

Kvantitativní multiplexní analýza PCR v reálném čase vakcín Moderna (Spikevax) a Pfizer (BNT162b2)

Sona Peková, MD, PhD.
TILIA LABORATORIES s.r.o.
Laboratoř pro molekulární diagnostiku
Pchery, Česká republika

08.03.2025



Kvantitativní multiplexní PCR v reálném čase

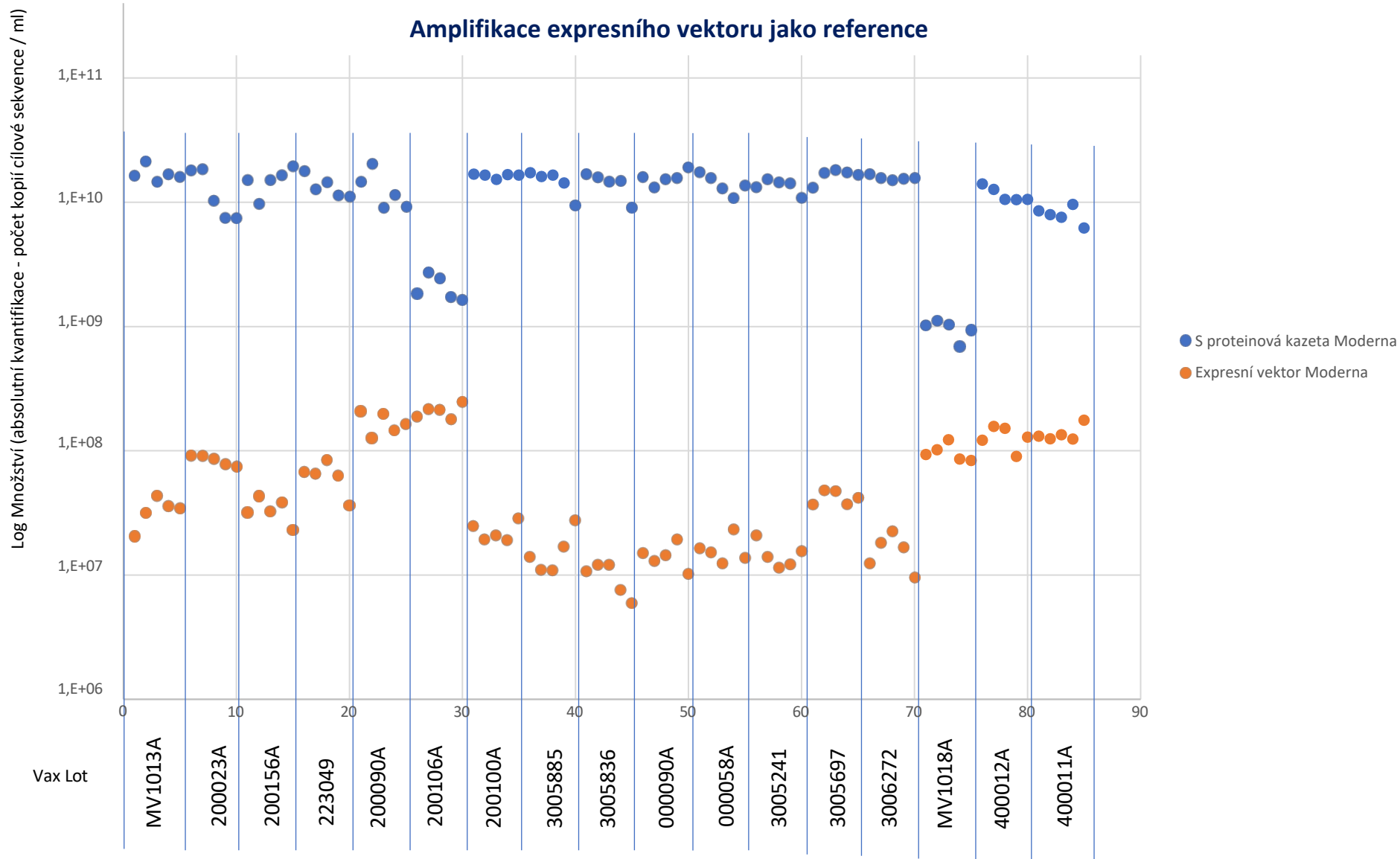
- Bivalentní expresní vektor Pfizer BNT162b2, kompletní sekvence, kruhový (Ref: OR134577)
- Syntetický konstrukt HCV1146 Moderna (mRNA-1273) sekvence vakcíny SARS-CoV-2 (Ref: OK120841)
- Analýza na úrovni mRNA (cDNA) i DNA
- Oligonukleotidy (primery a fluorescenčně značené hybridizační sondy) získané od společnosti Eurofins Genomics, DE
- Multiplexní kvantitativní PCR v reálném čase (FAM - proteinová kazeta Pfizer S, Cy5 - expresní vektor, ROX - proteinová kazeta Pfizer S).
Moderna S proteinová kazeta, HEX - Escherichia coli genomická DNA
- Izolace DNA / RNA - Qiagen DNA mini kit, Qiagen, DE
- Reverzní transkripce - Verso cDNA kit, ThermoFisher Scientific, USA
- Rotorgene Q, 5-Plex, Qiagen, DE
- Absolutní kvantifikace - počet kopií cílové sekvence / 1 ml
- Rovnice kalibrační křivky: $=10^{(-0,257 \cdot Ct + 11,897)}$
- Vakcíny uchovávané při -80 °C, čerstvé, dříve neotevřené analyzované šarže
- Moderna Spikevax: 17 šarží (5 ampulí / každá šarže)
- Pfizer BNT162b2: 7 šarží (5 ampulí / každá šarže)

VaXX_Plex - Multiplex Real Time PCR test - použité primery a sondy:

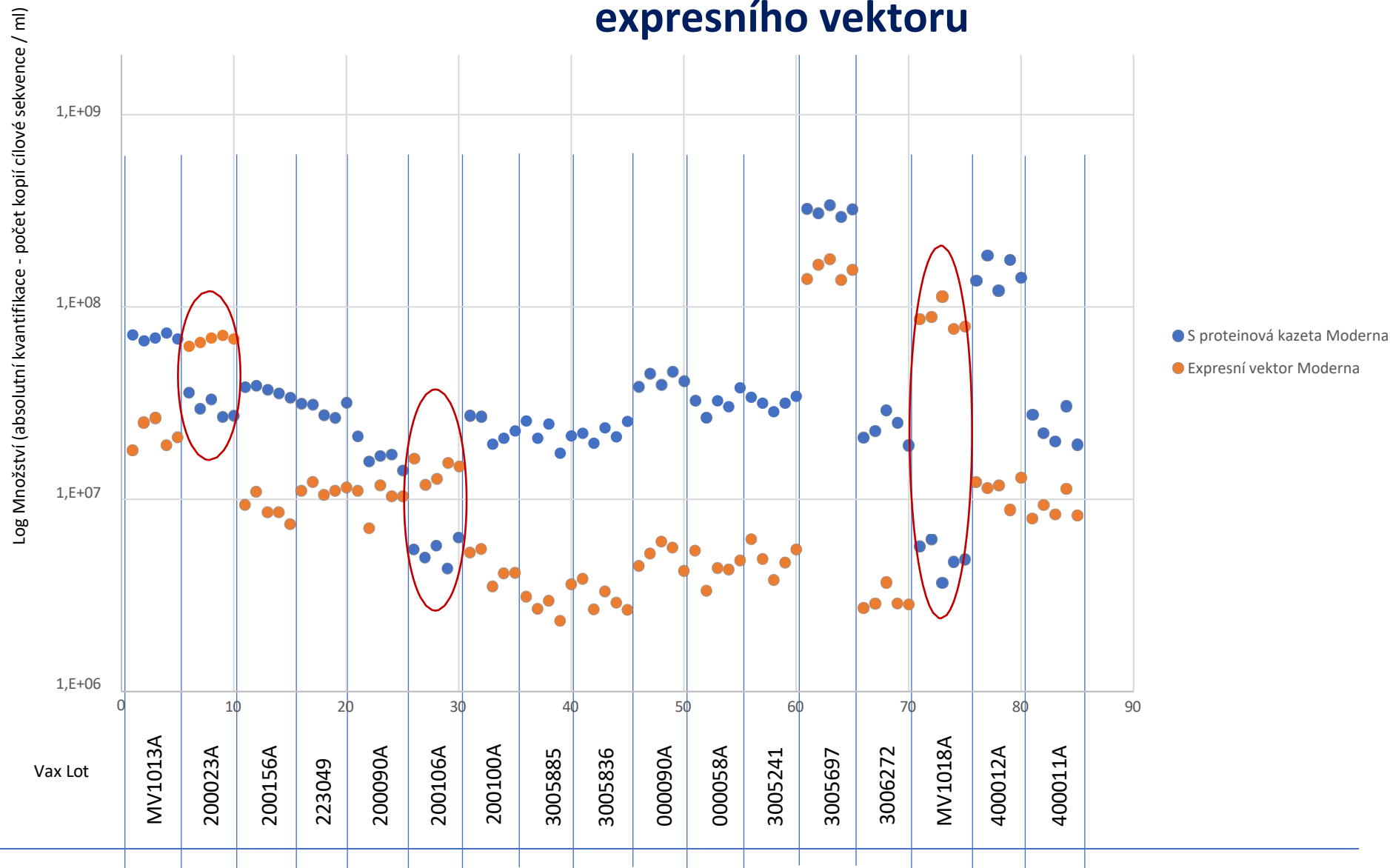
VaXX_Plex	100 uM (ul)	Sequence of the oligo 5'-3'
PfiMo common F	0,04	tgcggcaagggctaccacctgatgag
PfiMo common R	0,05	gggtgtgtcgggtgatgatctgg
VV_Ori_F	0,05	ctacatacctcgtctgtaatc
VV_Ori_R	0,05	gcgccttatccgtaactatc
EcoliITS-F03	0,05	CACTCAGGCCTACCAAATTTGCA
EcoliITS-R02	0,05	TCGCAGTGAACCTTTGCAGGTAC
EcoliITSProb_15	0,04	HEX - CGCATAGCTCCACCATCTCTGTAGTG - BHQ1
Mo Probe	0,04	ROX - tccccagagcgacccccacggagtgggtgtt - BHQ2
VV_Ori_Probe	0,04	Cy5 - tgctgccagtggcgataagtctgtctt - BHQ2
Pfi Probe	0,04	FAM - ccctcagtctgcccctcacggcgtgggtgtt - BHQ1
H2O	0,15	

Hladina mRNA (cDNA) Moderna Spikevax - S Protein Cassette

Amplifikace expresního vektoru jako reference



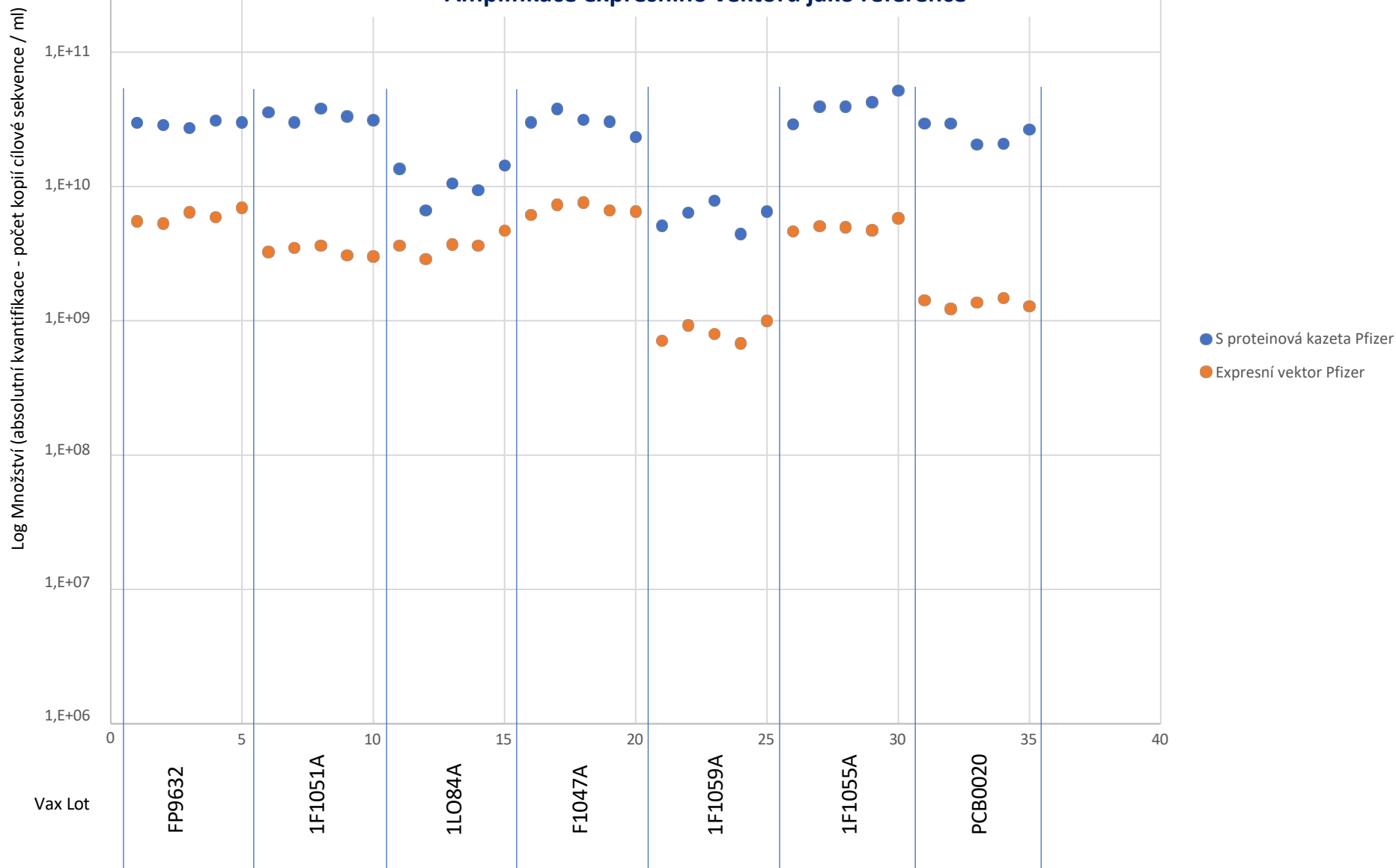
Moderna Spikevax - S Protein Cassette vs. úroveň DNA expresního vektoru



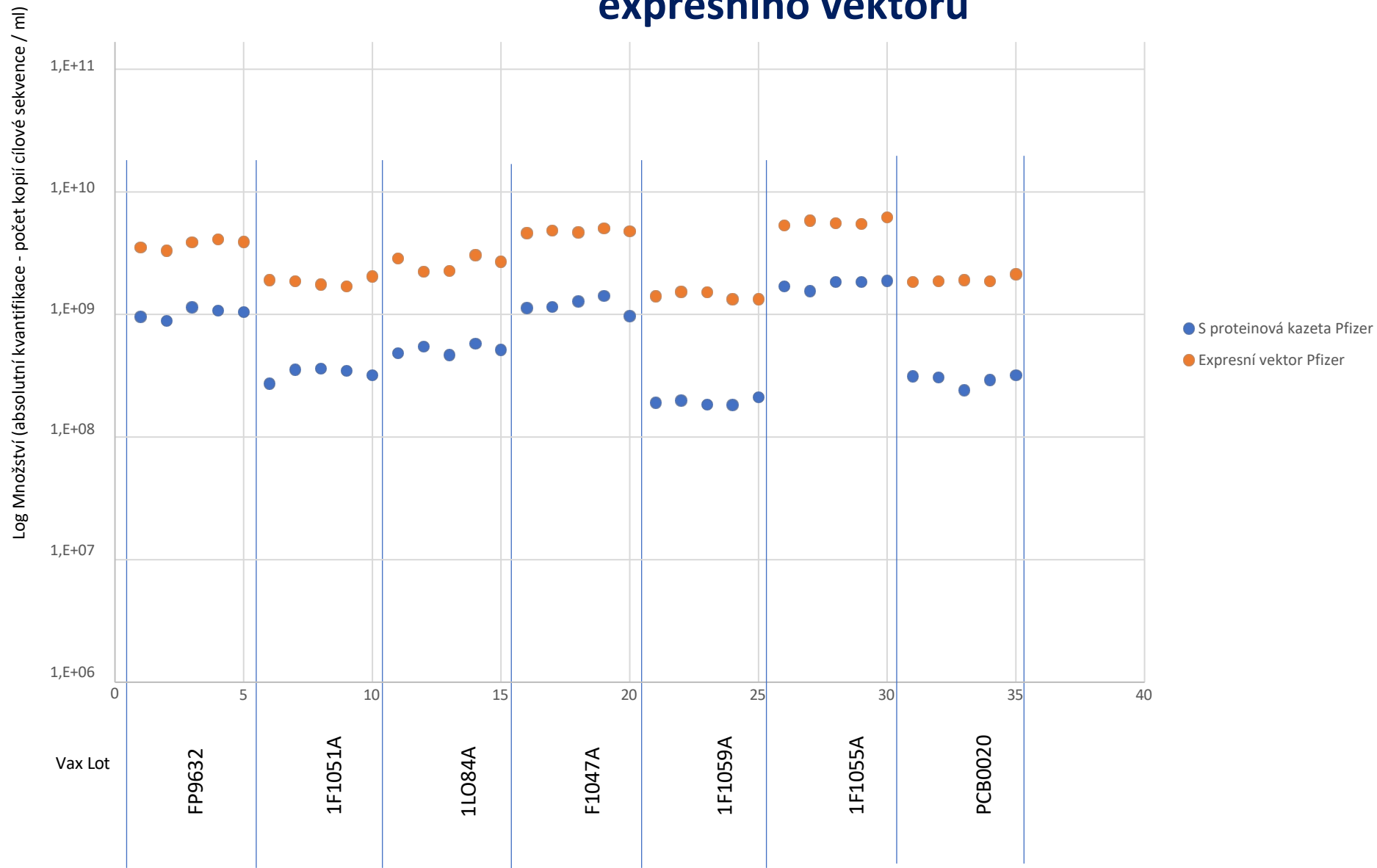
Pfizer BNT162b2 - proteinová kazeta S

úroveň mRNA (cDNA)

Amplifikace expresního vektoru jako reference



Pfizer BNT162b2 - proteinová kazeta S vs. úroveň DNA expresního vektoru



Moderna Spikevax - S Proteinová kazeta - ROX

Úroveň DNA

Rotor-Gene Q Series Software VIRTUAL MODE - 07032025 vaxM21-M76-P106-P120-DNAonly

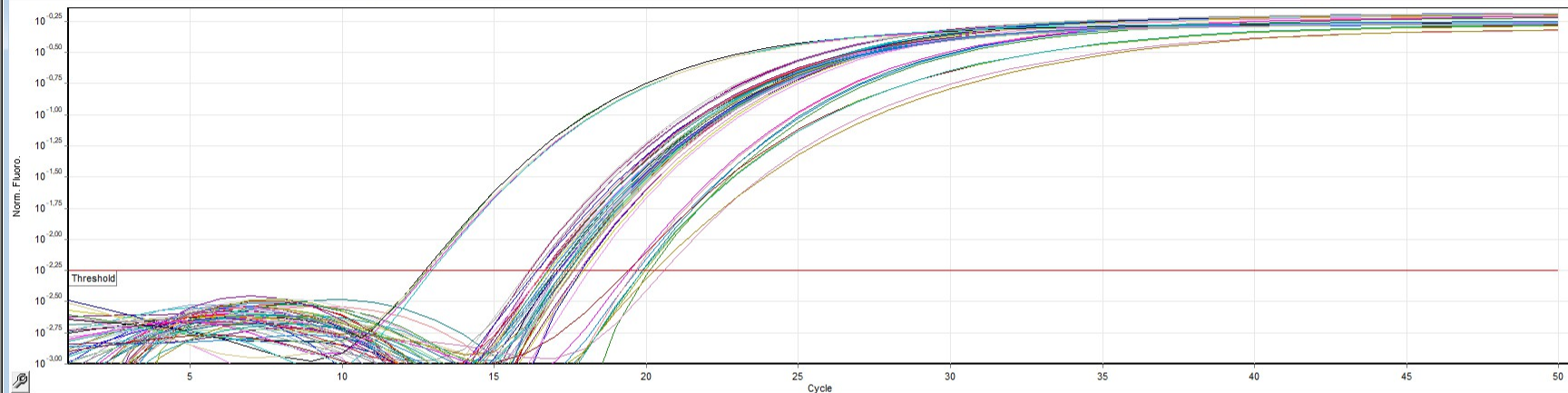
File Analysis Run Gain View Window Help

New Open Save Start Pause Stop View Settings Progress Profile Temp. Samples Analysis Reports Arrange

Channels Cycling A.Green Cycling A.Yellow Cycling A.Orange Cycling A.Red Cycling A.Crimson

Quantitation Analysis - Cycling A.Orange (Page 1)

Reports... Std. Curve Results Dynamic Tube Slope Correct Ignore First Take Off Adj. Outlier Removal... Save Defaults



Adjust Scale... Auto-Scale Default Scale Linear Scale

Quant. Results - Cycling A.Orange (Page 1)

No.	C Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (Cop)	Calc Conc (Copie)	% Var	Rep. Ct	Rep. Ct Stc	Rep. Ct (95% CI)	Rep. Calc. Conc.	Rep. Calc. Conc. (95%)
1	Moderna 21	Unknown	17.43					17.43				
2	Moderna 22	Unknown	17.92					17.92				
3	Moderna 23	Unknown	17.84					17.84				
4	Moderna 24	Unknown	17.80					17.80				
5	Moderna 25	Unknown	18.12					18.12				
6	Moderna 26	Unknown	19.69					19.69				
7	Moderna 27	Unknown	19.86					19.86				
8	Moderna 28	Unknown	19.63					19.63				
9	Moderna 29	Unknown	20.10					20.10				
10	Moderna 30	Unknown	19.44					19.44				
11	Moderna 31	Unknown	17.01					17.01				
12	Moderna 32	Unknown	17.02					17.02				
13	Moderna 33	Unknown	17.57					17.57				
14	Moderna 34	Unknown	17.47					17.47				
15	Moderna 35	Unknown	17.30					17.30				
16	Moderna 36	Unknown	17.08					17.08				
17	Moderna 37	Unknown	17.45					17.45				
18	Moderna 38	Unknown	17.14					17.14				
19	Moderna 39	Unknown	17.77					17.77				

Rotor-Gene Q Series Software 2.3.1

Page: Page 1

33	Moderna 53
34	Moderna 54
35	Moderna 55
36	Moderna 56
37	Moderna 57
38	Moderna 58
39	Moderna 59
40	Moderna 60
41	Moderna 61
42	Moderna 62
43	Moderna 63
44	Moderna 64
45	Moderna 65
46	Moderna 66
47	Moderna 67
48	Moderna 68
49	Moderna 69
50	Moderna 70
51	Moderna 71
52	Moderna 72
53	Moderna 73
54	Moderna 74
55	Moderna 75
56	Moderna 76
57	Pfizer 106
58	Pfizer 107
59	Pfizer 108
60	Pfizer 109
61	Pfizer 110
62	Pfizer 111
63	Pfizer 112
64	Pfizer 113

Bank On Bank Off
Named On All On All Off
Edit Samples...

CT Calculation

☐ Invert Raw Data

Threshold: 0.00561

Eliminate Cycles before: 1

Auto-Find Threshold

Standard Curve

N/A

N/A

Type: Floating

Import Curve... Reset

Imported Settings

VIRTUAL MODE

Moderna Spikevax - expresní vektor - úroveň DNA Cy5

Rotor-Gene Q Series Software VIRTUAL MODE - 07032025 vaxM21-M76-P106-P120-DNAonly

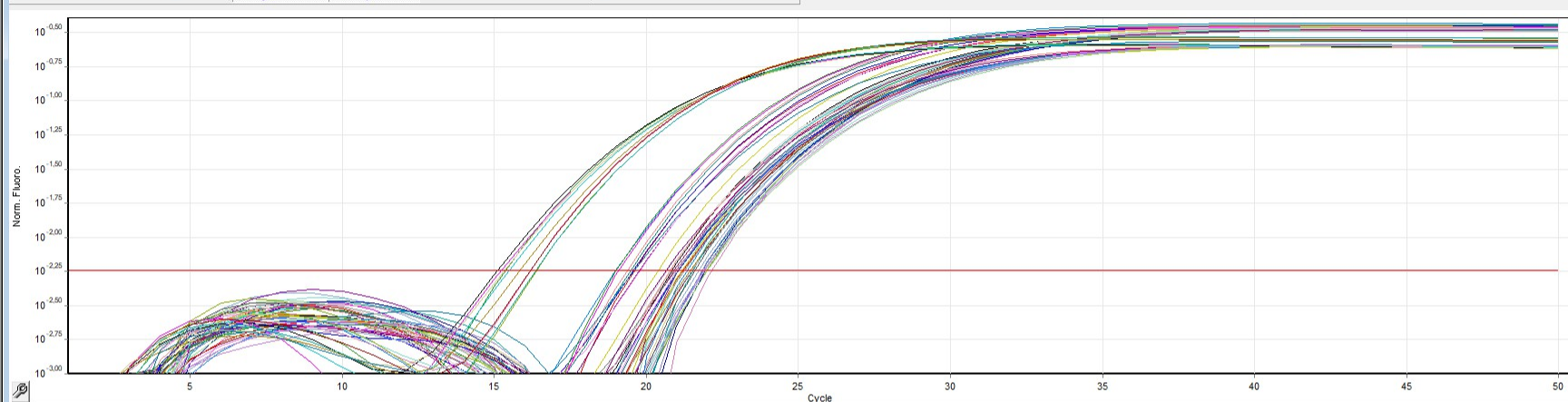
File Analysis Run Gain View Window Help

New Open Save Start Pause Stop View Settings Progress Profile Temp. Samples Analysis Reports Arrange

Channels Cycling A.Green Cycling A.Yellow Cycling A.Orange Cycling A.Red Cycling A.Crimson

Quantitation Analysis - Cycling A.Red (Page 1)

Reports... Std. Curve Results Dynamic Tube Slope Correct Ignore First Take Off Adj. Outlier Removal... Save Defaults



Adjust Scale... Auto-Scale Default Scale Linear Scale

Quant. Results - Cycling A.Red (Page 1)

No.	C	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (Cop)	Calc Conc (Copie)	% Var	Rep. Ct	Rep. Ct Stc	Rep. Ct (95% CI)	Rep. Calc. Conc.	Rep. Calc. Conc. (95%)
1		Moderna 21	Unknown	19.59					19.59				
2		Moderna 22	Unknown	20.38					20.38				
3		Moderna 23	Unknown	19.56					19.56				
4		Moderna 24	Unknown	19.76					19.76				
5		Moderna 25	Unknown	19.78					19.78				
6		Moderna 26	Unknown	19.00					19.00				
7		Moderna 27	Unknown	19.49					19.49				
8		Moderna 28	Unknown	19.37					19.37				
9		Moderna 29	Unknown	19.02					19.02				
10		Moderna 30	Unknown	19.09					19.09				
11		Moderna 31	Unknown	20.84					20.84				
12		Moderna 32	Unknown	20.77					20.77				
13		Moderna 33	Unknown	21.47					21.47				
14		Moderna 34	Unknown	21.24					21.24				
15		Moderna 35	Unknown	21.18					21.18				
16		Moderna 36	Unknown	21.71					21.71				
17		Moderna 37	Unknown	21.98					21.98				
18		Moderna 38	Unknown	21.88					21.88				
19		Moderna 39	Unknown	22.14					22.14				

Page: Page 1

33	Moderna 53
34	Moderna 54
35	Moderna 55
36	Moderna 56
37	Moderna 57
38	Moderna 58
39	Moderna 59
40	Moderna 60
41	Moderna 61
42	Moderna 62
43	Moderna 63
44	Moderna 64
45	Moderna 65
46	Moderna 66
47	Moderna 67
48	Moderna 68
49	Moderna 69
50	Moderna 70
51	Moderna 71
52	Moderna 72
53	Moderna 73
54	Moderna 74
55	Moderna 75
56	Moderna 76
57	Pfizer 106
58	Pfizer 107
59	Pfizer 108
60	Pfizer 109
61	Pfizer 110
62	Pfizer 111
63	Pfizer 112
64	Pfizer 113

Bank On Bank Off
Named On All On All Off
Edit Samples...

CT Calculation
☐ Invert Raw Data
Threshold: 0.00574
Eliminate Cycles before: 0
Auto-Find Threshold

Standard Curve
N/A
N/A
Type: Floating
Import Curve... Reset

Imported Settings

Rotor-Gene Q Series Software 2.3.1

VIRTUAL MODE

Pfizer BNT162b2 - S Proteinová kazeta - úroveň FAM DNA

Rotor-Gene Q Series Software VIRTUAL MODE - 07032025 vaxM21-M76-P106-P120-DNAonly

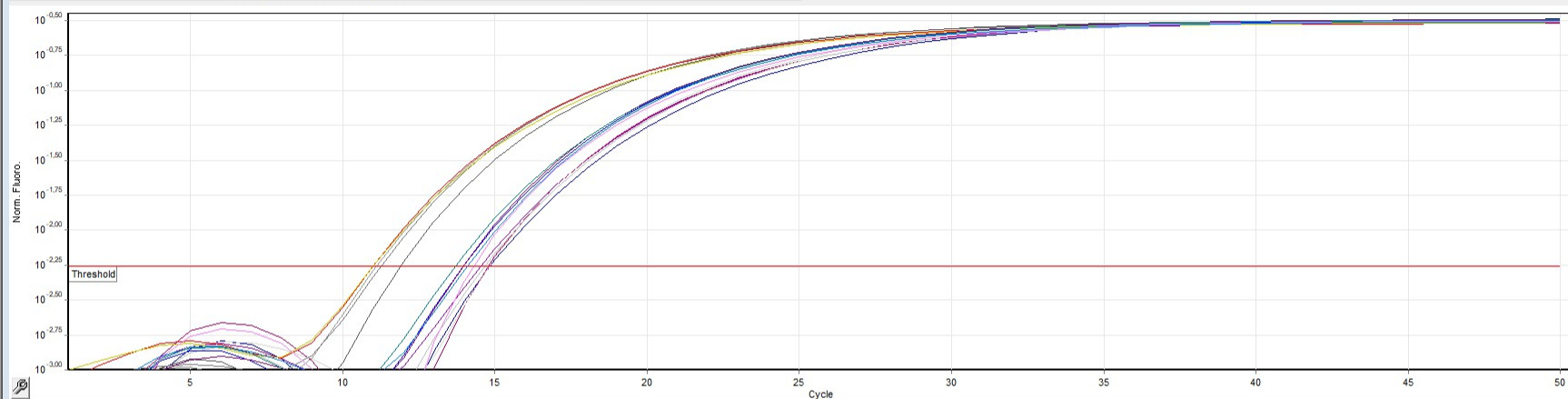
File Analysis Run Gain View Window Help

New Open Save Start Pause Stop View Settings Progress Profile Temp. Samples Analysis Reports Arrange

Channels Cycling A.Green Cycling A.Yellow Cycling A.Orange Cycling A.Red Cycling A.Crimson

Quantitation Analysis - Cycling A.Green (Page 1)

Reports... Std. Curve Results Dynamic Tube Slope Correct Ignore First Take Off Adj. Outlier Removal... Save Defaults



Quant. Results - Cycling A.Green (Page 1)

No.	C	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc. (Cop)	Calc Conc. (Cop)	% Var	Rep. Ct	Rep. Ct Stc	Rep. Ct (95% CI)	Rep. Calc. Conc.	Rep. Calc. Conc. (95%)
57		Pfizer 106	Unknown	14.83					14.83				
58		Pfizer 107	Unknown	14.54					14.54				
59		Pfizer 108	Unknown	14.78					14.78				
60		Pfizer 109	Unknown	14.81					14.81				
61		Pfizer 110	Unknown	14.66					14.66				
62		Pfizer 111	Unknown	11.10					11.10				
63		Pfizer 112	Unknown	11.26					11.26				
64		Pfizer 113	Unknown	11.89					11.89				
65		Pfizer 114	Unknown	10.99					10.99				
66		Pfizer 115	Unknown	11.00					11.00				
67		Pfizer 116	Unknown	13.95					13.95				
68		Pfizer 117	Unknown	13.95					13.95				
69		Pfizer 118	Unknown	14.28					14.28				
70		Pfizer 119	Unknown	14.09					14.09				
71		Pfizer 120	Unknown	13.69					13.69				

Page: Page 1

41	Moderna 61
42	Moderna 62
43	Moderna 63
44	Moderna 64
45	Moderna 65
46	Moderna 66
47	Moderna 67
48	Moderna 68
49	Moderna 69
50	Moderna 70
51	Moderna 71
52	Moderna 72
53	Moderna 73
54	Moderna 74
55	Moderna 75
56	Moderna 76
57	Pfizer 106
58	Pfizer 107
59	Pfizer 108
60	Pfizer 109
61	Pfizer 110
62	Pfizer 111
63	Pfizer 112
64	Pfizer 113
65	Pfizer 114
66	Pfizer 115
67	Pfizer 116
68	Pfizer 117
69	Pfizer 118
70	Pfizer 119
71	Pfizer 120
72	neg. VaxoFlex

Bank On Bank Off
Named On All On All Off
Edit Samples...

Rotor-Gene Q Series Software 2.3.1

VIRTUAL MODE

9°C Částeč. oblačno 18:12 08.03.2025

Pfizer BNT162b2 - Expresní vektor - hladina DNA Cy5

Rotor-Gene Q Series Software VIRTUAL MODE - 07032023 vaxM21-M76-P106-P120-DNAonly

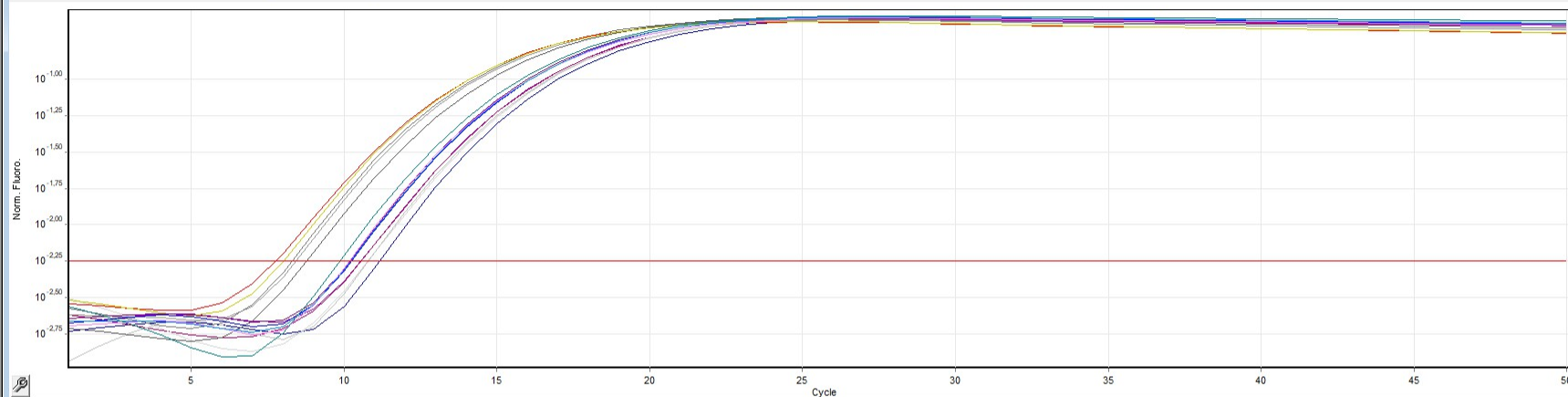
File Analysis Run Gain View Window Help

New Open Save Start Pause Stop View Settings Progress Profile Temp. Samples Analysis Reports Arrange

Channels Cycling A.Green Cycling A.Yellow Cycling A.Orange Cycling A.Red Cycling A.Crimson

Quantitation Analysis - Cycling A.Red (Page 1)

Reports... Std. Curve Results Dynamic Tube Slope Correct Ignore First Take Off Adj. Outlier Removal... Save Defaults



Quant. Results - Cycling A.Red (Page 1)

No.	C Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc. [Cop]	Calc Conc. [Copie]	% Var	Rep. Ct	Rep. Ct Stc	Rep. Ct (95% CI)	Rep. Calc. Con
57	Pfizer 106	Unknown	11.18					11.18			
58	Pfizer 107	Unknown	10.56					10.56			
59	Pfizer 108	Unknown	10.57					10.57			
60	Pfizer 109	Unknown	10.79					10.79			
61	Pfizer 110	Unknown	10.79					10.79			
62	Pfizer 111	Unknown	8.45					8.45			
63	Pfizer 112	Unknown	8.30					8.30			
64	Pfizer 113	Unknown	8.78					8.78			
65	Pfizer 114	Unknown	7.77					7.77			
66	Pfizer 115	Unknown	8.03					8.03			
67	Pfizer 116	Unknown	10.25					10.25			
68	Pfizer 117	Unknown	10.22					10.22			
69	Pfizer 118	Unknown	10.18					10.18			
70	Pfizer 119	Unknown	10.22					10.22			
71	Pfizer 120	Unknown	9.86					9.86			

Page: Page 1

33	Moderna 53
34	Moderna 54
35	Moderna 55
36	Moderna 56
37	Moderna 57
38	Moderna 58
39	Moderna 59
40	Moderna 60
41	Moderna 61
42	Moderna 62
43	Moderna 63
44	Moderna 64
45	Moderna 65
46	Moderna 66
47	Moderna 67
48	Moderna 68
49	Moderna 69
50	Moderna 70
51	Moderna 71
52	Moderna 72
53	Moderna 73
54	Moderna 74
55	Moderna 75
56	Moderna 76
57	Pfizer 106
58	Pfizer 107
59	Pfizer 108
60	Pfizer 109
61	Pfizer 110
62	Pfizer 111
63	Pfizer 112
64	Pfizer 113

Bank On Bank Off
Named On All On All Off
Edit Samples...

CT Calculation

☐ Invert Raw Data

Threshold: 0.00564

Eliminate Cycles before:

Auto-Find Threshold

Standard Curve

N/A

N/A

Type: Floating

Import Curve... Reset

Imported Settings

Rotor-Gene Q Series Software 2.3.1

VIRTUAL MODE

18:13
08.03.2023

Množství kazet S proteinu na úrovni mRNA (cDNA) a DNA ve vakcínách Moderna Spikevax a Pfizer BNT162b2

	S proteinová kazeta mRNA (cDNA) (počet kopií / ml)	S proteinová kazeta DNA (počet kopií / ml)
Moderna Spikevax	10e9 - 10e10	10e7 - 10e9
Pfizer BNT162b2	10e10 - 10e11	10e8 - 10e9

Žádný z výrobců nedeklaroval, že by obsah DNA byl běžnou součástí vakcín. Vysoké množství DNA přítomné v testovaných vzorcích vylučuje možnost pouhé kontaminace během výrobního procesu.

Souhrn

- Na úrovni mRNA (cDNA) byl při použití S proteinových kazet jako detekčních cílů pozorován pozoruhodný rozdíl v množství mRNA u vakcín Moderna Spikevax a Pfizer BNT162b2 (1-2 řády velikosti; modré tečky v příslušných grafech).
- U šarží Moderna 200106A, MV1018A a 20023A lze vzhledem k obrácenému poměru množství expresního vektoru a kazety S proteinu předpokládat, že v testovaných šaržích jsou přítomny další cíle DNA klonované v expresním vektoru. Příslušné šarže přípravku Moderna jsou zvýrazněny červenými ovály. K objasnění této otázky by byla zapotřebí podrobnější analýza.
- Vakcíny Moderna Spikevax i Pfizer BNT162b2 obsahují vysoké množství expresních kazet DNA proteinu S v množství srovnatelném s množstvím mRNA, která je jedinou deklarovanou aktivní molekulární složkou (podle příbalových letáků poskytnutých výrobcí).
 - Vakcíny Moderna Spikevax obsahují **10e7 - 10e9** kopií expresní kazety **DNA** S proteinu / ml.
 - Vakcíny Pfizer BNT162b2 obsahují **10e8 - 10e9** kopií expresní kazety **DNA** S proteinu / ml.

Tato množství DNA, kvantitativně srovnatelná s množstvím aktivní mRNA, nemohou být považována za "kontaminaci". Kontaminace by se obvykle očekávala v množství několika řádů nižší.