

PCR quantitativa multiplex in tempo reale analisi di Moderna (Spikevax) e Vaccini Pfizer (BNT162b2)

Sona Pekova, MD, PhD. TILIA
LABORATORIES sro Laboratorio di
diagnostica molecolare
Pchery, Repubblica Ceca

08.03.2025



PCR quantitativa multiplex in tempo reale

- Vettore di espressione bivalente Pfizer BNT162b2, sequenza completa, circolare (Rif: OR134577)
- Costrutto sintetico HCV1146 Moderna (mRNA-1273) sequenza del vaccino SARS-CoV-2 (Rif: OK120841)
- Analisi sia a livello di mRNA (cDNA) che di DNA
- Oligonucleotidi (primer e sonde di ibridazione marcate con fluorescenza) ottenuti da Eurofins Genomics, DE
- Multiplex Quantitative Real-Time PCR (FAM – cassetta proteica S di Pfizer, Cy5 – vettore di espressione, ROX – cassetta proteica S di Moderna, HEX – DNA genomico di Escherichia coli)
- Isolamento di DNA/RNA – Qiagen DNA mini kit, Qiagen, DE
- Trascrizione inversa - Kit cDNA Verso, ThermoFisher Scientific, USA
- Rotorgene Q, 5-Plex, Qiagen, DE
- Quantificazione assoluta – numero di copie della sequenza target / 1 ml
- Equazione della curva di calibrazione: $=10^{(-0,257*Ct+11,897)}$
- Vaccini conservati a -80°C , lotti freschi e precedentemente non aperti analizzati
- Moderna Spikevax: 17 lotti (5 fiale/ogni lotto)
- Pfizer BNT162b2: 7 lotti (5 fiale/ogni lotto)

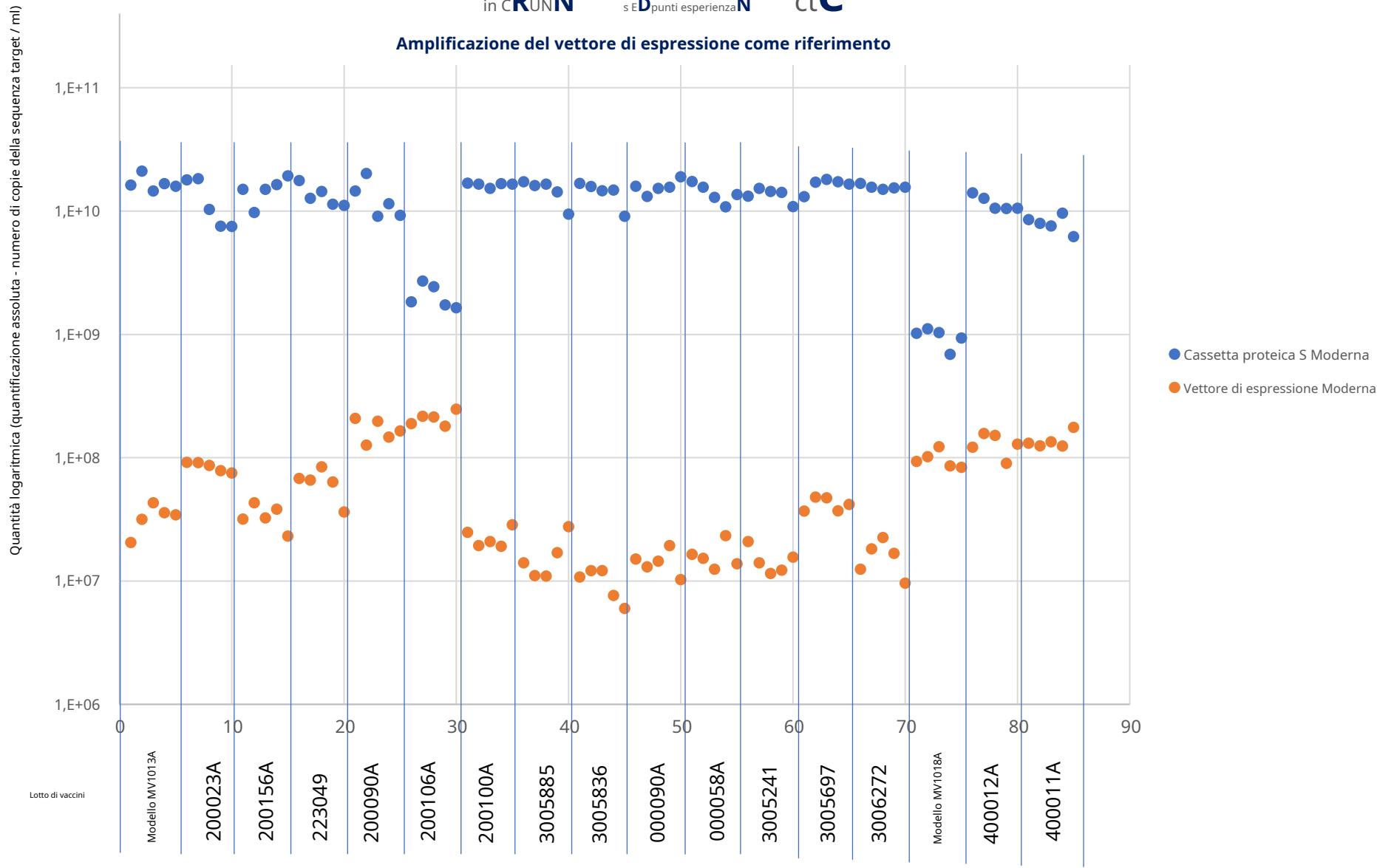
VaXX_Plex – Test Multiplex Real Time PCR – primer e sonde utilizzati:

| VaXX_Plex | 100 uM (ul) | Sequence of the oligo 5'-3' |
|------------------------|-------------|---|
| PfMo common F | 0,04 | tgcggcaagggtcacccatgtatgg |
| PfMo common R | 0,05 | ggtgttgtcggtgtatgtatctgg |
| VV_Ori_F | 0,05 | ctacataccctcgctctgtataatc |
| VV_Ori_R | 0,05 | gcgccttatccgttaactatc |
| EcoliTS-F03 | 0,05 | CACTCAGGCCTACAAATTGCA |
| EcoliTS-R02 | 0,05 | TCGCAGTGAACCTTGCAGGTAC |
| EcoliTSProb_15 | 0,04 | HEX - CGCATAGCTCCACCATCTCTGTAGTG - BHQ1 |
| Mo Probe | 0,04 | ROX - tccccagagcgcacccacggatgttt - BHQ2 |
| VV_Ori_Probe | 0,04 | Cy5 - tgctgcaggatggcataagtgttct - BHQ2 |
| Pfi Probe | 0,04 | FAM - cccctagtcgcctcacggctgtt - BHQ1 |
| H2O | 0,15 | |
| celkem na jednu reakci | 0,6 | |

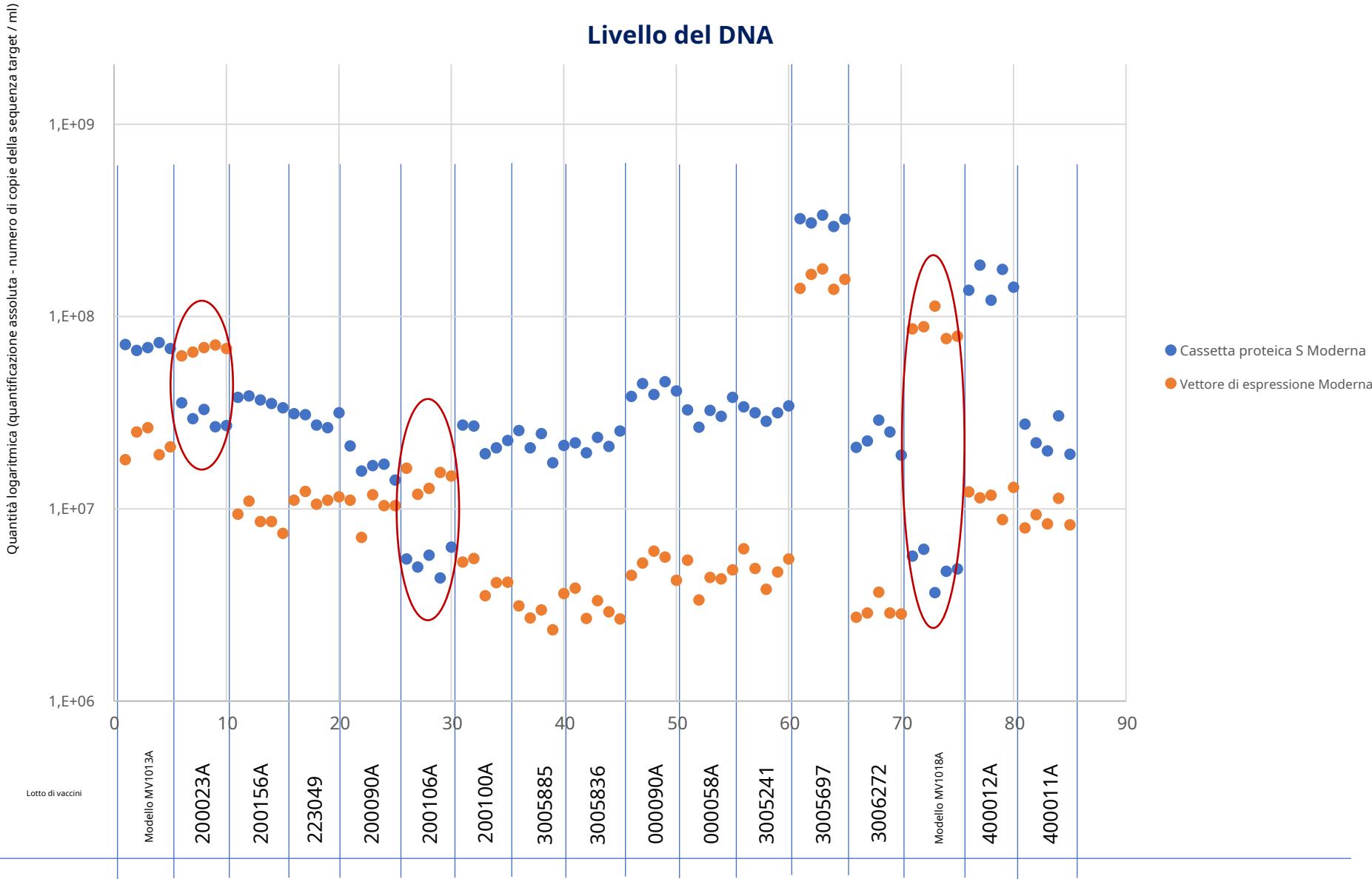
Moderna Spikevax - Cassetta proteica S

Moderna S Prote M ssUN(C risUNsiNlveO, Livello di mRNA, numero di copie
 in C RUNN s E punti esperienzaN ct e

Amplificazione del vettore di espressione come riferimento



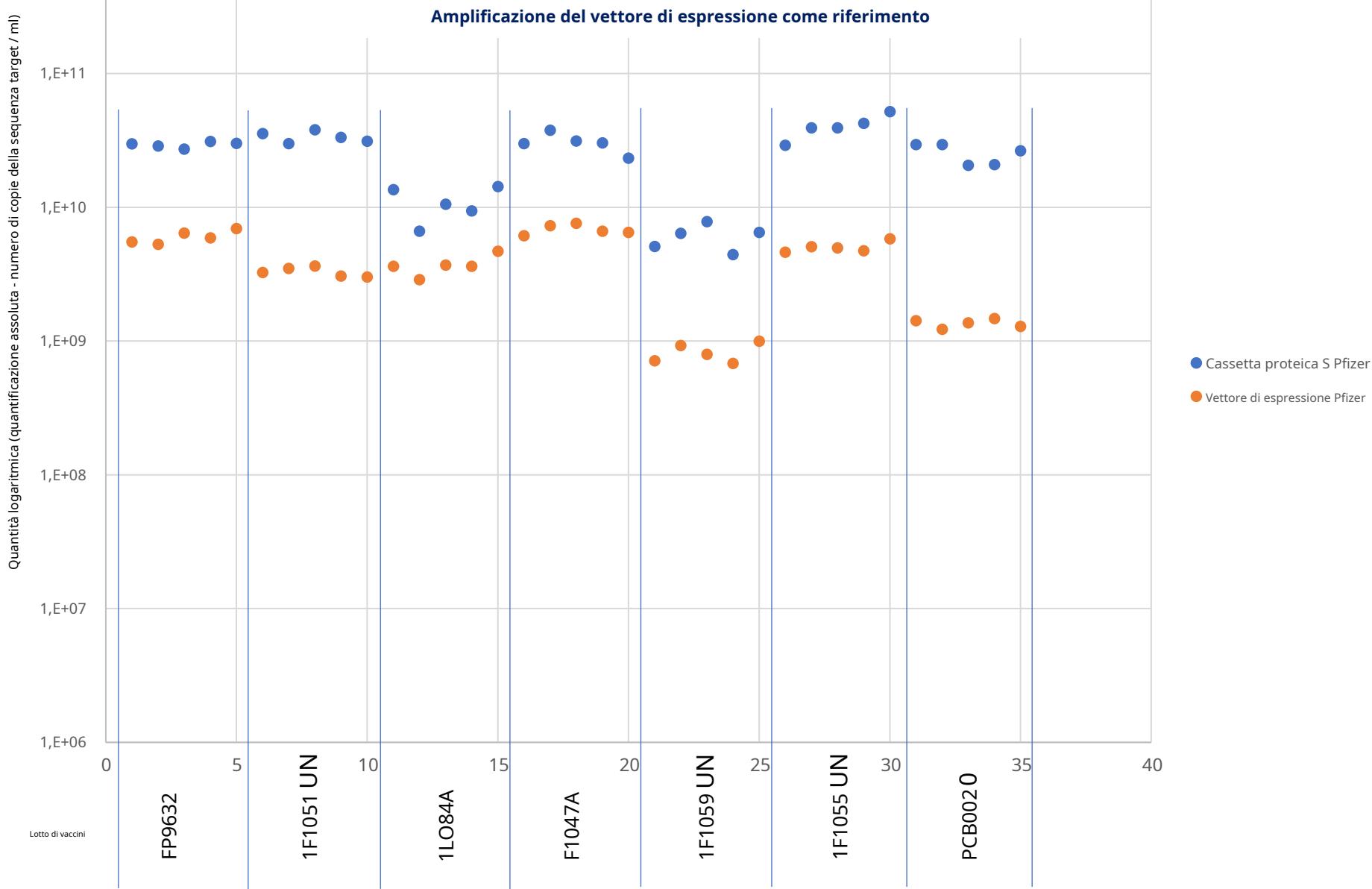
Moderna S P o i o D k v s U N P X m a r c i e - u n o S C P o T e e c o n t r o N I N S S I T T e r , d v N S U N E X R e p y N s t u o n V e t t o r e



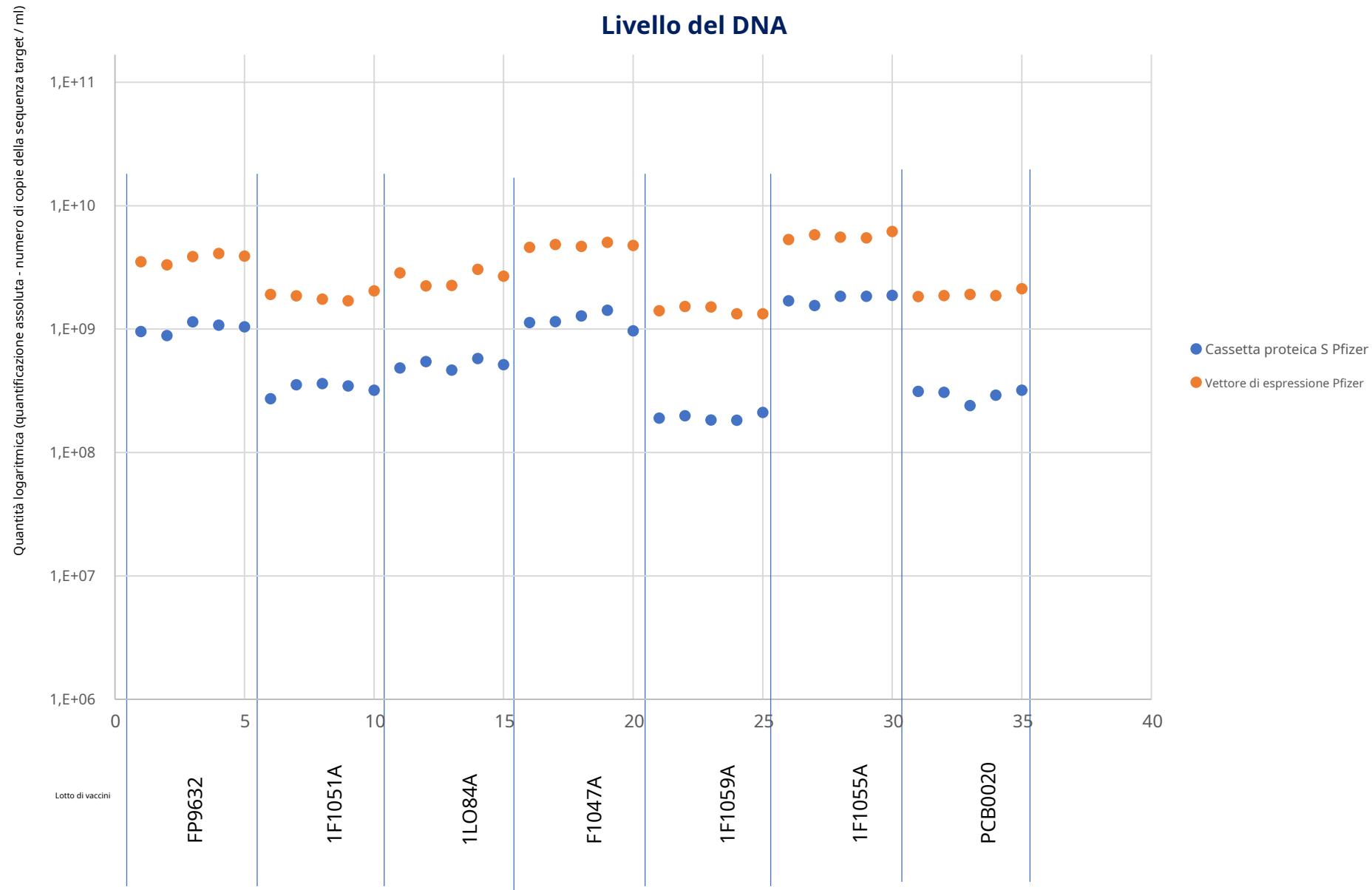
Cassetta proteica Pfizer BNT162b2 - S

Livello di mRNA (cDNA)

Amplificazione del vettore di espressione come riferimento

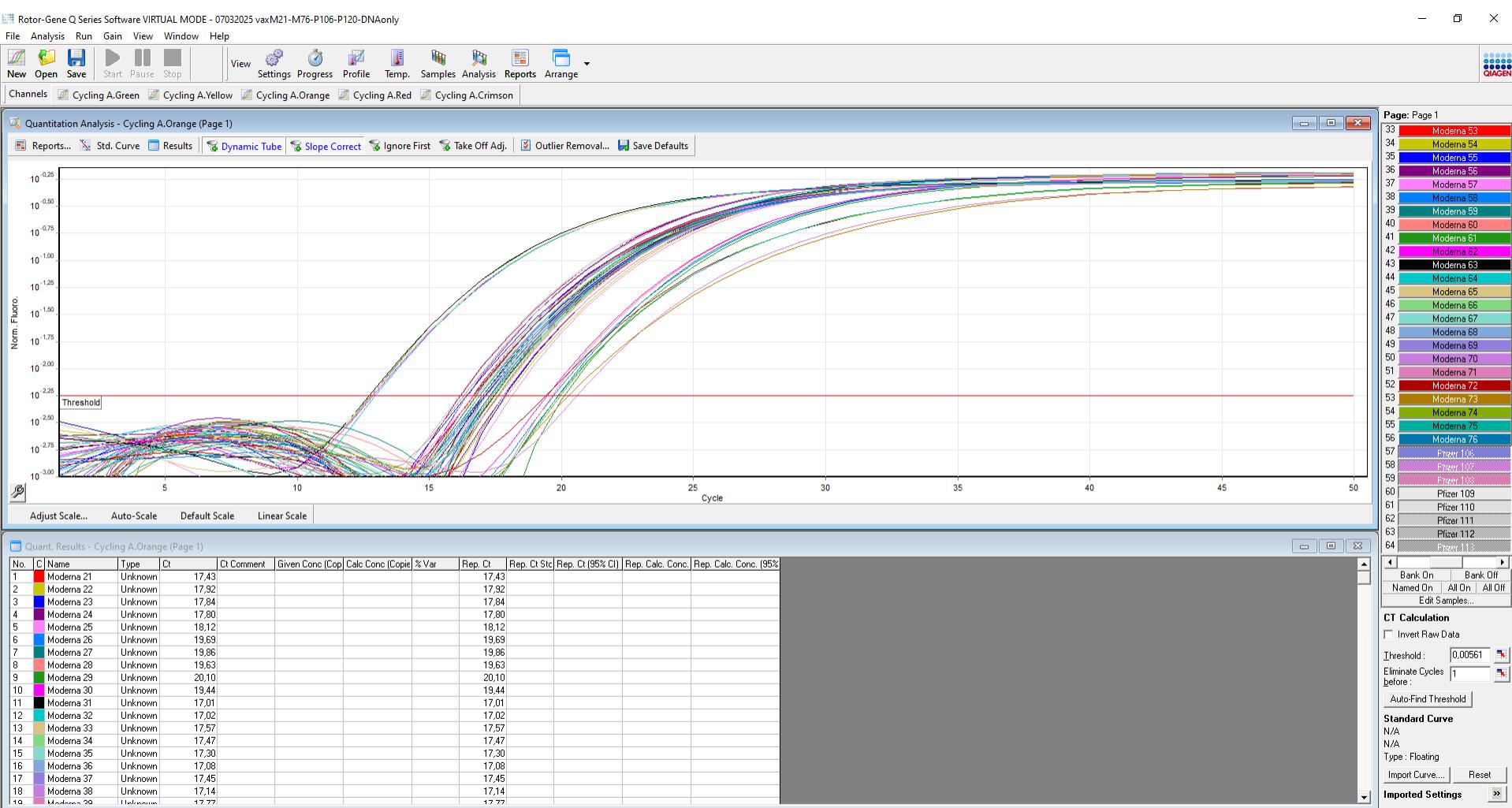


Pfizer BNT162B2 - Sputnik V



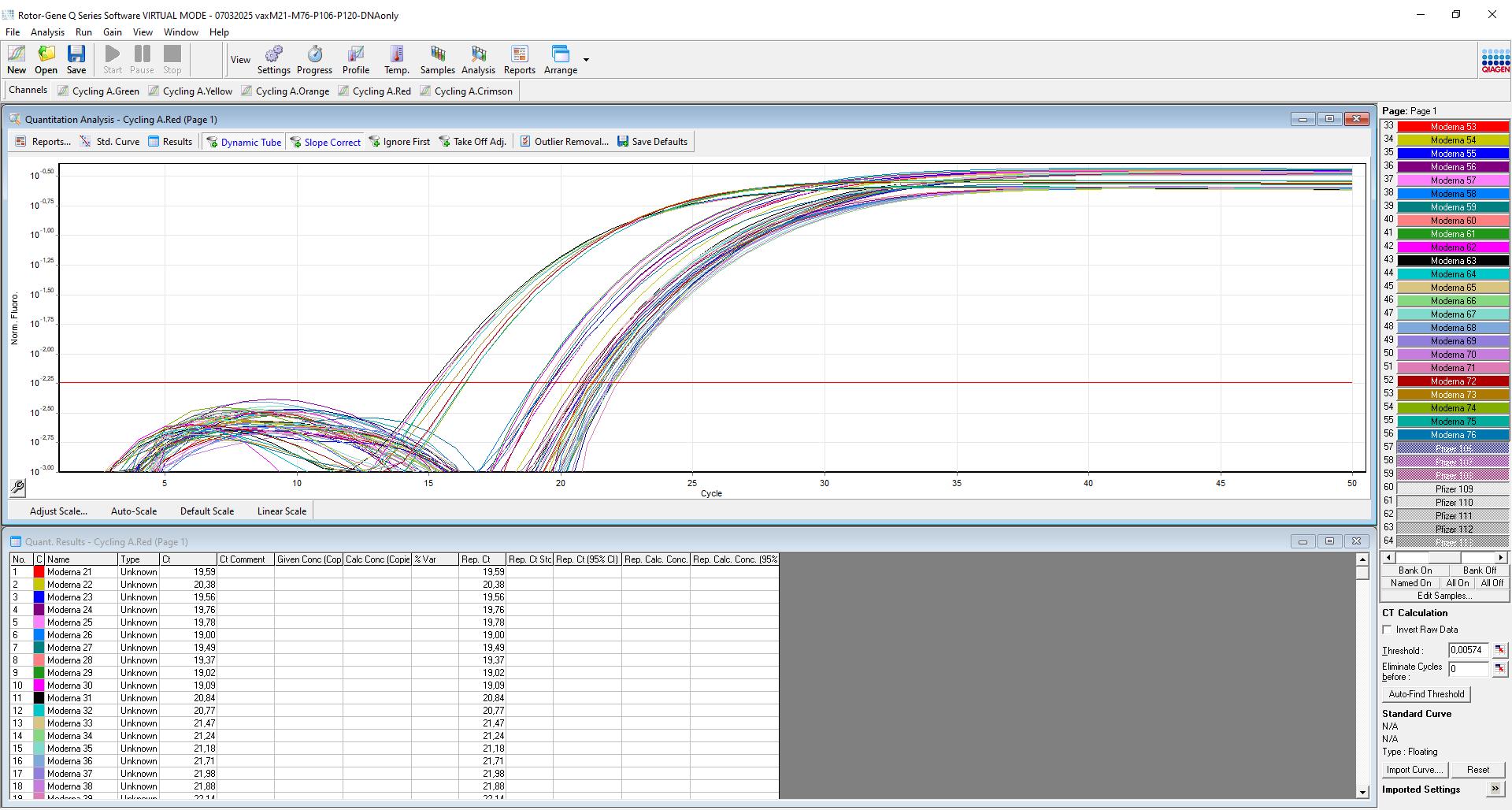
Moderna Spikevax - Cassetta proteica S - ROX

Livello del DNA



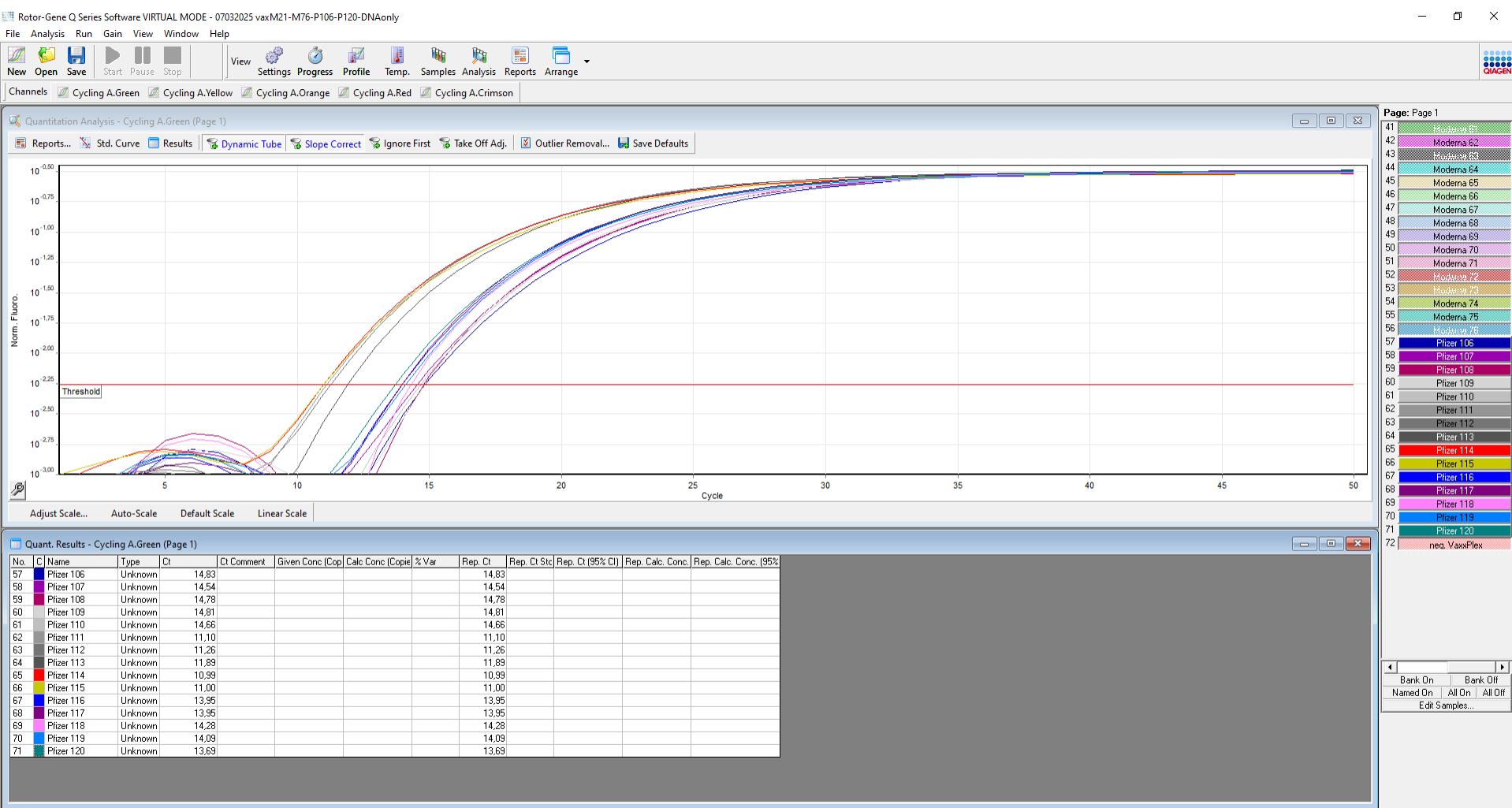
Moderna Spikevax - Vettore di espressione – Cy5

Livello del DNA



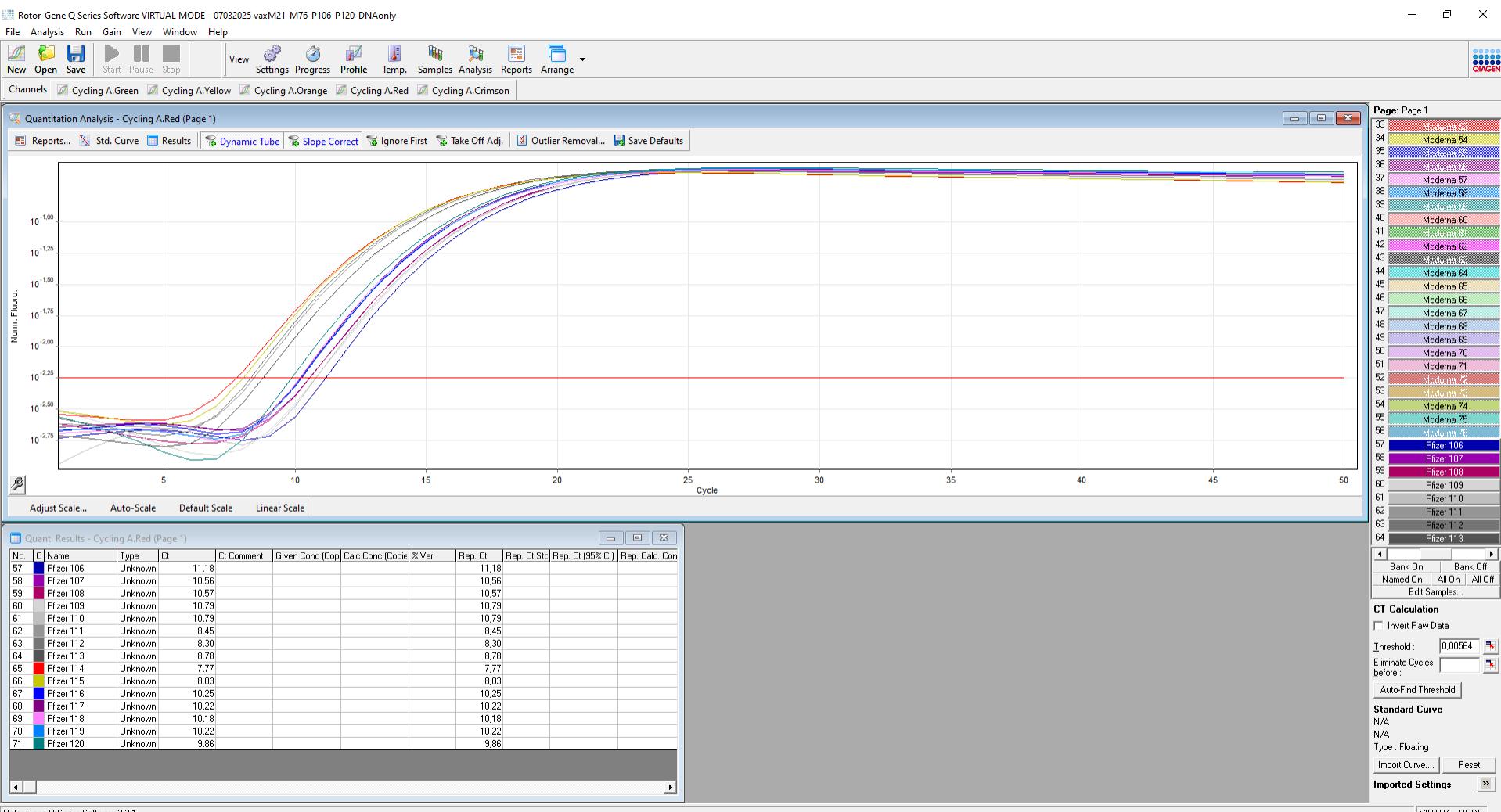
Pfizer BNT162b2 - Cassetta proteica S - FAM

Livello del DNA



Pfizer BNT162b2 – Vettore di espressione – Cy5

Livello del DNA



Quantità di cassette proteiche S a livello di mRNA (cDNA) e DNA nei vaccini Moderna Spikevax e Pfizer BNT162b2

| | Cassetta proteica S mRNA (cDNA) (numero di copie / ml) | Cassetta proteica S DNA (numero di copie / ml) |
|------------------|---|---|
| Moderna Spikevax | 10e9 – 10e10 | 10e7 – 10e9 |
| Pfizer BNT162b2 | 10e10 – 10e11 | 10e8 – 10e9 |

Nessuno dei due produttori ha dichiarato che il DNA sia un componente abituale delle formulazioni vaccinali. Le elevate quantità di DNA presenti nei campioni analizzati escludono la possibilità di una mera contaminazione durante il processo di produzione.

Riepilogo

- A livello di mRNA (cDNA), utilizzando le cassette proteiche S come target di rilevamento, è stata osservata una differenza notevole nella quantità di mRNA sia nei vaccini Moderna Spikevax che Pfizer BNT162b2 (1-2 ordini di grandezza; punti blu nei rispettivi grafici).
- Nei lotti Moderna 200106A, MV1018A e 20023A, dato il rapporto invertito tra le quantità del vettore di espressione e della cassetta proteica S, si potrebbe sospettare la presenza di altri bersagli di DNA clonati nel vettore di espressione nei lotti testati. I rispettivi lotti Moderna sono evidenziati da ovali rossi. Sarebbero necessarie analisi più dettagliate per chiarire la questione.
- Sia il vaccino Moderna Spikevax che quello Pfizer BNT162b2 contengono elevate quantità di cassette di espressione del DNA della proteina S, con quantità paragonabili a quelle di mRNA, che è l'unico principio attivo molecolare dichiarato (come riportato nei foglietti illustrativi forniti dai produttori).
 - I vaccini Moderna Spikevax contengono **10e7 - 10e9** copie di **DNACassetta di espressione della proteina S / ml**
 - I vaccini Pfizer BNT162b2 contengono **10e8-10e9** copie di **DNACassetta di espressione della proteina S / ml**

Queste quantità di DNA, quantitativamente paragonabili alle quantità di mRNA attivo, non possono essere considerate una "contaminazione". La contaminazione, in genere, sarebbe prevedibile a quantità di diversi ordini di grandezza inferiori.