

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: $=10^{(-0,257 \cdot Ct + 11,897)}$
- 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)

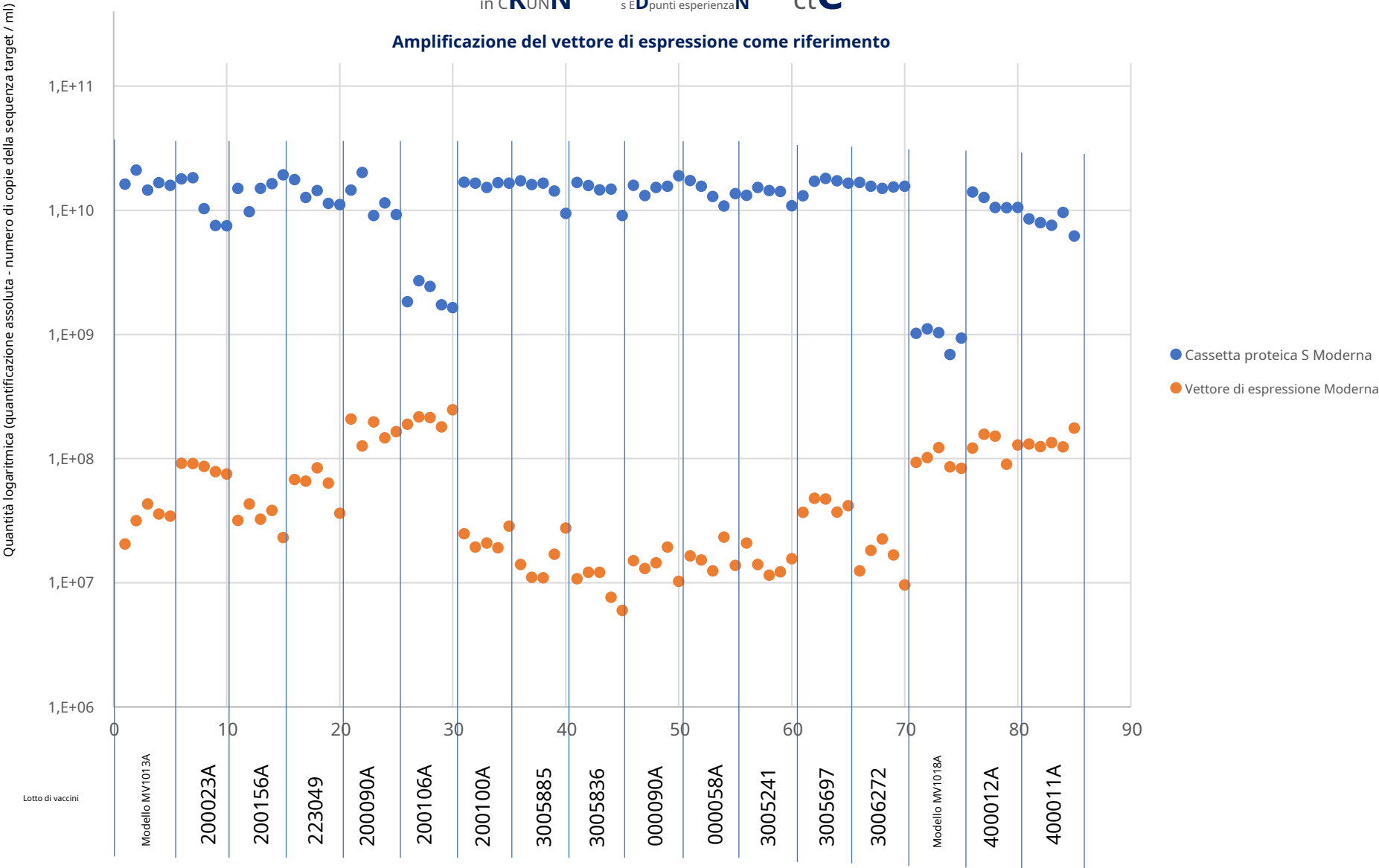
VaXX_Plex – Test Multiplex Real Time PCR – primer e sonde utilizzati:

VaXX_Plex	100 uM (ul)	Sequence of the oligo 5'-3'
PfiMo common F	0,04	tgcggcaagggtaccacctgatgag
PfiMo common R	0,05	ggtgttgcgggtgatgatctgg
VV_Ori_F	0,05	ctacatacctcgtctgctaac
VV_Ori_R	0,05	gcgccttatccggaactac
EcoliITS-F03	0,05	CACTCAGGCCTACCAAAATTGCA
EcoliITS-R02	0,05	TCGCAGTGAACCTTTGCAGGTAC
EcoliITSProb_15	0,04	HEX - CGCATAGCTCCACCATCTCTGTAGTG - BHQ1
Mo Probe	0,04	ROX - tccccagagcgacccccaggagtgggttt - BHQ2
VV_Ori_Probe	0,04	Cy5 - tgctgccagtggcgataagtctgtctt - BHQ2
Pfi Probe	0,04	FAM - ccctcagtctgccctcacggcgtgggttt - BHQ1
H2O	0,15	
celkem na jednu reakci	0,6	

Moderna Spikevax - Cassetta proteica S

Moderna S Protein (Crisis) Level, Livello di mRNA, numero di copie
in CRUN s D punti esperienza N ct e

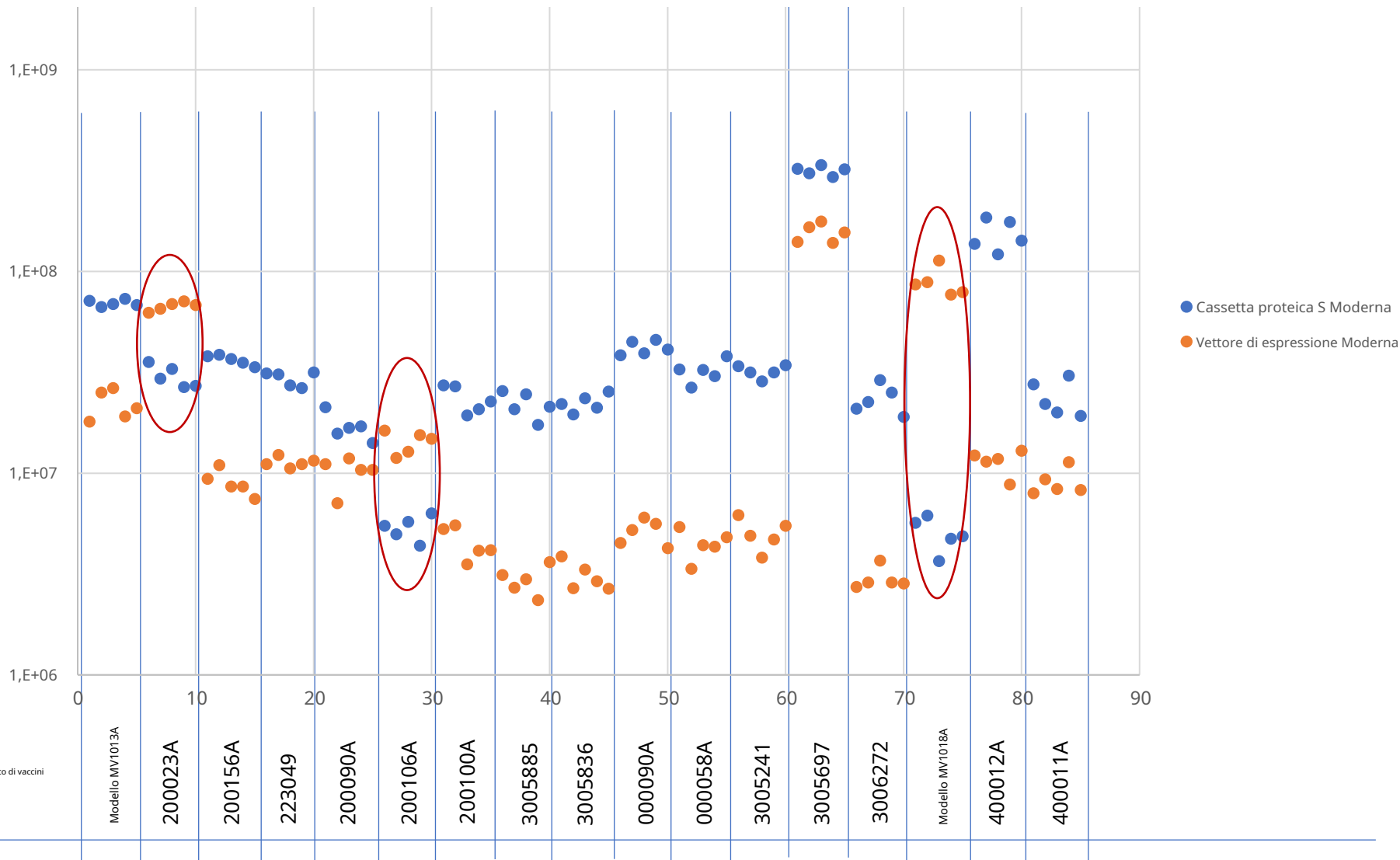
Amplificazione del vettore di espressione come riferimento



Moderna S.P.A. vs UNX marcire-uno SCP Proteoio nns Sse TTe vS EX Res sio n Vettore

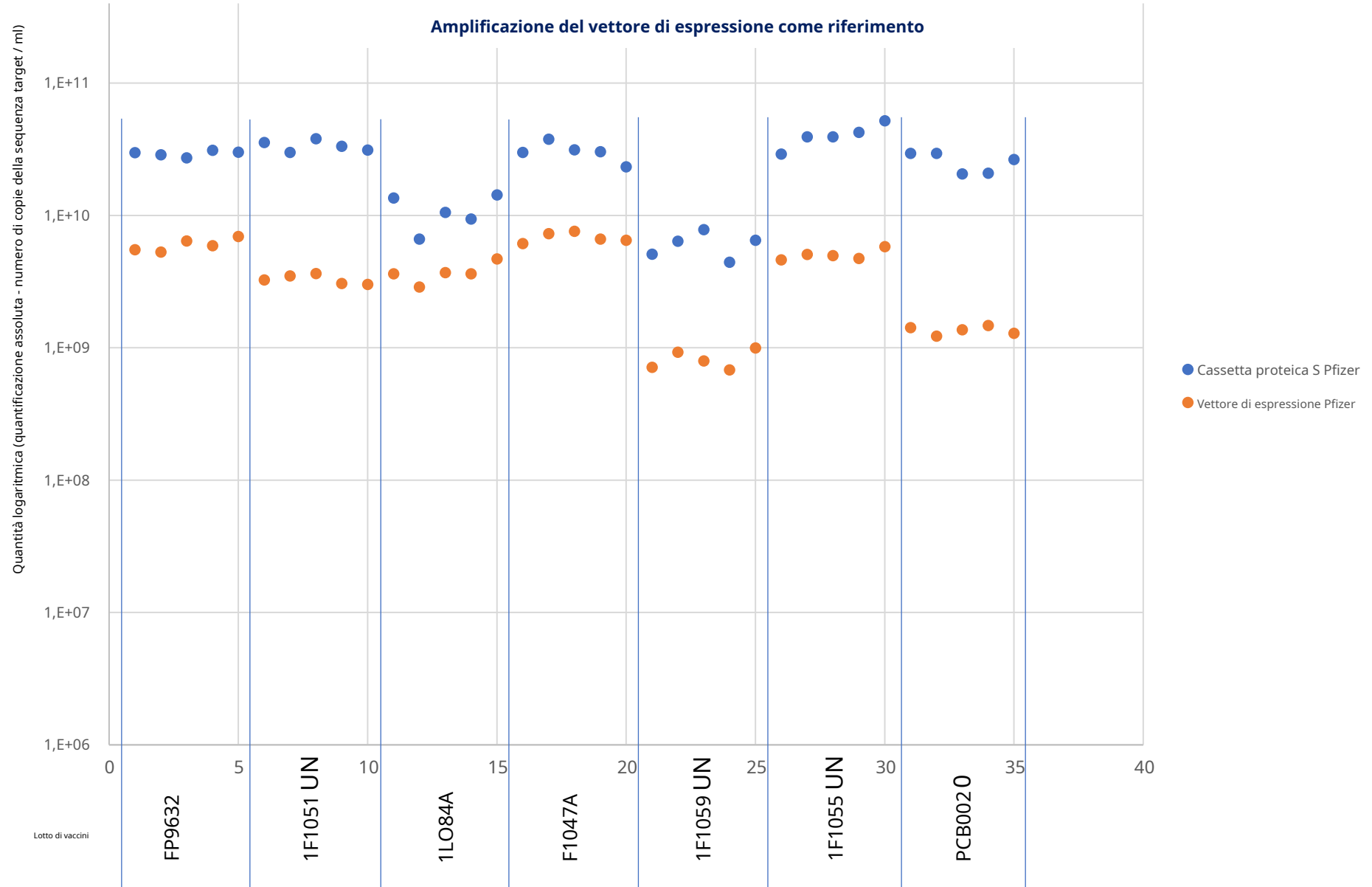
Quantità logaritmica (quantificazione assoluta - numero di copie della sequenza target / ml)

Livello del DNA

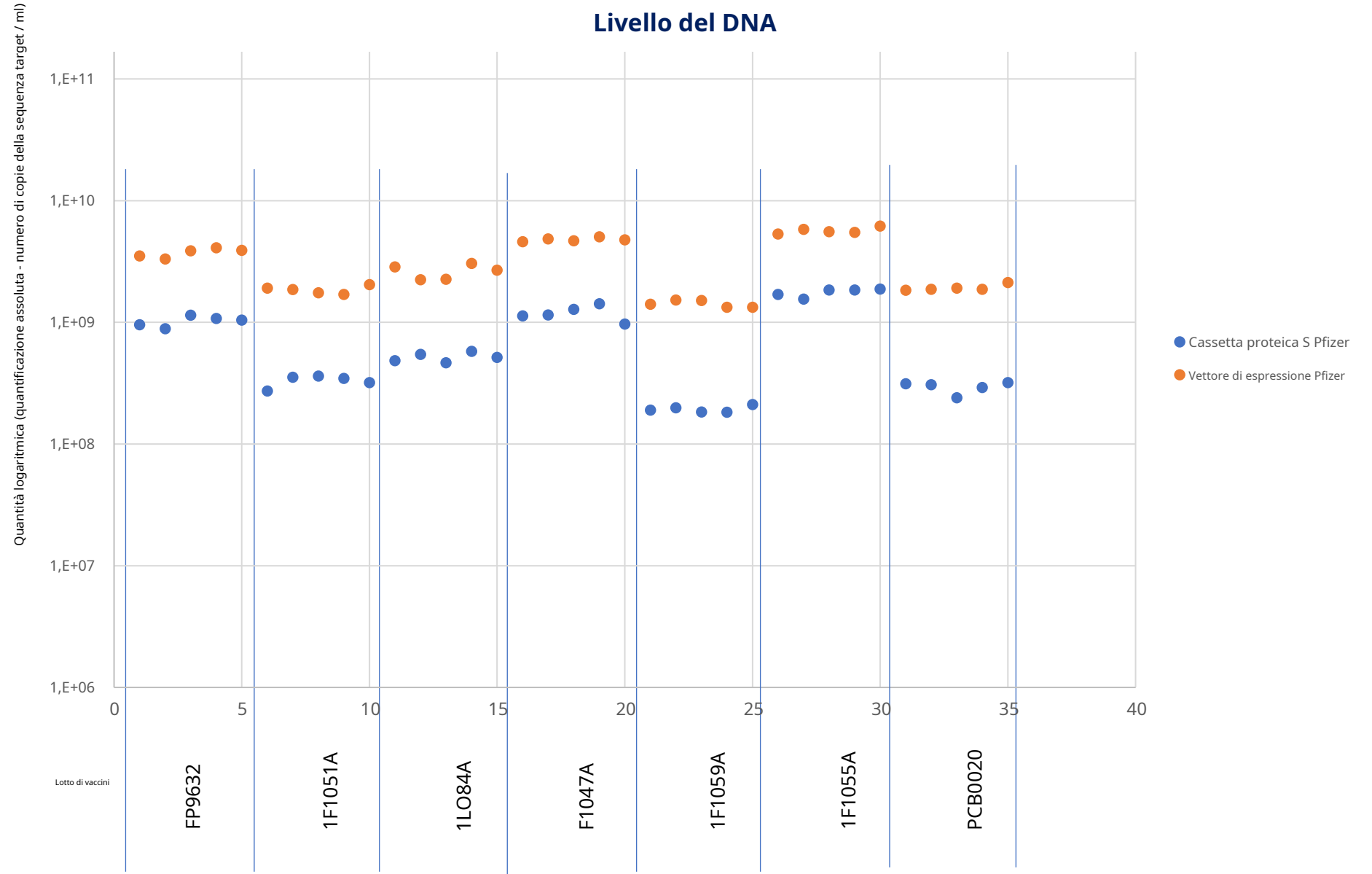


Cassetta proteica Pfizer BNT162b2 - S

Livello di mRNA (cDNA)



Pfizer BNT-162B2 - SpRt e N CUNSS TevVSEXPRESSio N Vettore



Moderna Spikevax - Cassetta proteica S - ROX

Livello del DNA

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

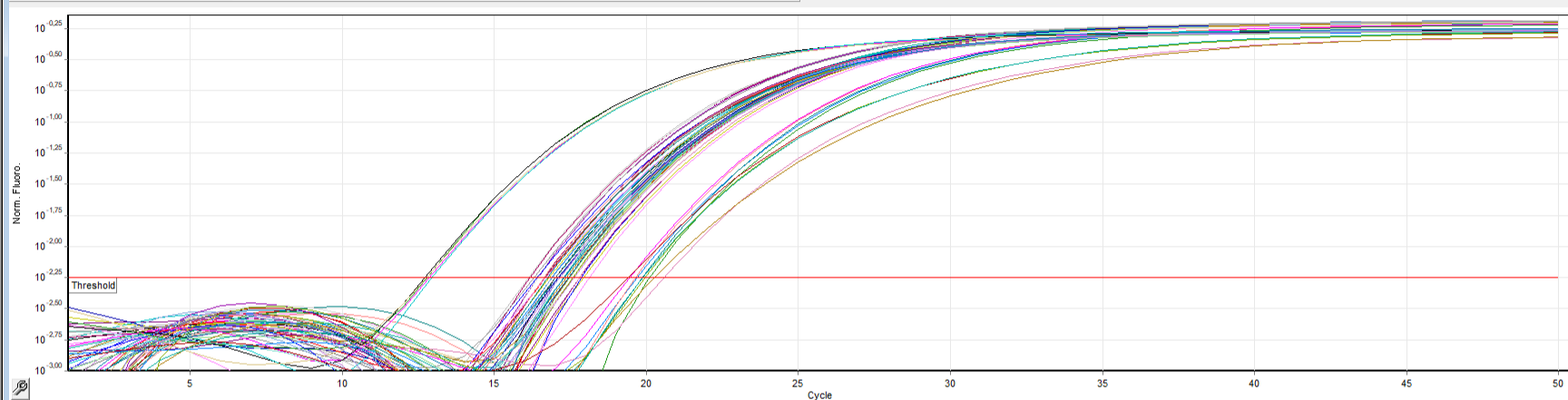
File Analysis Run Gain View Window Help

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.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

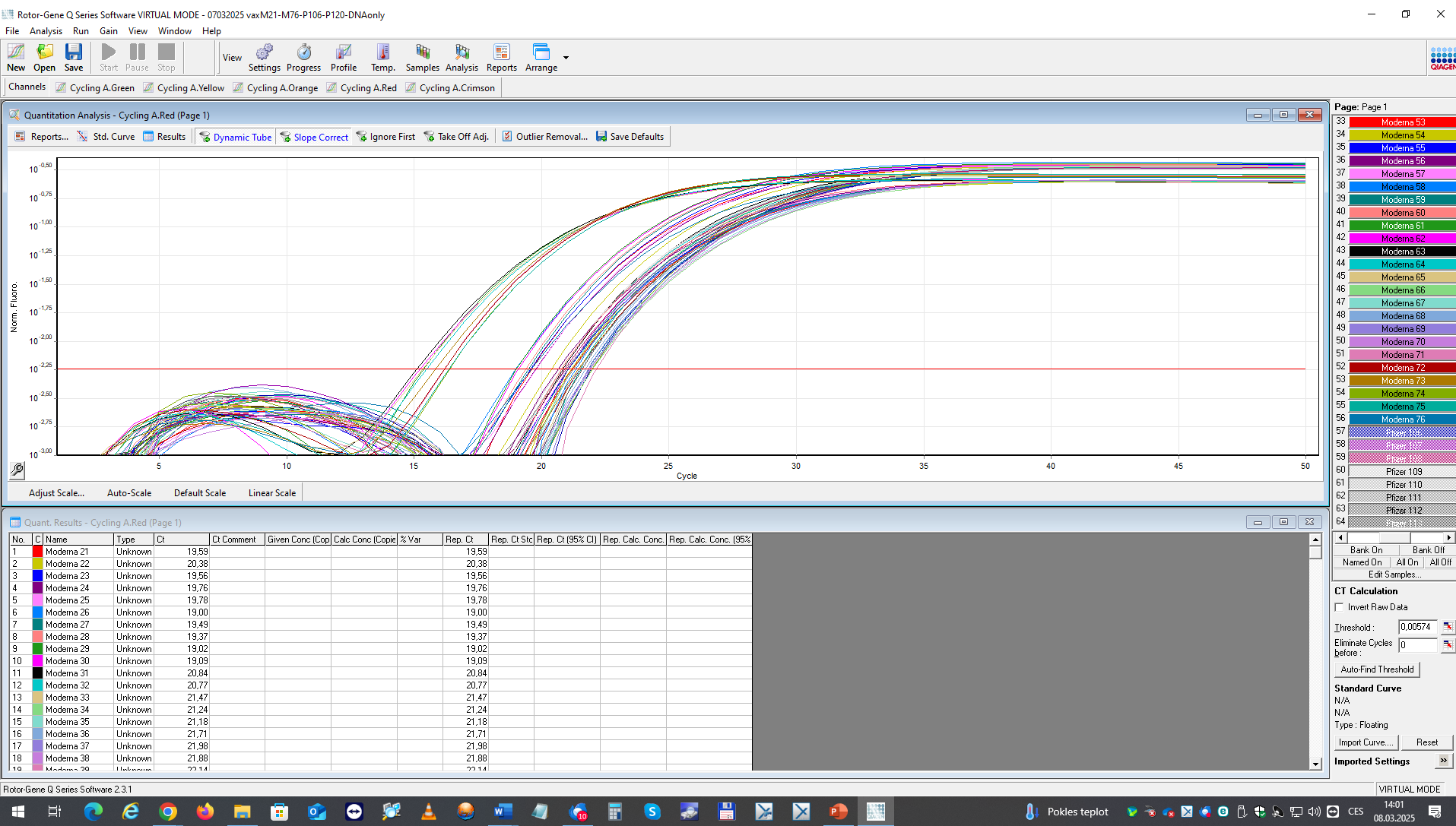
Import Curve... Reset

Imported Settings

VIRTUAL MODE

Moderna Spikevax - Vettore di espressione - Cy5

Livello del DNA



Pfizer BNT162b2 - Cassetta proteica S - FAM

Livello del DNA

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

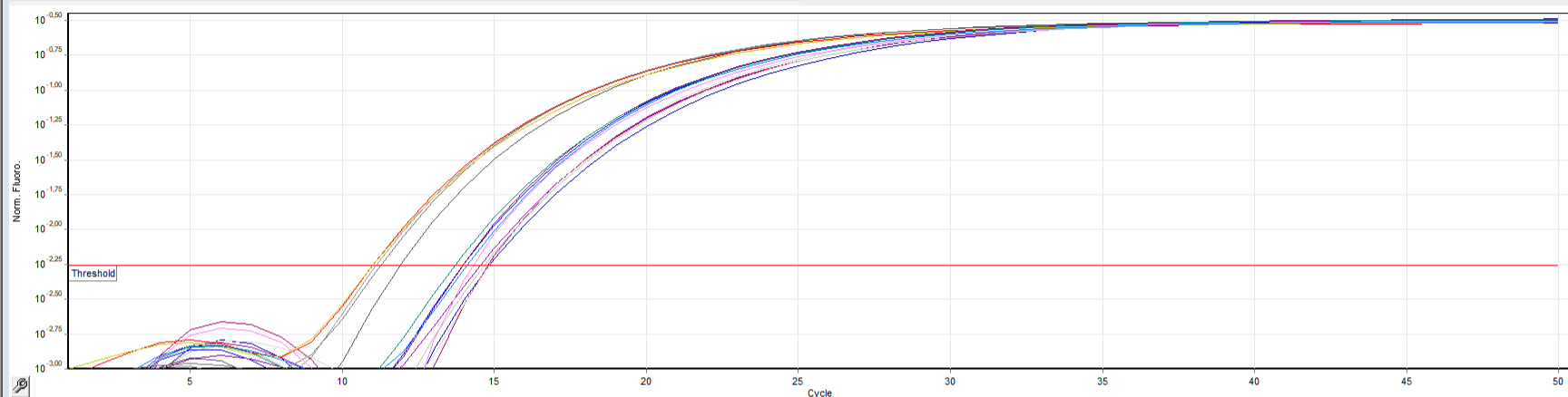
File Analysis Run Gain View Window Help

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



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

Quant. Results - Cycling A.Green (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%)
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 – Vettore di espressione – Cy5

Livello del DNA

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

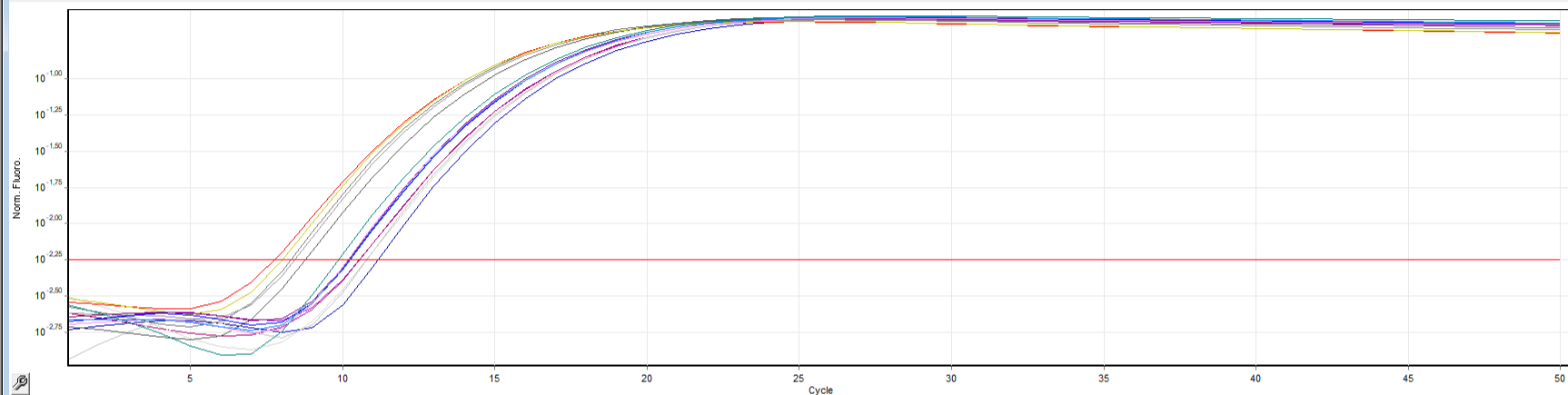
File Analysis Run Gain View Window Help

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

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 **DNA** Cassetta di espressione della proteina S / ml
- I vaccini Pfizer BNT162b2 contengono **10e8-10e9** copie di **DNA** Cassetta 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.