.Microbiol.Rev.* **29**, 449-486.
- Kinsey SG, Bailey MT, Sheridan JF, Padgett DA, Avitsur R (2007) Repeated social defeat causes increased anxiety-like behavior and alters splenocyte function in C57BL/6 and CD-1 mice. *Brain Behav.Immun.* **21**, 458-466.
- Kleine B, Rapp W, Wiesmuller KH, Edinger M, Beck W, Metzger J, Ataulakhanov R, Jung G, Bessler WG (1994) Lipopeptide-polyoxyethylene conjugates as mitogens and adjuvants. *Immunobiology* **190**, 53-66.
- Krause JC, Crowe JE, Jr. (2014) Committing the Oldest Sins in the Newest Kind of Ways-Antibodies Targeting the Influenza Virus Type A Hemagglutinin Globular Head. *Microbiol.Spectr.* **2** (5), AID-0021-2014
- Lin Y, Wang X, Huang X, Zhang J, Xia N, Zhao Q (2017) Calcium phosphate nanoparticles as a new generation vaccine adjuvant. *Expert.Rev.Vaccines* **16**, 895-906.
- Nahas R, Balla A (2011) Complementary and alternative medicine for prevention and treatment of the common cold. *Can.Fam.Physician* **57**, 31-36.
- Ovsyannikova IG, Schaid DJ, Larrabee BR, Haralambieva IH, Kennedy RB, Poland GA (2017) A large population-based association study between HLA and KIR genotypes and measles vaccine antibody responses. *PLoS.ONE.* **12**, e0171261.
- Perdan-Pirkmajer K, Thallinger GG, Snoj N, Cucnik S, Zigon P, Kveder T, Logar D, Praprotnik S, Tomsic M, Sodin-Semrl S, Ambrozic A (2012) Autoimmune response following influenza vaccination in patients with autoimmune inflammatory rheumatic disease. *Lupus* **21**, 175-183.

- Perricone C, Ceccarelli F, Neshet G, Borella E, Odeh Q, Conti F, Shoenfeld Y, Valesini G (2014) Immune thrombocytopenic purpura (ITP) associated with vaccinations: a review of reported cases. *Immunol.Res* **60**, 226-235.
- Philippe P, Mansi O (1998) Nonlinearity in the epidemiology of complex health and disease processes. *Theor.Med.Bioeth.* **19**, 591-607.
- Plsek PE, Greenhalgh T (2001) The challenge of complexity in health care. *Brit.Med.J.* **323**, 625-628.
- Polak M, Lutynska A (2017) The importance of Bordetella pertussis strains which do not produce virulence factors in the epidemiology of pertussis. *Postepy Hig.Med Dosw.(Online.)* **71**, 367-379.
- Poland GA, Kennedy RB, McKinney BA, Ovsyannikova IG, Lambert ND, Jacobson RM, Oberg AL (2013) Vaccinomics, adversomics, and the immune response network theory: Individualized vaccinology in the 21st century. *Semin.Immunol.* **25**, 89-103.
- Poland GA, Ovsyannikova IG, Jacobson RM (2009) Adversomics: The Emerging Field of Vaccine Adverse Event Immunogenetics. *Pediatr.Infect.Dis.J* **28**, 431-432.
- Quintas C, Pinho D, Pereira C, Saraiva L, Goncalves J, Queiroz G (2014) Microglia P2Y(6) receptors mediate nitric oxide release and astrocyte apoptosis. *J.Neuroinflammation.* **11**, 141.
- Ravel G, Christ M, Horand F, Descotes J (2004) Autoimmunity, environmental exposure and vaccination: is there a link? *Toxicology* **196**, 211-216.
- Rea K, Dinan TG, Cryan JF (2016) The microbiome: A key regulator of stress and neuroinflammation. *Neurobiol.Stress* **4**, 23-33.
- Relyveld EH, Bizzini B, Gupta RK (1998) Rational approaches to reduce adverse reactions in man to vaccines containing tetanus and diphtheria toxoids. *Vaccine* **16**, 1016-1023.
- Rhodes CJ, Anderson RM (1996) Power laws governing epidemics in isolated populations. *Nature* **381**, 600-602.
- Rinaldi M, Perricone C, Ortega-Hernandez OD, Perricone R, Shoenfeld Y (2014) Immune thrombocytopenic purpura: an autoimmune cross-link between infections and vaccines. *Lupus* **23**, 554-567.
- Ruiz JT, Lujan L, Blank M, Shoenfeld Y (2016) Adjuvants- and vaccines-induced autoimmunity: animal models. *Immunol.Res.*
- Saeedan AS, Singh I, Ansari MN, Singh M, Rawat JK, Devi U, Gautam S, Yadav RK, Kaithwas G (2018) Effect of early natal supplementation of paracetamol on attenuation of exotoxin/endotoxin induced pyrexia and precipitation of autistic like features in albino rats. *Inflammopharmacology*.(In press) doi: 10.1007/s10787-017-0440-2
- Soriano A, Neshet G, Shoenfeld Y (2015) Predicting post-vaccination autoimmunity: who might be at risk? *Pharmacol Res* **92**, 18-22.
- Szenborn L, Tischer A, Pejcz J, Rudkowski Z, Wojcik M (2003) Passive acquired immunity against measles in infants born to naturally infected and vaccinated mothers. *Med Sci Monit.* **9**, CR541-CR546.
- Terhune TD, Deth RC (2013) How aluminum adjuvants could promote and enhance non-target IgE synthesis in a genetically-vulnerable sub-population. *J Immunotoxicol.* **10**, 210-222.
- Tipton CM, Fucile CF, Darce J, Chida A, Ichikawa T, Gregoretti I, Schieferl S, Hom J, Jenks S, Feldman RJ, Mehr R, Wei C, Lee FE, Cheung WC, Rosenberg AF, Sanz I (2015) Diversity, cellular origin and autoreactivity of antibody-secreting cell population expansions in acute systemic lupus erythematosus. *Nat.Immunol.* **16**, 755-765.
- Toussiroit E, Bereau M (2015) Vaccination and Induction of Autoimmune Diseases. *Inflamm.Allergy Drug Targets.* **14**, 94-98.
- Trentini F, Poletti P, Merler S, Melegaro A (2017) Measles immunity gaps and the progress towards elimination: a multi-country modelling analysis. *Lancet Infect.Dis.* **17**, 1089-1097.
- Trottier H (2005) Scaling properties of childhood infectious disease epidemics before and after mass vaccination in Canada. *J.Theor.Biol.* **235**, 326-337.
- Trottier H, Philippe P, Roy R (2006) Stochastic modeling of empirical time series of childhood infectious diseases data before and after mass vaccination. *Emerg.Themes.Epidemiol.* **3**, 9.
- Valyi-Nagy T, Dermody TS (2005) Role of oxidative damage in the pathogenesis of viral infections of the nervous system. *Histol.Histopathol.* **20**, 957-967.
- Viana PO, Ono E, Miyamoto M, Salomao R, Costa-Carvalho BT, Weckx LY, de Moraes-Pinto MI (2010) Humoral and cellular immune responses to measles and tetanus: the importance of elapsed time since last exposure and the nature of the antigen. *J Clin.Immunol.* **30**, 574-582.
- Vygen S, Fischer A, Meurice L, Mouchetrou N, I, Gregoris M, Ndiaye B, Ghenassia A, Poujol I, Stahl JP, Antona D, Le SY, Levy-Bruhl D, Rolland P (2016) Waning immunity against mumps in vaccinated young adults, France 2013. *Euro.Surveill* **21**, 30156.
- Wang B, Shao X, Wang D, Xu D, Zhang JA (2017) Vaccinations and risk of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: A systematic review and meta-analysis. *Autoimmun.Rev.* **16**, 756-765.
- Warfel JM, Edwards KM (2015) Pertussis vaccines and the challenge of inducing durable immunity. *Curr.Opin.Immunol.* **35**, 48-54.
- Whitaker JA, Ovsyannikova IG, Poland GA (2015) Adversomics: a new paradigm for vaccine safety and design. *Expert.Rev.Vaccines* **14**, 935-947.
- Wong SS, Yuen KY (2006) Avian influenza virus infections in humans. *Chest* **129**, 156-168.
- Yang Q, Fu C, Dong Z, Hu W, Wang M (2014) The effects of weather conditions on measles incidence in Guangzhou, Southern China. *Hum.Vaccin.Immunother.* **10**, 1104-1110.