



SPRÁVA O KVANTITATÍVNEJ ANALÝZE ZVÝŠKOVEJ DNA A INÝCH LÁTKOK VO VYBRANÝCH ŠARŽIACH VAKCÍN PROTI OCHORENIU COVID-19

Správa bola vypracovaná na základe Uznesenia vlády SR č. 220/2025 zo dňa 23.4.2025
a poverenia Ministra zdravotníctva SR č. Z032408/2025 zo dňa 29.4.2025.

Bratislava, 30. júl 2025

OBSAH:

Stručný súhrn správy	4
1. Úvod do problematiky	6
2. Analýza prítomnosti DNA vo vybraných šaržiach mRNA vakcín Comirnaty a Spikevax	11
2.1 Zoznam analyzovaných šarží mRNA vakcín	11
2.2 Analýza DNA pomocou kvantitatívnej PCR	13
2.3 Kvantifikácia DNA a mRNA pomocou fluorometrie	32
2.4 Analýza integrity DNA a mRNA metódou kapilárnej elektroforézy	39
2.5 Analýza DNA pomocou sekvenovania novej generácie	51
3. Analýza prítomnosti iných látok pomocou Ramanovej spektroskopie	67
4. Posúdenie možného vplyvu zvyškovej DNA prítomnej v mRNA vakcínach na ľudský organizmus	79
4.1 Základné údaje o pandémie ochorenia COVID-19	79
4.2 Symptómy a následky ochorenia COVID-19	82
4.3 Význam vakcinácie v boji proti infekčným ochoreniam	84
4.4 Typy vakcín	86
4.5 Vývoj mRNA technológie	87
4.6 Vplyv vakcinácie na priebeh pandémie COVID-19	88
4.7 Vedľajšie účinky mRNA vakcín: fakty a fikcie	90
4.8 Hypotetické pôsobenie zvyškovej plazmidovej DNA na ľudský organizmus	93
5. Referencie (použitá literatúra)	97
6. Zoznam obrázkov a tabuliek	106
7. Zoznam skratiek	108

Správa je napísaná na 110 stranách, obsahuje 45 obrázkov (väčšinou zložených z viacerých častí), 5 tabuliek a 131 referencií.

STRUČNÝ SÚHRN SPRÁVY

Analýzu uvedenú v tejto správe sme uskutočnili s cieľom priniesť hodnoverné informácie o množstve, kvalite a identite zvyškovej DNA vo vybraných šaržiach mRNA vakcín a objasniť súčasný stav poznatkov a dôkazov o jej možnom pôsobení na ľudský organizmus.

Analyzovali sme 9 šarží vakcín Comirnaty výrobcu Pfizer-BioNTech (5 z nich bolo viac ako 2 roky po dátume expirácie) a 6 šarží vakcín Spikevax výrobcu Moderna (všetky boli 2 – 3 roky po dátume expirácie).

Kvantitu, kvalitu a identitu zvyškovej DNA sme určili pomocou štyroch nezávislých metód:

- kvantitatívna PCR troch oblastí templátovej DNA (celkovo 6 typov qPCR reakcií)
- fluorometria na kvantifikáciu DNA izolovanej z vakcín dvomi rôznymi spôsobmi
- kapilárna elektroforéza na detekciu fragmentov zvyškovej DNA
- sekvenovanie na určenie identity zvyškovej DNA

Všetky metódy sme realizovali precízne podľa vedecky validovaných protokolov a štandardných postupov s adekvátnymi kalibráciami, kontrolami a replikátmi, pričom sme dbali na minimalizáciu nešpecifického vplyvu hlavných zložiek vakcíny a na správne vyhodnotenie a objektívnu interpretáciu získaných dát.

Ani jeden z uvedených prístupov neodhalil nadlimitné množstvo zvyškovej DNA v žiadnej analyzovanej šarži mRNA vakcín, pričom výsledky všetkých uskutočnených metód boli vzájomne konzistentné.

Výsledky tiež ukázali, že zvyšková DNA je degradovaná na malé fragmenty s priemernou dĺžkou ~150 báзовých párov. Tieto fragmenty nekódujú žiadny funkčný proteín a pochádzajú z DNA, ktorá bola použitá ako templát na syntézu mRNA.

Okrem toho sme vo vakcínach analyzovali kvantitu a integritu (celistvosť) mRNA pomocou dvoch metód:

- fluorometria na kvantifikáciu mRNA
- kapilárna elektroforéza na detekciu celistvosti mRNA

Všetky šarže obsahovali výrobcom deklarované množstvo mRNA. Šarže v rámci doby použiteľnosti nemali narušenú celistvosť mRNA. Šarže, ktoré boli dlhodobo po dátume expirácie mali zníženú celistvosť mRNA (1 šarža Comirnaty a 6 šarží Spikevax).

Pomocou Ramanovej spektroskopie sme identifikovali zložky vakcín, ktoré zodpovedajú výrobcami deklarovanému zloženiu a nezistili sme prítomnosť neznámych látok, ktoré by výrobca v registračnej dokumentácii neuvádzal.

Výsledky Ramanovej spektroskopie ukázali, že vakcíny neobsahujú grafén ani jeho zlúčeniny.

Na základe všetkých výsledkov našej analýzy a po dôkladnom vecnom posúdení verejne dostupných prác, ktoré obsahujú tvrdenia o vysokých množstvách zvyškovej DNA môžeme skonštatovať, že tieto tvrdenia sa zakladajú na technicky nesprávne uskutočnených metódach a/alebo nesprávne interpretovaných výsledkoch a nezodpovedajú skutočnosti. V kombinácii s nevedeckými a vykonštruovanými vyjadreniami o hrozbách vakcín predstavujú nebezpečný zdroj manipulácie so strachom verejnosti, ktorý môže mať vážne následky pre verejné zdravie.

V rámci poverenia sme tiež venovali pozornosť otázkam možného vplyvu zvyškovej DNA na ľudský organizmus.

Túto tému sme spracovali komplexne, na podklade riadne recenzovaných vedeckých publikácií v renomovaných vedeckých časopisoch s vysokou reputáciou alebo vychádzajú z verejne dostupných robustných štatistík. Konfrontovali sme s nimi tvrdenia v prácach a vyjadreniach zverejnených neštandardným spôsobom bez riadnej recenzie, ktoré sa zakladajú na neoverených informáciách a využívajú zastrašujúce naratívy o mRNA vakcínach bez dôkazov o príčinných súvislostiach, pričom úplne ignorujú výrazne vyššie riziká závažných dôsledkov ochorenia COVID-19 spôsobeného infekciou vírusom SARS-CoV-2.

Súčasný stav poznania možno v krátkosti zhrnúť nasledovne:

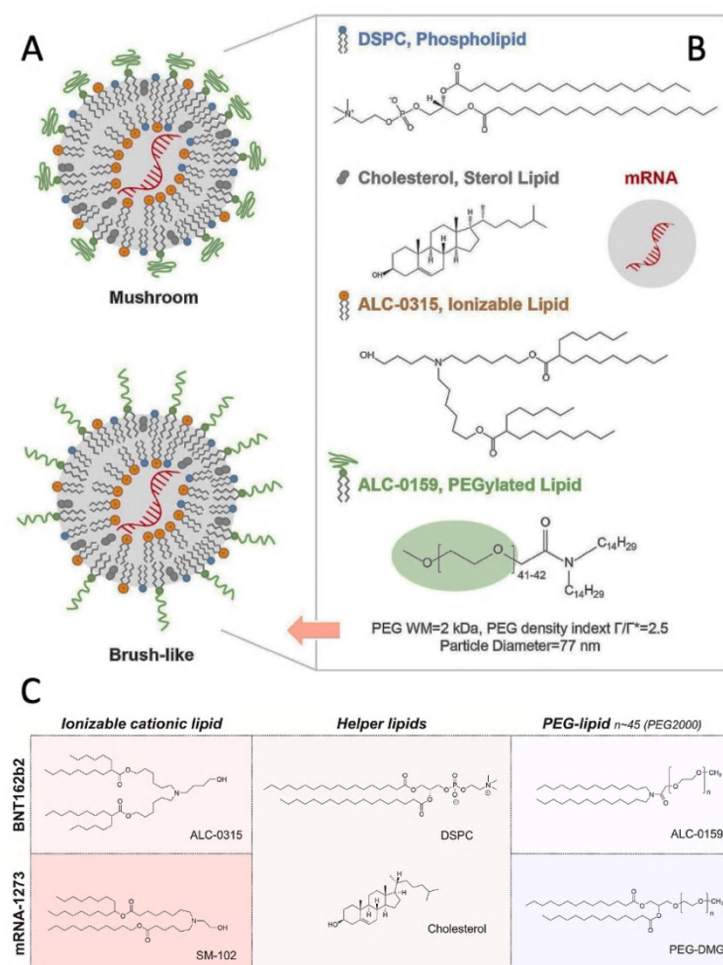
- Očkovanie je najúčinnnejší a historicky mnohonásobne overený spôsob obrany proti závažným infekčným ochoreniam.
- Vývoj, výroba a praktické použitie mRNA-LNP vakcín má za sebou viac než pol storočia trvajúci intenzívny výskum, kompletne klinické skúšanie a je predmetom dlhodobého monitorovania účinnosti, bezpečnosti a kvality.
- Štatistiky vychádzajúce z globálnych dát ako aj z dát slovenských zdravotníckych inštitúcií ukazujú, že **pravdepodobnosť vážnych následkov po prekonaní ochorenia COVID-19 je mnohonásobne vyššia než po očkovaní.**
- **Benefity vakcinácie sú veľmi komplexné, týkajú sa aj ekonomických a sociálnych prínosov** pre spoločnosť a jednotlivcov, nielen prevencie ochorenia COVID-19 a súvisiaceho zníženia hospitalizácií a úmrtnosti.
- Kľúčovým mechanizmom závažného priebehu ochorenia COVID-19 je systémový zápal ako sekundárny dôsledok infekcie vírusom SARS-CoV-2, ktorý môže spôsobovať nielen ťažkú akútnu, ale aj dlhodobú chorobu (tzv. long. COVID).
- Šírenie obáv z možného vplyvu zvyškovej DNA prítomnej v mRNA vakcínach na ľudský organizmus, najmä v súvislosti s integráciou do genómu a indukciou zápalových reakcií, vychádza z nepochopenia alebo dezinterpretácie veľmi zložitých molekulárnych, bunkových a patofyziologických mechanizmov v ľudskom organizme a narába s teoretickými scenármi, pre ktoré neexistujú relevantné vedecké ani medicínske dôkazy.
- Údaje z dlhodobého post-marketingového monitoringu mRNA vakcín potvrdzujú, že **výskyt zápalových a autoimunitných ochorení po očkovaní nie je vyšší, než je tomu v bežnej populácii a zároveň je výrazne nižší ako pri ochorení COVID-19.**
- **O integrácii zvyškovej DNA z mRNA vakcín do ľudského genómu neexistuje žiadny hodnoverný vedecký ani medicínsky dôkaz.** Takýto dôkaz neexistuje dokonca ani pre vakcíny na báze DNA, ktoré sa na prevenciu rôznych infekčných ochorení používajú oveľa dlhšiu dobu než mRNA vakcíny.
- 80 – 90 % ľudskej populácie je dlhodobo (väčšinou bezpríznakovo) infikovaných rôznymi DNA vírusmi (napr. adenovírusy, herpesvírusy, papilómavírusy, parvovírusy). Niektoré DNA vírusy majú molekulárnu výbavu na to, aby sa do nášho genómu mohli integrovať, **no napriek tomu neexistujú žiadne dôkazy o tom, že by z nás vírusová DNA robila geneticky modifikované organizmy.**
- **Na základe súčasných vedeckých dôkazov a regulačných hodnotení je riziko genomickej integrácie zvyškovej DNA z mRNA vakcín extrémne nízke a s minimálnym biologickým významom.** Žiadny biologický produkt (ani iný liek, výživový doplnok či potrava) nemá záruku nulového rizika vedľajších účinkov, ale teoretická pravdepodobnosť genomickej integrácie zvyškovej DNA z mRNA vakcín je zanedbateľná.

Monitorovanie následkov podania viac než 13,5 miliárd dávok vakcín objektívne demonštruje, že mRNA vakcíny proti COVID-19 majú dobre charakterizovaný bezpečnostný profil s prevažne miernymi, prechodnými nežiaducimi účinkami a veľmi zriedkavými závažnými nežiaducimi udalosťami, ktoré sú predmetom dôkladného posudzovania a neustáleho prehodnocovania.

1. ÚVOD

Vakcíny na báze mRNA priniesli zásadný obrat vo vývoji pandémie ochorenia COVID-19 a významným spôsobom prispeli k zníženiu úmrtnosti a hospitalizácií spôsobených infekciou koronavírusom SARS-CoV-2. Do augusta 2024 bolo celosvetovo podaných 13,53 miliardy dávok vakcín proti COVID-19, pričom 70,6 % globálnej populácie dostalo aspoň jednu dávku. Schválené mRNA vakcíny Comirnaty (výrobca BioNTech-Pfizer) a Spikevax (výrobca Moderna), predstavujú približne 90 % vakcín proti ochoreniu COVID-19 podaných v Európskej únii (EÚ), viac ako 97 % v Spojených štátoch amerických (USA) a Kanade, a takmer 100 % v Japonsku. Tieto vakcíny preukázali vysokú účinnosť a bezpečnosť a poskytujú ochranu proti dlhodobému COVIDu, multisystémovému stavu, ktorý často zahŕňa závažné príznaky, nasledujúce po ťažkej akútnej infekcii SARS-CoV-2. Podľa evidovaných dát sa predpokladá, že mRNA vakcíny len v Európe zachránili minimálne jeden milión životov (Vieths et al, *Vaccine*, 2025, *Our World of Data*, 2025, *Worldometer*, 2025).

Hlavnou zložkou týchto vakcín je syntetická mRNA, ktorá kóduje S proteín (SPIKE) koronavírusu SARS-CoV-2. mRNA obsahuje jednak modifikované nukleozidy (pseudouridíny) na zníženie imunogénnosti RNA, na zvýšenie jej stability a účinnosti syntézy S proteínu, jednak substitúcie dvoch aminokyslín za prolíny na stabilizáciu otvorenej štruktúry S proteínu (Karikó et al, *Immunity*, 2005, Wrapp et al, *Science*, 2020). mRNA je obalená v lipidových nanočasticiach (LNP) obsahujúcich štyri typy lipidov, ktorých zloženie vo vakcínach Comirnaty a Spikevax je mierne odlišné (Schoenmaker et al, *Int J Pharm.* 2021). mRNA vakcína sa podáva injekčne do svalu, pričom LNP umožňujú doručiť mRNA do svalových buniek, kde sa z nej syntetizujú molekuly S proteínu, ktoré následne vyvolajú imunitnú odpoveď. Výsledkom je aktivácia vrodenej aj adaptívnej (protilátkovej a bunkovej) imunity, ktorá príjemcu ochráni pred závažnými prejavmi ochorenia COVID-19.



Obr. 1.1

Modely povrchovej štruktúry a zloženia lipidových nanočastíc mRNA vakcín.

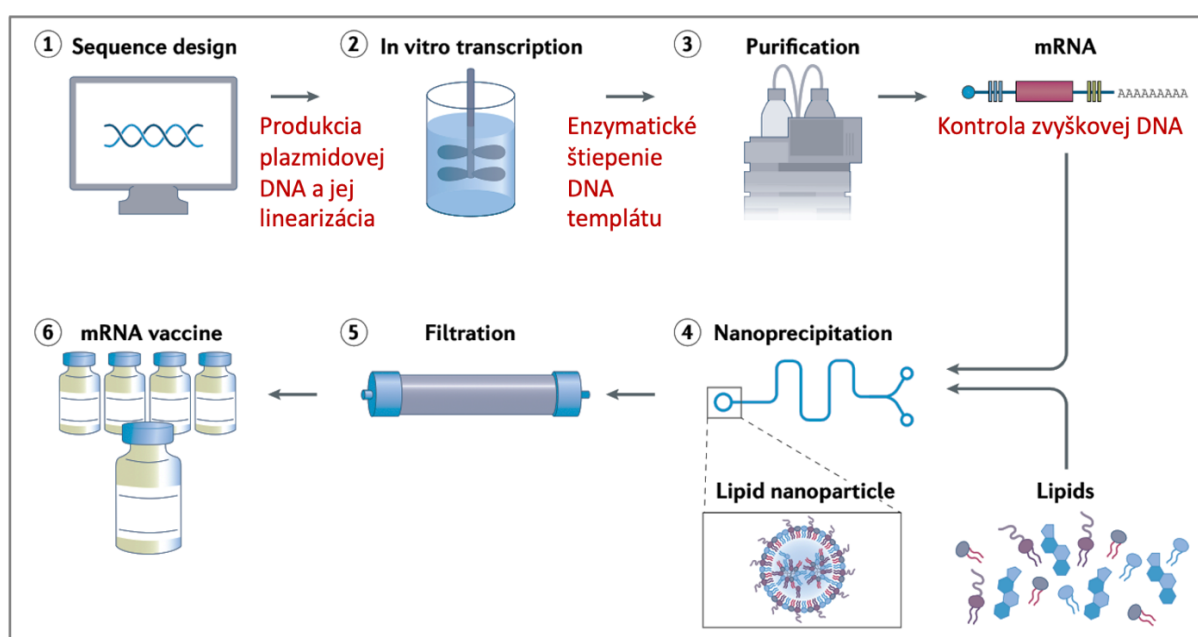
(A) Dve základné konformácie povrchového PEGu vakcíny Comirnaty:: hríbovitá a kefovitá.

(B) Zloženie lipidových nanočastíc vakcíny Comirnaty.

(C) Zloženie lipidových nanočastíc (LNP) vo vakcínach Comirnaty (BNT162b2) a Spikevax (mRNA-1273).

Schémy sú prevzaté z Wang et al, *Sci Rep*, 2023 (A,B) a Schoenmaker et al, *Int J Pharm*, 2021.

Výroba mRNA vakcín začína produkciou plazmidovej DNA, ktorá obsahuje genetickú informáciu pre SPIKE proteín vírusu SARS-CoV-2. Z nej sa procesom tzv. *in vitro* transkripcie syntetizuje mRNA. Následne sa plazmidová DNA enzymaticky štiepi na malé fragmenty a mRNA transkripty sa čistia pomocou vysokoúčinnnej chromatografie, aby sa DNA fragmenty, enzýmy, ostatné chemikálie a možné nečistoty odstránili. V tomto kroku sa uskutoční dôkladná kontrola čistoty mRNA, v rámci ktorej sa okrem iného overuje, či kvantita zvyškovej DNA vyhovuje limitu stanovenému regulačnými autoritami. Vyčistená mRNA sa zmieša s lipidmi v mikrofluidickom mixéri za vzniku lipidových nanočastíc. Rýchle miešanie spôsobí, že lipidy okamžite obalia mRNA a vyzrážajú sa ako samoorganizované nanočastice. Roztok nanočastíc sa filtruje na odstránenie rozpúšťadiel a neobalenej mRNA. Finálny čistý produkt mRNA vakcíny sa po ďalšej kontrole kvality dávkuje do sterilizovaných ampuliek, balí, skladuje a distribuuje za dodržania prísnych podmienok chladového reťazca určených výrobcom (Chaudhary et al, Nat Rev Drug Discov, 2021, Wang et al, Sci Rep, 2023, Schoenmaker et al, Int J Pharm, 2021, Crommelin et al, J Pharm Sci, 2021). Schéma výroby mRNA vakcín je uvedená na Obr. 1.2.



Obr. 1.2

Schematické znázornenie procesu výroby mRNA vakcín.

(1) *In silico* optimalizovaná sekvencia pre cieľový antigén sa metódami genetického inžinierstva vloží do plazmidovej DNA, ktorá sa namnoží v baktériách, purifikuje a linearizuje. (2) Linearizovaná plazmidová DNA sa prepíše do mRNA *in vitro*, (3) DNA sa enzymaticky degraduje DNázami a mRNA transkripty sa vyčistia pomocou vysokoúčinnnej chromatografie na odstránenie plazmidovej DNA. V tomto kroku sa overuje čistota mRNA a prítomnosť zvyškovej plazmidovej DNA. (4) Vyčistená mRNA sa zmieša s lipidmi v mikrofluidickom mixéri, čím sa vytvoria lipidové nanočastice. (5) Roztok nanočastíc sa dialyzuje alebo filtruje na odstránenie bezvodých rozpúšťadiel a neobalenej mRNA a ostatných zvyškových zložiek. (6) Prefiltrovaný roztok mRNA vakcíny sa skladuje v sterilizovaných ampulkách (prevzaté z Chaudhary et al, Nat Rev Drug Discov, 2021).

Vzhľadom na to, že kvalita a čistota účinnej látky, t.j. mRNA, sa kontroluje počas výroby, a že konečná formulácia vakcíny je komplexná, regulačné authority neodporúčajú kvantifikáciu zvyškovej DNA v konečnom produkte kvôli interferencii meraní so základnými zložkami vakcíny (vysokého nadbytku mRNA a lipidov). Výslovne tiež neodporúčajú kvantifikáciu zvyškovej DNA vo vakcínach po dátume expirácie ako aj v prípadoch nesprávneho skladovania a manipulácie s vakcínami (Paul Ehrlich Institute, 2023, European Medicines Agency 2025, The Therapeutic Goods Administration, Australia, 2025).

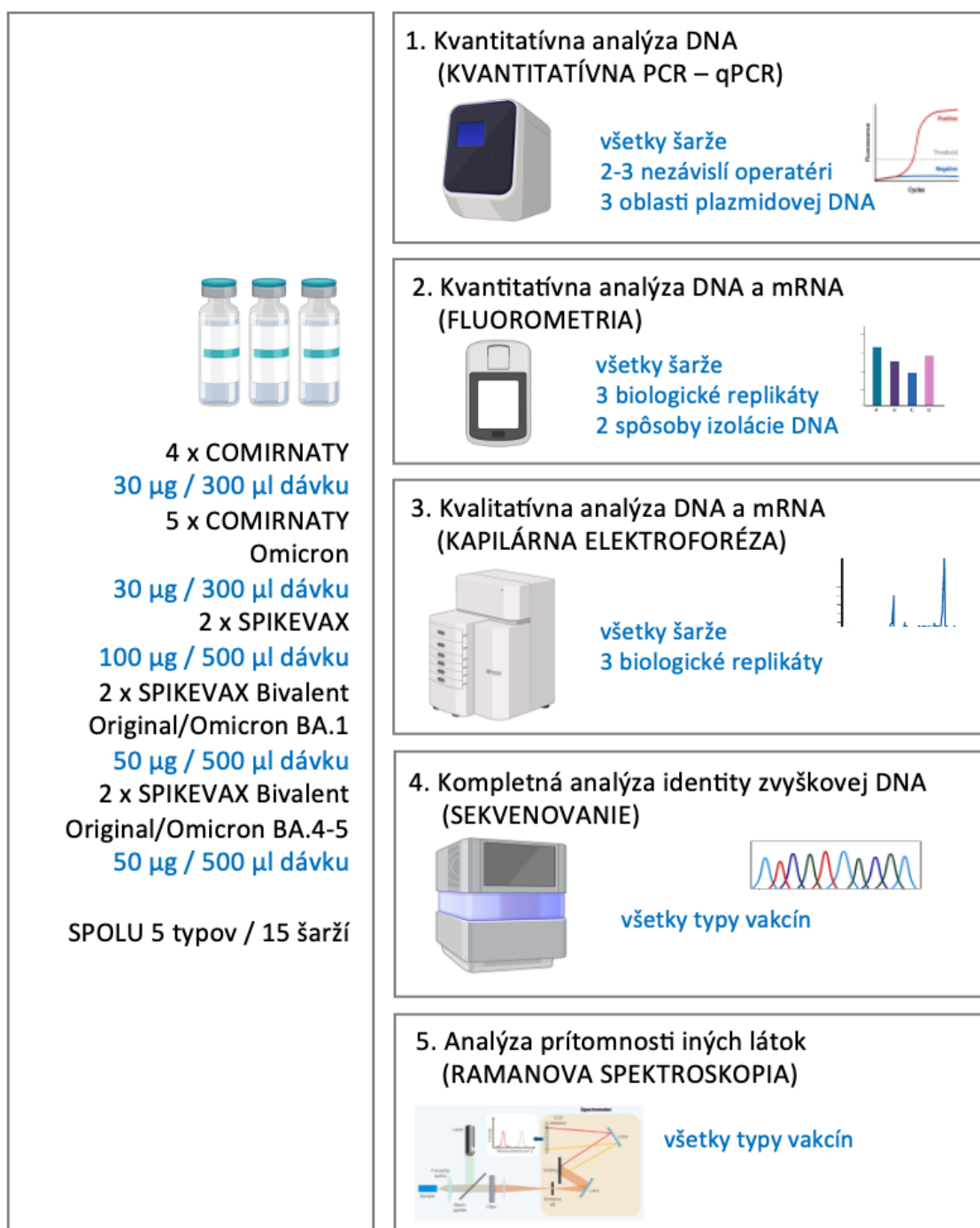
Napriek týmto odporúčaniam sú vo verejnom priestore dostupné správy o analýze zvyškovej DNA vo finálnych produktoch vakcín. Výsledky analýz zverejnených vo forme recenzovaných vedeckých publikácií v renomovaných vedeckých časopisoch a vo vyjadreniach regulačných a kontrolných autorít potvrdili, že množstvo zvyškovej DNA neprekračuje stanovený limit 10 ng na 1 dávku vakcíny (*Kaiser et al, Vaccine, 2025, Leban et al, Anal Bioanal Chem, 2021, Vieth et al, Vaccine, 2025*). Na druhej strane sú publikácie výsledkov technicky nevalidovaných a nedôsledne realizovaných analýz, ktoré sú zverejnené neštandardným spôsobom a deklarujú vysoké množstvá DNA (*Kämmerer et al, Science, Public Health Policy, and the Law, 2024, König and Kirchner, Methods Protoc., 2024, Speicher et al, Preprint, 2023, McKernan et al, Preprint, 2023, Fleming et al, HSOA Journal of Angiology & Vascular Surgery, 2025*). Tieto správy, ktoré nie sú podložené spoľahlivými dátami a narábajú s dohadmi a fikciami, sa šíria prostredníctvom sociálnych médií a neodborných vyjadrení verejne činných osôb, čím sa im dostáva neprimeranej pozornosti, neopodstatnene vzbudzujú obavy laickej verejnosti a narúšajú jej dôveru vo vedecké a medicínske dôkazy. To vedie k nárastu pochybností o význame očkovania a v konečnom dôsledku k ohrozeniu verejného zdravia.

Analýzu vybraných šarží mRNA vakcín, ktorá je opísaná v tejto správe, sme uskutočnili na základe uznesenia Vlády SR a poverenia Ministra zdravotníctva SR s plným vedomím toho, že ide o finálne produkty, väčšinou po dátume expirácie.

Naším cieľom bolo priniesť spoľahlivé dôkazy o zložení mRNA vakcín, ktoré by vláde aj verejnosti poskytli dôveryhodné podklady pre zodpovedný osobný aj spoločenský postoj k tejto téme.

Použili sme pritom komplexný prístup, s využitím viacerých nezávislých metód realizovaných technicky správne, s dôslednou aplikáciou kontrol, biologických a technických replikátov, na kalibrovaných zariadeniach, s adekvátnymi reagenciami a s rešpektovaním overených vedeckých poznatkov o molekulárnych charakteristikách zložiek vakcín, s dôrazom na minimalizáciu ich vzájomnej interferencie. Jednotlivé metódy použité v analýze sú znázornené na Obr. 1.3 nižšie a detailne opísané aj s výsledkami v kapitolách 2 a 3. Kapitola 4 je venovaná posúdeniu možného vplyvu mRNA vakcín na ľudský organizmus v širšom kontexte súčasných vedeckých poznatkov podporených medicínskymi dôkazmi.

Ani jedna z použitých metód neodhalila nadlimitné množstvo zvyškovej DNA v žiadnej analyzovanej šarži mRNA vakcín a nepreukázala prítomnosť inej látky, ktorá by nebola deklarovaná v špecifikácii mRNA vakcín.



Obr. 1.3

Schematické znázornenie metód použitých na analýzu zvyškovej DNA a iných látok v mRNA vakcínach.

2. ANALÝZA PRÍTOMNOSTI DNA VO VYBRANÝCH ŠARŽIACH mRNA VAKCÍN COMIRNATY A SPIKEVAX

2.1 ZOZNAM ANALYZOVANÝCH ŠARŽÍ mRNA VAKCÍN

Analýzovali sme 9 šarží vakcín Comirnaty výrobcu Pfizer-BioNTech, z ktorých 5 šarží Comirnaty Omicron bolo 2 roky po predĺženom dátume expirácie a podmienky ich skladovania v IMUNA PHARM, a.s., nie sú doložené dokumentáciou. Ďalšie 4 šarže Comirnaty Omicron boli pred dátumom expirácie a podmienky skladovania v UNIPHARMA boli v súlade s odporúčaním výrobcu.

Ďalej sme analyzovali 6 šarží vakcín Spikevax výrobcu Moderna, pričom všetky boli 2 – 3 roky po dátume expirácie a podmienky ich skladovania v IMUNA PHARM, a.s., nie sú doložené dokumentáciou.

Všetky šarže vakcín boli transportované v spolupráci so ŠÚKL a MZ SR z miesta skladovania na miesta analýzy pri dodržaní podmienok definovaných výrobcami.

Zoznam analyzovaných šarží vakcín so základnými údajmi o dátume expirácie, objeme a deklarovanom množstve mRNA je uvedený v Tab.1.

Tab. 1

Zoznam analyzovaných šarží vakcín

Šarža	Názov	Dátum expirácie	Celkový objem v ampule	Objem dávky	Množstvo mRNA v dávke
FP9632	Comirnaty, Original	31.7.2022 30.4.2023	0,45 ml + 1,8ml 0,9 % NaCl*	300 µl	30 µg
1F1051A	Comirnaty, Original	31.7.2022 30.4.2023	0,45 ml + 1,8ml 0,9 % NaCl*	300 µl	30 µg
1L084A	Comirnaty, Original	31.8.2022 31.5.2023	0,45 ml + 1,8ml 0,9 % NaCl*	300 µl	30 µg
1F1059A	Comirnaty, Original	31.8.2022 31.5.2023	0,45 ml + 1,8ml 0,9 % NaCl*	300 µl	30 µg
PCB0020	Comirnaty, Original	31.8.2022 31.5.2023	0,45 ml + 1,8ml 0,9 % NaCl*	300 µl	30 µg
LK8456	Comirnaty, Omicron JN.1	12.2025	2,25 ml	300 µl	30 µg
LK8842	Comirnaty, Omicron JN.1	11.2025	2,25 ml	300 µl	30 µg
LM9076	Comirnaty, Omicron JN.1	12.2025	2,25 ml	300 µl	30 µg
LN0605	Comirnaty, Omicron KP.2	12.2025	2,25 ml	300 µl	30 µg
000058A	Spikevax, Original	2.7.2022	5 ml	500 µl	100 µg
3005697	Spikevax, Original	17.2.2022	5 ml	500 µl	100 µg
200023A	Spikevax bivalent, Original/ Omicron BA.1	6.5.2023	2,5 ml	500 µl	50 µg
200106A	Spikevax bivalent, Original/ Omicron BA.1	25.5.2023	2,5 ml	500 µl	50 µg
MV1018A	Spikevax bivalent, Original/ Omicron BA.4/BA.5	2.7.2023	2,5 ml	500 µl	50 µg
400012A	Spikevax bivalent, Original/ Omicron BA.4/BA.5	17.7.2023	2,5 ml	500 µl	50 µg

*vakcínu Comirnaty Original je potrebné pred aplikáciou nariediť fyziologickým roztokom 0,9 % NaCl

Ako súčasť analýzy sme vakcíny podrobili skúške na sterilitu a prítomnosť bakteriálnych endotoxínov. Tieto skúšky boli vykonané v Biotechnologických a analytických laboratóriách BMC SAV, v. v. i., štandardnými postupmi zavedenými podľa požiadaviek Európskeho liekopisu za podmienok Správnej výrobnnej praxe pre kontrolné laboratóriá.

Biotechnologické a analytické laboratóriá BMC SAV, v. v. i., sú držiteľom osvedčenia o správnej výrobnnej praxi, ktoré bolo vydané dňa 5. 5. 2023 Štátnym ústavom pre kontrolu liečiv, po inšpekcii podľa článku 111(5) Smernice 2001/83/ES, a majú povolenie na kontrolu kvality – skúšanie liekov mikrobiologickými, fyzikálnymi/chemickými a biologickými skúškami.

Skúšky sterility farmaceutických produktov sú nevyhnutnými analýzami zabezpečujúcimi, že tieto produkty sú bez životaschopných mikroorganizmov a sú bezpečné pre pacientov. Tieto skúšky patria medzi kľúčové požiadavky regulačných autorít pre kontroly kvality vo farmaceutickej produkcii. V našich analýzach sme použili metódu podľa štandardného postupu BTC-M14-ŠPP „Vykonanie skúšky na sterilitu priamym očkovaním“ (Ph.Eur., čl.2.6.1. Sterility) s vyhodnotením po 14 dňoch inkubácie.

Test na bakteriálne endotoxíny (známy aj ako Limulus Amebocyte Lysate - LAL test) je kritickou analytickou skúškou na detekciu a kvantifikáciu bakteriálnych endotoxínov s hlavným cieľom zabezpečiť bezpečnosť liekov podávaných injekčne. V našich analýzach bola použitá metóda podľa štandardného postupu BTC-B14-ŠPP „Stanovenie obsahu bakteriálnych endotoxínov - gélová limitná metóda“ (Ph.Eur., čl. 2.6.14. Bacterial endotoxins).

Všetky vakcíny Comirnaty a Spikevax analyzované podľa štandardných postupov spĺňajú požiadavky Európskeho liekopisu pre sterilitu a podlimitný obsah bakteriálnych endotoxínov.

2.2 ANALÝZA DNA POMOCOU KVANTITATÍVNEJ PCR

Metóda kvantitatívnej PCR (qPCR) sa považuje za „zlatý štandard“ na detekciu špecifických sekvencií DNA vo vzorkách. Silnou stránkou qPCR je popri vysokej špecificite aj jej vysoká citlivosť (typicky menej ako 1 pg/ml vzorky). Najmä tieto vlastnosti ju predurčujú, že je široko akceptovaná regulačnými úradmi (EMA, FDA), ako najvhodnejšia metóda na stanovenie zvyškovej DNA vo vakcínach a iných biologických produktoch (*European Medicines Agency 2025: Guideline on the quality aspects of mRNA vaccines*).

PRINCÍP METÓDY:

qPCR metóda je založená na amplifikácii (zmnožení) cieľových sekvencií DNA pomocou špecifických primerov, sond (prób) a fluorescenčných markerov na určenie počiatkovej koncentrácie DNA templátu. Táto metóda je vysoko citlivá a je široko používaná v klinických a výskumných prostrediach na kvantifikáciu DNA, pričom vyžaduje starostlivý návrh primerov a prób, aby PCR reakcia bola efektívna a aby sa zabránilo nešpecifickej amplifikácii. Kvantifikácia DNA môže byť ovplyvnená účinnosťou PCR reakcie, pretože chyby v dizajne primerov a podmienok cyklovania, nepresná kalibrácia, rôzne štartovacie množstvá DNA templátu a iné nedostatky uvedené nižšie môžu viesť k významným nezrovnalostiam vo výsledných koncentráciách (*Bustin et al., Clin Chem., 2023, BIO-RAD: qPCR Assay Design and Optimization, BIO-RAD: The Ultimate qPCR Design Guide, Life Technologies: Real-time PCR handbook*).

qPCR sa môže realizovať vo forme samostatných (simplexných) reakcií zacielených vždy na 1 konkrétny úsek DNA, alebo v multiplexnej forme zacielenej súčasne na viacero úsekov DNA v rámci spoločnej PCR reakcie. Multiplexná qPCR je však veľmi závislá na dodržaní ďalších faktorov (okrem tých, ktoré sú spomenuté vyššie) a optimalizácii podmienok (napr. nastavenie účinnosti amplifikácie jednotlivých terčových úsekov pomocou simplexnej qPCR), ktorých nedodržanie výrazne deformuje výsledné hodnoty. Situácia je ešte zložitejšia, ak multiplexnej qPCR predchádza reverzná transkripcia mRNA na cDNA, pretože účinnosť tohto kroku kriticky vplýva na konečný výsledok. Preto sa multiplexná qPCR neodporúča ako metóda vhodná na precíznu kvantifikáciu DNA vo vzorkách vakcín.

Autori Fleming, Kotlár a Peková, ktorí na základe výsledkov multiplexnej qPCR deklarovali vysoko nadlimitné hodnoty zvyškovej DNA v mRNA vakcínach, väčšinu týchto základných požiadaviek nedodržali. Pri porovnávaní množstva zvyškovej DNA s množstvom mRNA pomocou multiplexnej qPCR, ktorej predchádzala reverzná transkripcia, sa dopustili kritických metodických chýb (*Fleming et al, HSOA Journal of Angiology & Vascular Surgery, 2025*):

- už v prvom kroku DNA/RNA izolovali z nerovnakého množstva vstupného materiálu (použitý bol síce rovnaký objem 500 µl, ale s odlišnou koncentráciou mRNA, v rôznych typoch vakcín – 50 µg pre Comirnaty a bivalentné vakíny Spikevax a 100 µg pre Spikevax Original),
- neoverili integritu východiskovej mRNA,
- nekvantifikovali výťažok izolácie DNA/RNA z každej analyzovanej šarže,
- následne neznámu kvantitu izolovanej RNA použili na reverznú transkripciu (pri prepočte teoretickej účinnosti izolácie cca 80 % bolo množstvo RNA použitej na reverznú transkripciu veľmi pravdepodobne mimo výrobcom odporúčaného rozmedzia pre Verso reverznú transkriptázu používanú v kite),
- neoverili účinnosť reverznej transkripcie a neznáme kvantitu výslednej cDNA následne použili na multiplexnú qPCR (neexistuje multiplexná PCR, ktorá by spoľahlivo zvládla 1000-násobný kvantitatívny rozdiel medzi jednotlivými cieľmi),
- účinnosť amplifikácie jednotlivých cieľových oblastí neoverili v simplexných qPCR testoch (účinnosť bola zjavne suboptimálna),
- primery navrhli tak, že amplifikácia generovala produkty výrazne odlišnej dĺžky (105 versus 233 básových párov), čo mohlo mať vplyv na efektivitu súbežnej (multiplexnej) amplifikácie,
- chýbalo viacero kontrol, ktoré sú pri qPCR bežné, ako napríklad beztemplátová kontrola (non-template control), ktorá by odhalila potenciálnu DNA kontamináciu v qPCR reagenciách,

- v prípade qPCR kvantifikácie použili primery zo SPIKE mRNA oblasti, ktorými nie je možné odlíšiť medzi cDNA pochádzajúcou z reverznej transkripcie a templátovou DNA,
- použili nevhodný spôsob kalibrácie qPCR,
- výsledné počty molekúl neprepočítali na kvantitu DNA, tak ako to uvádzajú EMA a FDA pri stanovení limitov zvyškovej DNA v mRNA vakcínach (výsledok by ukázal, že limit zvyškovej DNA nebol prekročený).

Na základe nesprávne zvolenej a technicky nezvládnutej metodiky títo autori prezentovali chybné a nebezpečné závery a vyvolali okolo svojich výsledkov obrovský rozruch, ktorý nemá racionálny základ.

V našej analýze sme kvantifikáciu zvyškovej DNA uskutočnili metódou qPCR priamo zo vzorky vakcíny. Prepis (reverznú transkripciu) mRNA na cDNA za účelom stanovenia množstva mRNA vo vakcíne sme nahradili vhodnejšími metódami nezávislými od reverznej transkripcie. Kvantitu mRNA sme určili fluorometrickou metódou a integritu mRNA sme určili priamo pomocou kapilárnej elektroforézy (viď časti 2.3 a 2.4). Navyše, identitu plazmidovej DNA, z ktorej sa syntetizuje mRNA, a ktorá kóduje SPIKE proteín, sme určili na základe výsledkov masívne paralelného sekvenovania DNA novej generácie vo vakcínach (časť 2.5).

Každú cieľovú sekvenciu sme amplifikovali v simplexnej qPCR reakcii s použitím molekulárnych štandardov dĺžky zodpovedajúcej dĺžke daného amplifikovaného úseku DNA.

qPCR bola zacielená na 3 oblasti výrobcom deklarovaného plazmidového DNA templátu: oblasť kódujúcu SPIKE proteín, oblasť ORI (počiatok replikácie bakteriálneho plazmidu) a oblasť KAN kódujúcu rezistenciu na kanamycín (selekčný gén bakteriálneho plazmidu), viď obr. 2.4.1. Na amplifikáciu každej cieľovej oblasti sme použili minimálne dva súbory primerov (Tab. 2) a qPCR sme realizovali paralelne v dvoch laboratóriách, so zapojením 3 expertov, v súlade so štandardným operačným postupom pre analýzu medicínskych produktov mimo špecifikácie výrobcu.

Na detekciu amplikónov slúži próba, t. j. oligonukleotid označený fluorofórom na 5' konci a quencherom na 3' konci. Počas amplifikácie DNA Taq polymeráza degraduje próbu, čím dôjde k uvoľneniu fluorescenčného signálu, ktorý je úmerný množstvu cieľovej DNA. Kvantifikácia je založená na hodnote Ct (threshold cycle). Ct hodnota je počet PCR cyklov, pri ktorom fluorescenčný signál prekročí nastavenú prahovú hodnotu (threshold) a stane sa detegovateľným nad úrovňou pozadia. Tento bod zodpovedá začiatku exponenciálneho nárastu produktu PCR reakcie, teda momentu, keď už je prítomný dostatok amplifikovaného materiálu, aby bol merateľný. Čím nižšia je Ct hodnota, tým viac špecifickej DNA bolo vo vzorke na začiatku, takže ju test zachytí rýchlejšie. Pre stanovenie presného množstva DNA na úrovni počtu molekúl je potom potrebné využiť kalibračnú krivku, pripravenú zo známych koncentrácií štandardnej templátovej DNA.

OPIS POSTUPOV:

A. Príprava vzorky na qPCR

Vakcíny boli opracované detergentom Triton X-100 a priamo použité na qPCR bez izolácie DNA, alebo sa DNA z mRNA vakcín izolovala pomocou QIAGEN QIAamp MinElute Virus Kit.

Opracovanie mRNA vakcín Tritonom X-100

Triton X-100 je neiónový surfaktant a relatívne mierny detergent, ktorý sme použili na rozrušenie lipidov a uvoľnenie nukleových kyselín. Stručný postup: K vzorke mRNA vakcíny bol pridaný Triton X-100 do finálnej koncentrácie 1 %. Následne bola vzorka inkubovaná 15 min pri laboratórnej teplote a potom prenesená na ľad, pre dlhšie skladovanie sa alikvóty spracovanej vzorky zmrazili na -20 °C.

Izolácia nukleových kyselín pomocou QIAGEN QIAamp MinElute Virus Kit

QIAGEN QIAamp MinElute Virus Kit umožňuje vysoko účinnú purifikáciu nukleových kyselín z malého objemu vzorky, pričom sa využíva silikátová membrána, ktorá viaže DNA za prítomnosti chaotropných solí. Pri izolácii bol dodržaný postup odporúčaný výrobcom, stručne: Alikvótna časť vzorky mRNA vakcíny sa doplnila na objem 200 µl fyziologickým roztokom a pridala sa k 25 µl QIAGEN Protease.

K vzorke sa potom pridal lyzačný roztok AL a následne sa zmes dôkladne premiešala na vortexe a inkubovala 15 min pri 56 °C. K vzorke sa pridalo 250 µl čistého etanolu a zmes bola dôsledne premiešaná na vortexe. Pripravená vzorka sa naniesla do minikolónky QIAamp MinElute a centrifugovala. Nukleové kyseliny zachytené na kolónke sa premyli postupne roztokmi AW1, AW2 a nakoniec čistým etanolom. Nukleové kyseliny sa následne eluovali roztokom AVE (50 µl). Do PCR reakcie sa použili 2 µl izolovanej vzorky nukleových kyselín.

B. Primery, próby a štandardy

Pri výbere a dizajne primerov a prób sme vychádzali zo zadania, kde našou primárnou úlohou bola analýza zvyškovej DNA v dostupných šaržiach vakcín. Preto sme sa zamerali aj na overenie a reprodukovateľnosť výsledkov prezentovaných inými autormi, pričom sme použili primery a próby podľa sekvencií publikovaných v práci Fleming et al, HSOA Journal of Angiology & Vascular Surgery, 2025 (SPIKE 2 a ORI 2). Okrem toho sme použili nami optimalizované verzie primerov a prób z uvedenej publikácie (SPIKE 1 a ORI 1A), ktorých úpravy mali za cieľ zlepšiť ich reakčné parametre, napr. anelačnú teplotu a tiež redukciu tvorby dimérov. Navyše sme pre oblasť ORI a oblasť KAN navrhli úplne nové súbory primerov a prób (ORI 1B a KAN 1). Celkovo sme teda použili 6 rôznych typov PCR testov (tzv. PCR „assays“).

Na dosiahnutie presnej kalibrácie a kvantifikácie jednotlivých qPCR testov sme navrhli a dali syntetizovať DNA fragmenty zodpovedajúce amplifikovaným úsekom (IDT, gBlocks Gene Fragment). Fragment SPIKE1 o dĺžke 250bp, fragment ORI1A o dĺžke 170bp, fragment ORI1B o dĺžke 130bp, a fragment KAN1 o dĺžke 130bp. Fragmenty prešli procesom kontroly kvality, ktorý zahŕňa overenie veľkosti kapilárnou elektroforézou. Pred použitím boli nariedené na koncentráciu 10 ng/µl.

Tab.2 Zoznam primerov a prób použitých na qPCR analýzu

Cieľová oblasť	Sekvencia primerov (5'→3')	Veľkosť produktu (bp)
SPIKE 1	Forward: GGC AAG GGC TAC CAC CTG ATG AG	228
	Reverse: TGT TGT CGG TGG TGA TGA TCT GG	
SPIKE 2	Forward: TGC GGC AAG GGC TAC CAC CTG ATG AG	233
	Reverse: GGT GTT GTC GGT GGT GAT GAT CTG G	
ORI 1A	Forward: GCC TAC ATA CCT CGC TCT GCT AAT C	110
	Reverse: GCT GCG CCT TAT CCG GTA ACT ATC	
ORI 1B	Forward: AGG CCA CCA CTT CAA GAA CTC T	78
	Reverse: CTG GCA GCA GCC ACT GGT A	
ORI 2	Forward: CTA CAT ACC TCG CTC TGC TAA TC	105
	Reverse: GCG CCT TAT CCG GTA ACT ATC	
KAN 1	Forward: TCG ACC ACC AAG CGA AAC A	63
	Reverse: CGA CAA GAC CGG CTT CCA T	
Cieľová oblasť	Sekvencia prób (5'→3')	Fluorescenčná značka
SPIKE Comirnaty	CCC TCA GTC TGC CCC TCA CGG CGT GGT GTT	Cy5 – BHQ2
SPIKE Spikevax	TCC CCA GAG CGC ACC CCA CGG AGT GGT GTT	Cy5 – BHQ2
ORI 1	TAG CAC CGC CTA CAT ACC TCG CTC TGC	HEX – BHQ1
ORI 2	TGC TGC CAG TGG CGA TAA GTC GTG TCT T	FAM – BHQ1
KAN 1	CGC ATC GAG CGA GCA CGT ACT CG	FAM – TAMRA

C. Podmienky qPCR

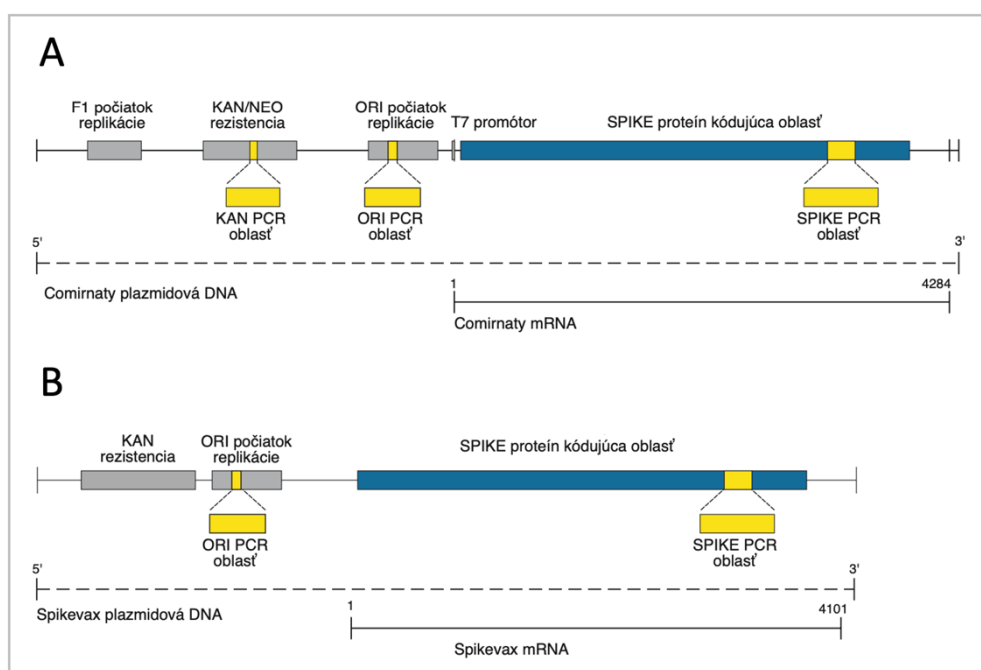
Na qPCR bol použitý PCR cyklér QuantStudio 5 Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific) a mix TaqMan Fast Advanced Master Mix for qPCR (Applied Biosystems). Príprava reakcií a podmienky amplifikácie boli podľa odporúčania výrobcu: inkubácia 2 min pri 50 °C, následne 20 sekúnd pri 95 °C a 40 cyklov pozostávajúcich z denaturácie 3 sekundy pri 95 °C a anealingu-syntézy 30 s pri 60 °C. Každá

vzorka bola analyzovaná vo forme troch technických replikátov, z ktorých bol vypočítaný aritmetický priemer a smerodajná odchýlka.

VÝSLEDKY:

Pri dizajnovaní qPCR zameranej na zvyškovú templátovú DNA v mRNA vakcínach Comirnaty a Spikevax sme vychádzali zo sekvencií, ktoré sme získali sekvenovaním DNA extrahovanej zo šarží vakcín analyzovaných v rámci tejto správy. Sekvenovanie, bioinformatické spracovanie dát a výsledné sekvencie sú detailne opísané v časti 2.5 tejto správy.

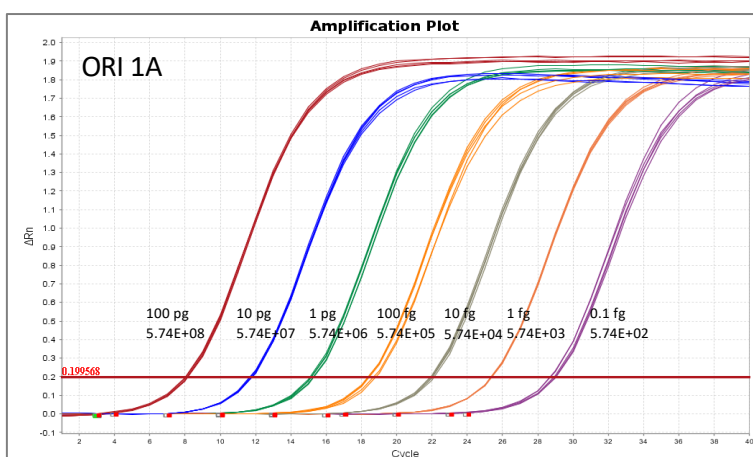
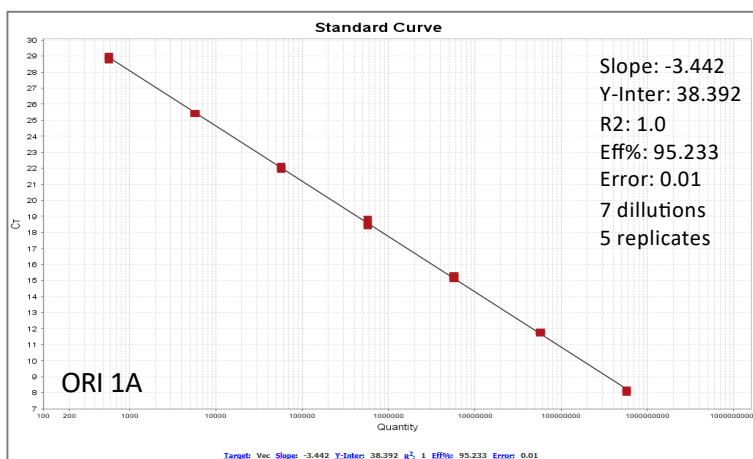
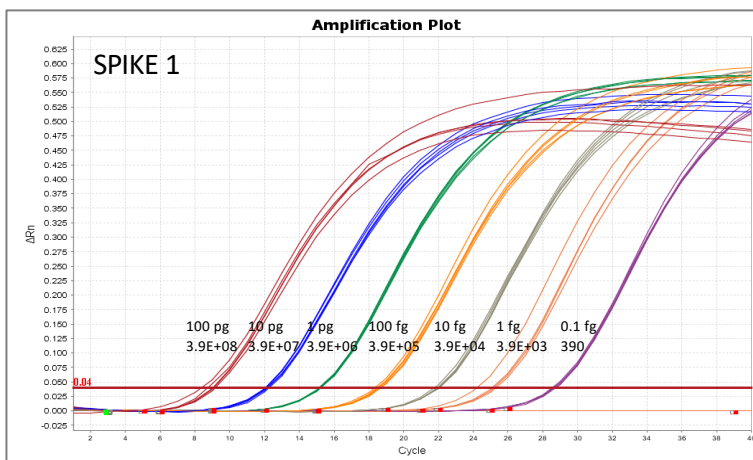
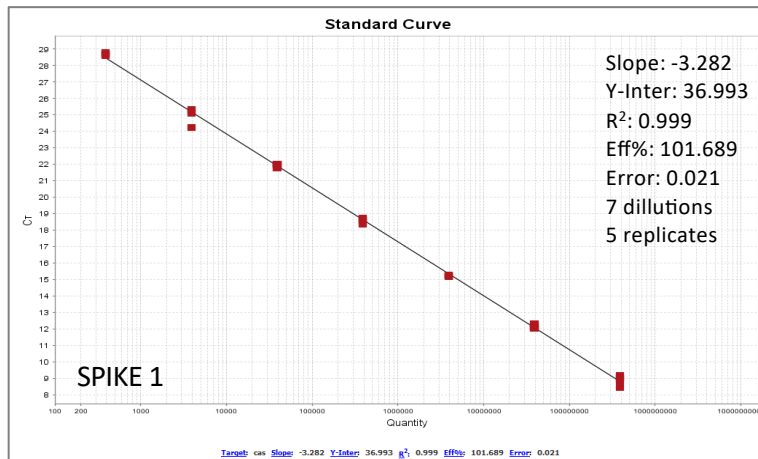
Schematická štruktúra sekvenovaných DNA templátov, z ktorých bola produkovaná mRNA vo vakcínach Comirnaty a Spikevax, je znázornená na Obr. 2.2.1. Schéma tiež zobrazuje úseky amplifikované pomocou qPCR.

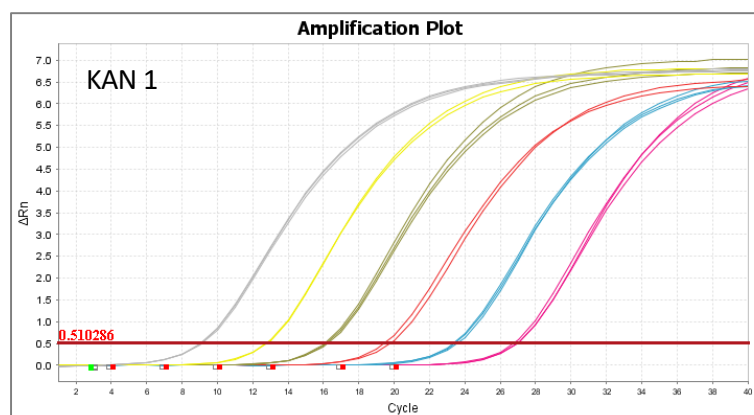
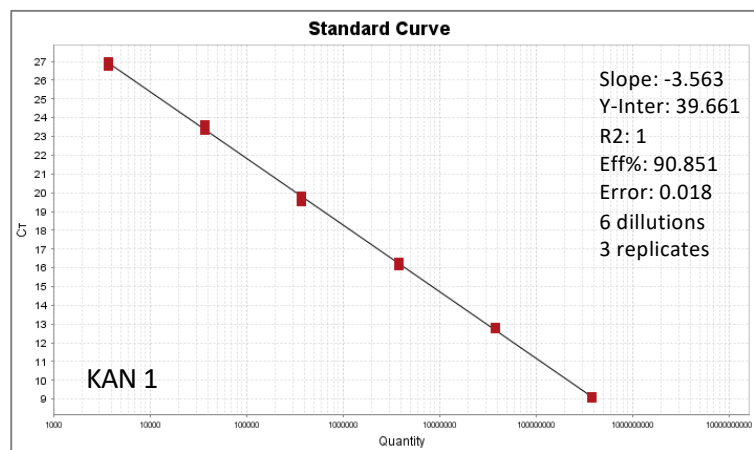
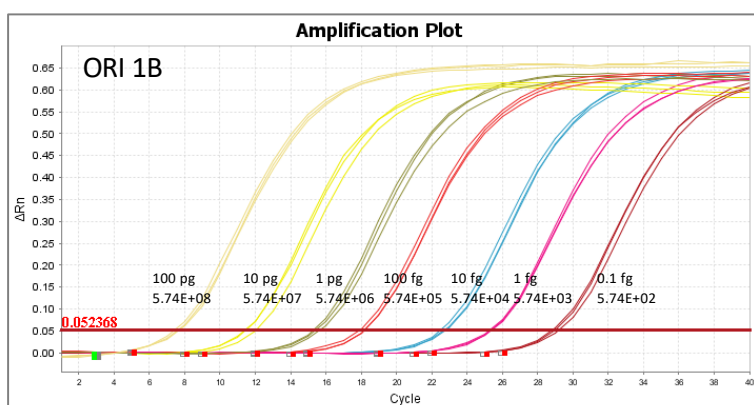
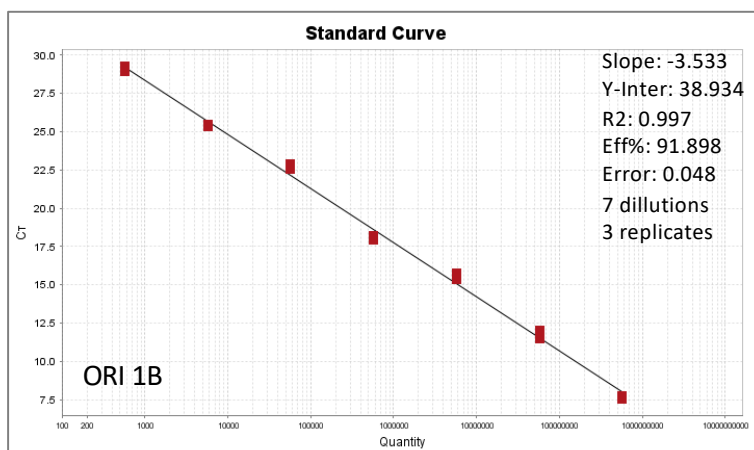


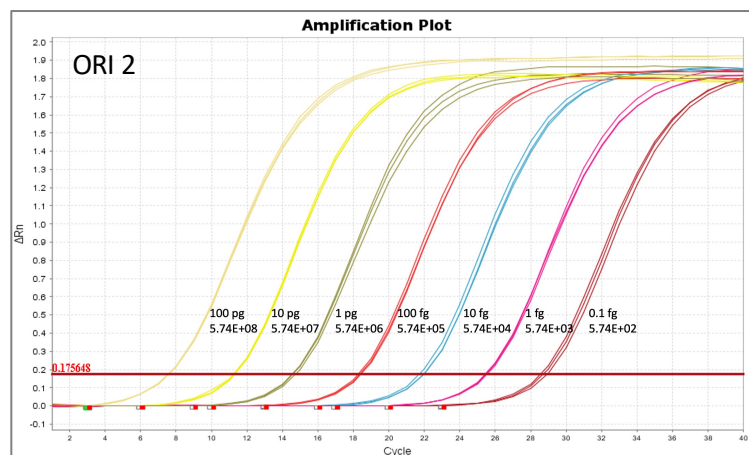
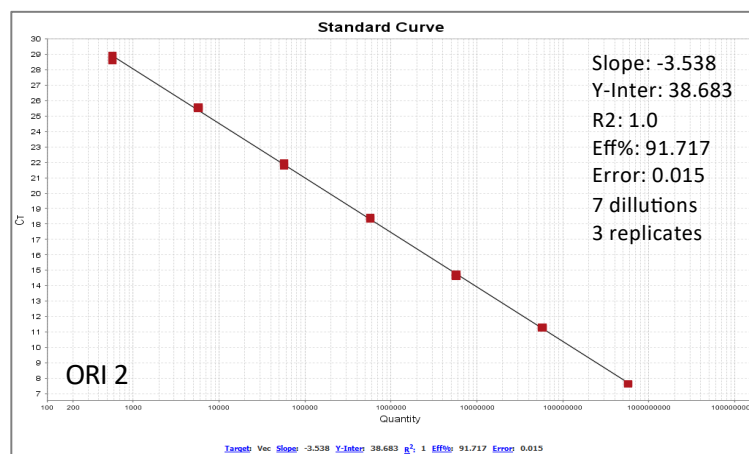
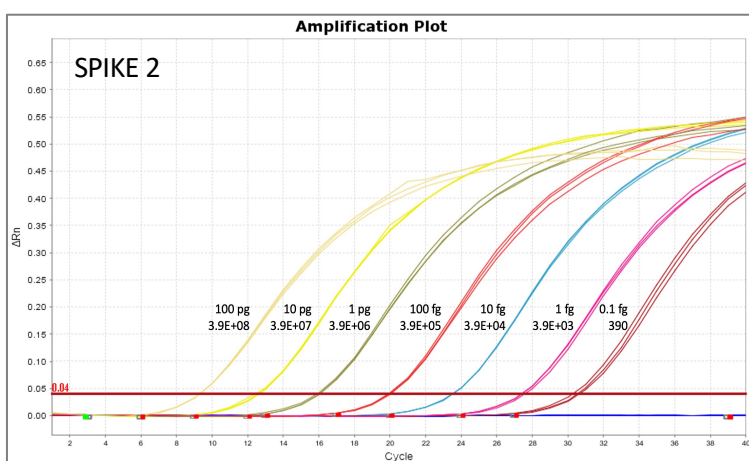
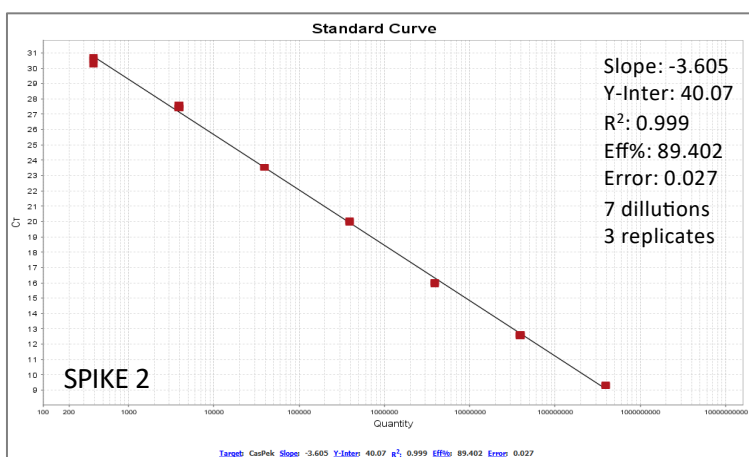
Obr. 2.2.1
Schematické
znázornenie DNA
templátu
použitého na
produkcii mRNA
pre vakcíny (A)
Comirnaty
a (B) Spikevax.

Na presné stanovenie množstva DNA vo forme počtu molekúl (kópií) konkrétneho fragmentu DNA sme pre každý zo šiestich PCR testov pripravili kalibračnú štandardnú krivku. Na ich prípravu sme použili špecificky pripravené syntetické DNA štandardy v sérii 6-7 desiatkových riedení zahŕňajúcich koncentrácie od 100 pg až po 0.1 fg DNA/μl vzorky. Počet molekúl (kópií) DNA v jednotlivých štandardoch bol určený na základe známej molekulovej hmotnosti fragmentov. Pri hodnotení štandardných kriviek (kalibračných priamok) sme sledovali kľúčové parametre, ktoré vypovedajú o kvalite reakcie, predovšetkým smernica („slope“), účinnosť („efficiency“, E) a korelačný koeficient (R^2).

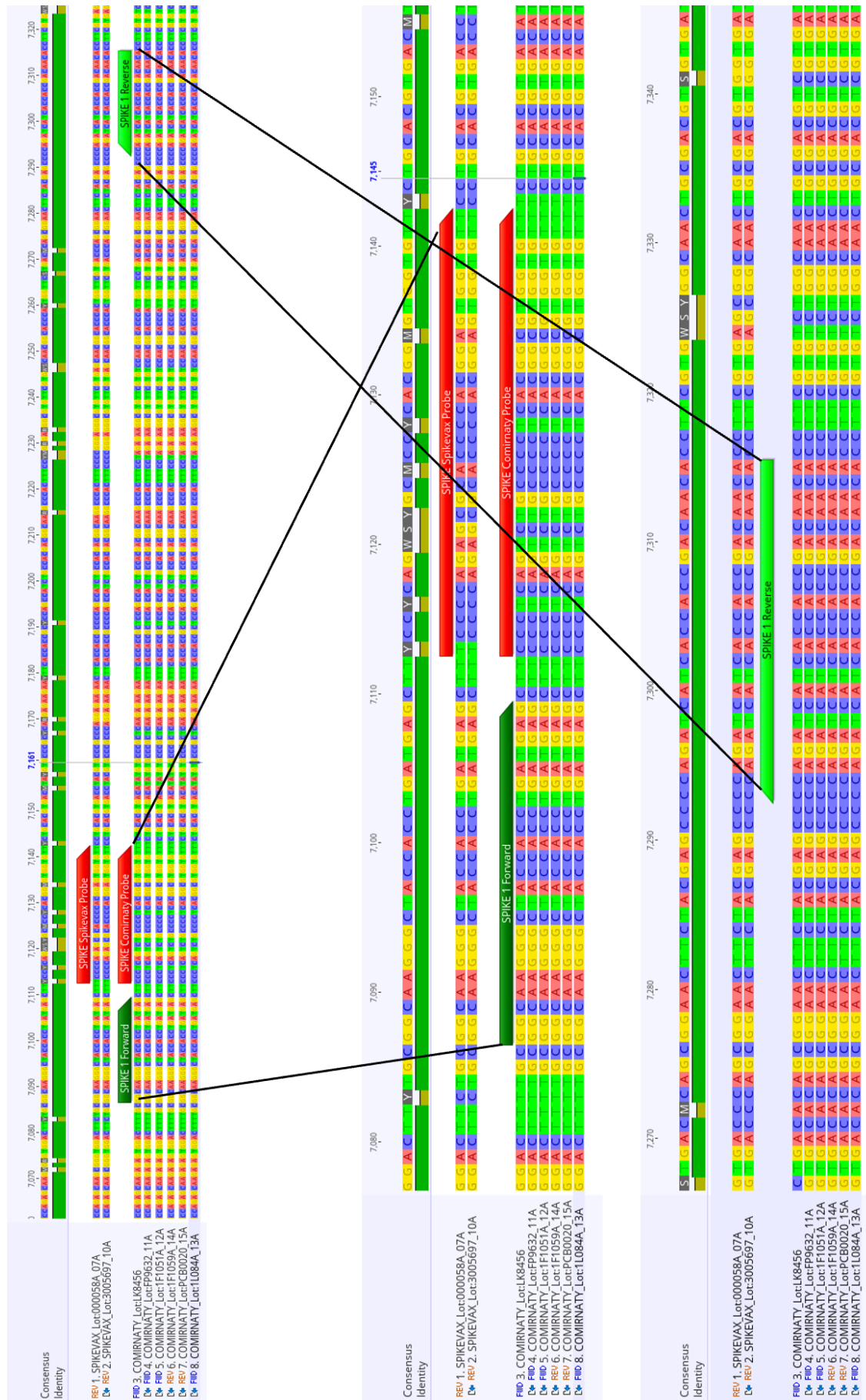
Kalibračné grafy na nasledujúcom Obr. 2.2.2 ukázali, že kľúčové parametre dosahovali odporúčané rozmedzia (-3.1 – -3.6 pre smernicu, 90 – 110 % pre účinnosť a ≥ 0.99 pre R^2) pri všetkých nami navrhnutých qPCR testoch. Suboptimálne parametre boli pozorované len pri teste SPIKE 2, ktorý sme však aj napriek tomu používali pre priame porovnanie s dátami publikovanými v práci Fleming et al, HSOA Journal of Angiology & Vascular Surgery, 2025. Významné zlepšenie parametrov v testoch SPIKE 1 a ORI 1A v porovnaní s SPIKE 2 a ORI 2 potvrdzujú, že naše mierne úpravy dizajnu primerov boli prospešné a viedli k vyššej účinnosti použitých qPCR testov.

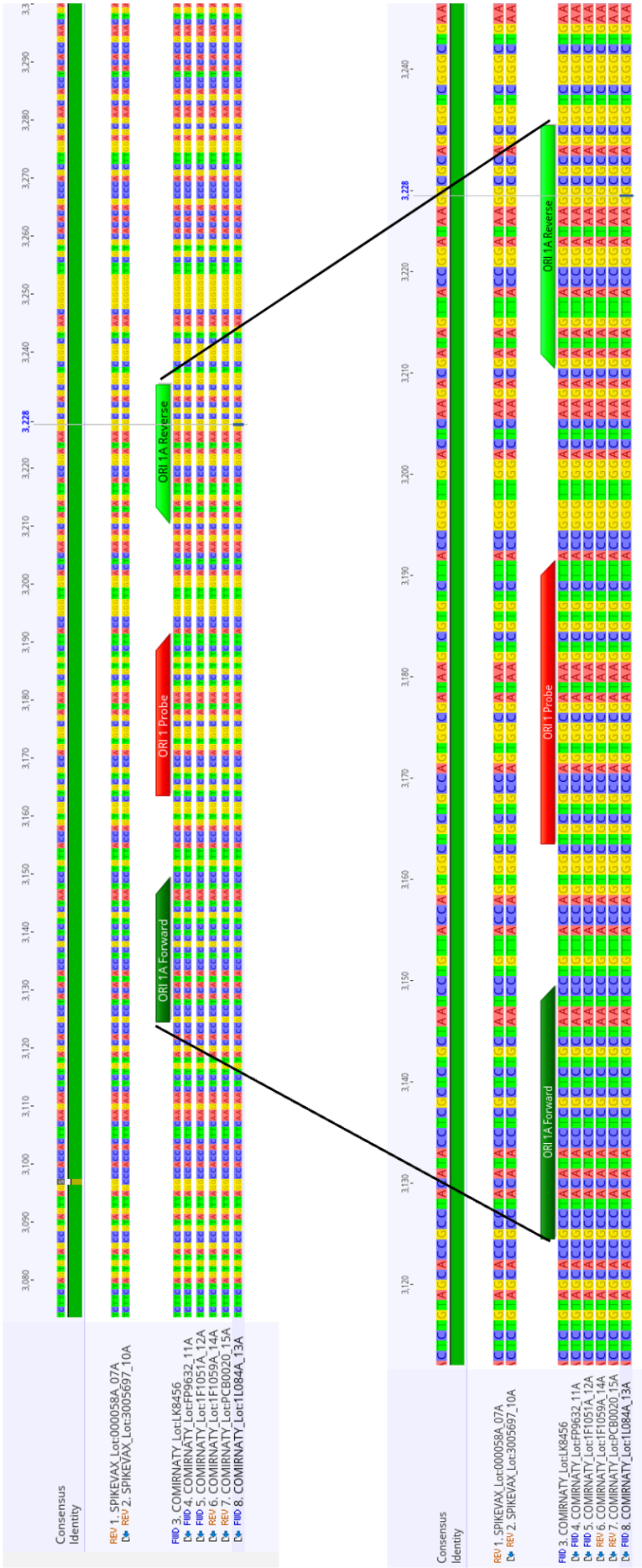






Obr. 2.2.2
Kalibračné grafy a amplifikačné
krivky generované s primermi pre
SPIKE, ORI a KAN oblasti.





Obr. 2.2.3
Porovnanie sekvencií primerov so sekvenciami korešpondujúcich cieľových sekvencií v sekvenovaných šaržiach vakcín Comirnaty a Spikevax.

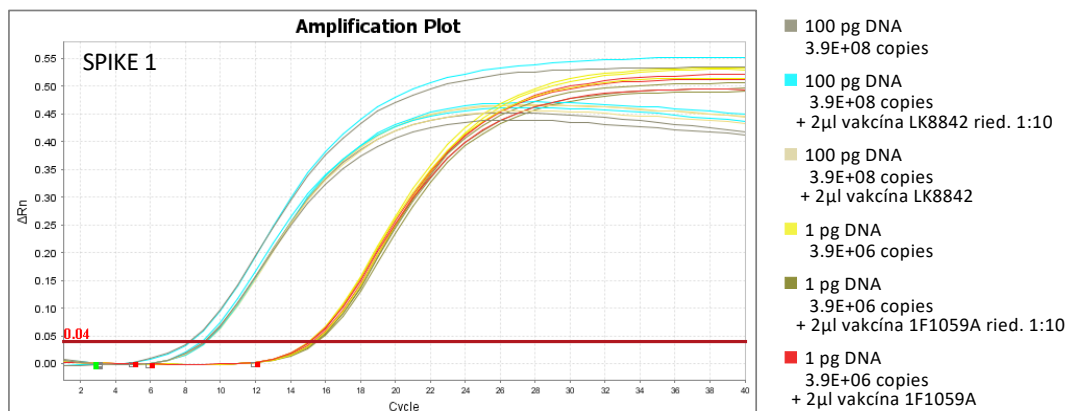
Pri návrhu sekvencií primerov a prób sme pôvodne vychádzali len z verejne dostupných informácií o plazmidoch použitých výrobcami alebo z už publikovaných sekvencií primerov a prób. V rámci tejto analýzy jednotlivých šarží vakcín sme však získali ďalšie sekvencie plazmidovej DNA (kapitola 2.5) a dodatočne sme overili zhodu použitých primerov so sekvenciami týchto šarží.

Získanie nových sekvencií templátovej DNA vakcín Spikevax bolo v dôsledku nižšieho obsahu zvyškovej DNA oveľa náročnejšie a vyžiadalo si viac času. Zároveň sa ukázalo, že sekvencie pre oblasť KAN sa u vakcín Spikevax výrazne líšia od sekvencií Comirnaty. To spôsobilo, že primery a próby pre KAN test vakcíny Spikevax bolo potrebné navrhnuť samostatne. Pre časovú tieseň a dlhé dodacie doby syntetizovaných primerov a prób nebolo možné tieto analýzy vykonať. Vzhľadom na to, že všetky ostatné analýzy urobené v rámci tejto štúdie ukazovali celkovo nižší obsah zvyškovej DNA vo vakcínach Spikevax, neboli tieto testy nevyhnutné.

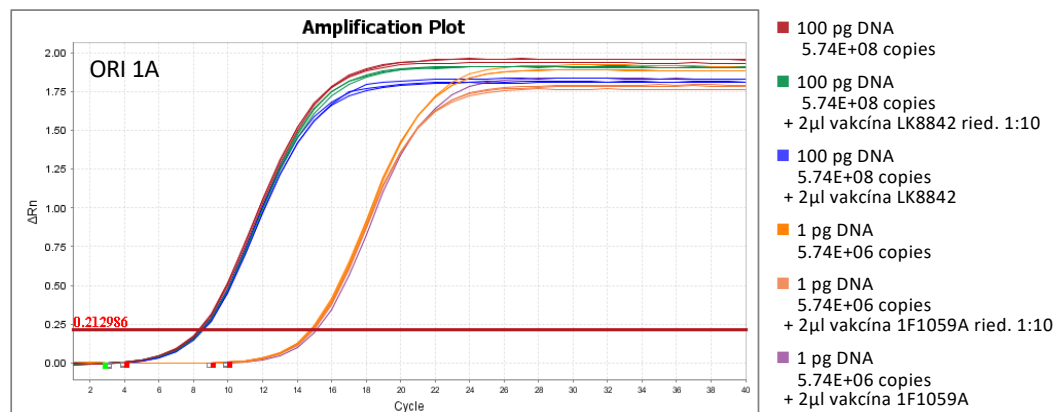
Porovnanie sekvencií (obr. 2.2.3) ukazuje 100 % identitu medzi jednotlivými sekvenovanými šaržami v mieste väzby primerov a prób pre oblasti SPIKE a ORI, čo potvrdzuje vysokú špecifitu a vhodnosť nami použitých primerov a prób. Zároveň to potvrdzuje, že pre jednotlivé šarže vakcín nebolo potrebné vyvíjať osobitné PCR testy.

Ako vstupný materiál do PCR testov sme používali priamo vzorky mRNA vakcín opracované detergentom Triton X-100, alebo zmes nukleových kyselín pripravených pomocou QIAGEN QIAamp MinElute Virus Kit. V oboch prípadoch je vo vzorke prítomné veľké množstvo SPIKE mRNA, pri ktorej sme predpokladali, že by mohla prípadne znižovať účinnosť PCR testov SPIKE 1 a SPIKE 2 zacielených práve na túto oblasť. Pre overenie takejto možnej interferencie prítomnej mRNA s qPCR testami zacielenými na SPIKE oblasť sme vykonali špecifický porovnávaci experiment (Obr. 2.2.4).

A



B



Obr. 2.2.4

Porovnanie výsledkov qPCR amplifikácie štandardnej DNA s primermi SPIKE 1 (A) a ORI 1A (B) na vylúčenie interferencie s mRNA, ktorá je prítomná vo vakcíne.

V qPCR testoch SPIKE 1 a ORI 1A sme ako vstupnú vzorku použili dve rôzne koncentrácie syntetického štandardu (100 pg a 1 pg/ μ l vzorky). Paralelne sme pre porovnanie pridali aj štandardne používané množstvo (2 μ l) neriedenej alebo 1:10 riedenej vakcíny. Ak by k špecifickej inhibícii PCR v prítomnosti vakcíny došlo, prejavila by sa vyššími Ct hodnotami (posunom kriviek doprava) vo vzorkách obsahujúcich neriedenú vakcínu pri SPIKE 1 teste, zatiaľ čo ORI 1A test mal slúžiť ako kontrola.

Ako je možné vidieť na obr. 2.2.4, prídanie vakcíny do qPCR reakcie malo zanedbateľný vplyv nielen v prípade ORI 1A testu, kde sme to očakávali, ale aj v prípade SPIKE 1 testu. To potvrdzuje legitímnosť nášho prístupu s priamym použitím vakcíny opracovanej Tritonom X-100 ako vstupného materiálu do qPCR, bez nutnosti extrakcie nukleových kyselín. Výsledky z oboch qPCR testov (SPIKE 1 a ORI 1A) potvrdzujú, že nielen mRNA, ale aj ostatné zložky vakcíny nemajú významne negatívny vplyv na priebeh qPCR reakcie. Opodstatnenosť nášho postupu sa nám potvrdila aj na základe výsledkov qPCR uskutočnených na purifikovanej DNA s použitím QIAGEN QIAamp MinElute Virus Kitu, kde sme v analyzovaných šaržiach dostali prakticky identické qPCR profily (pri porovnaní s opracovaním Tritonom X-100) s mierne nižšími hodnotami ako dôsledok úbytku výťažku DNA v procese izolácie.

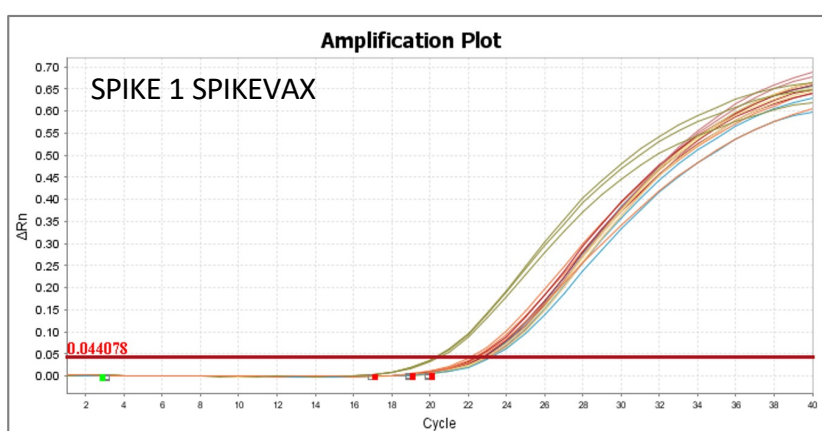
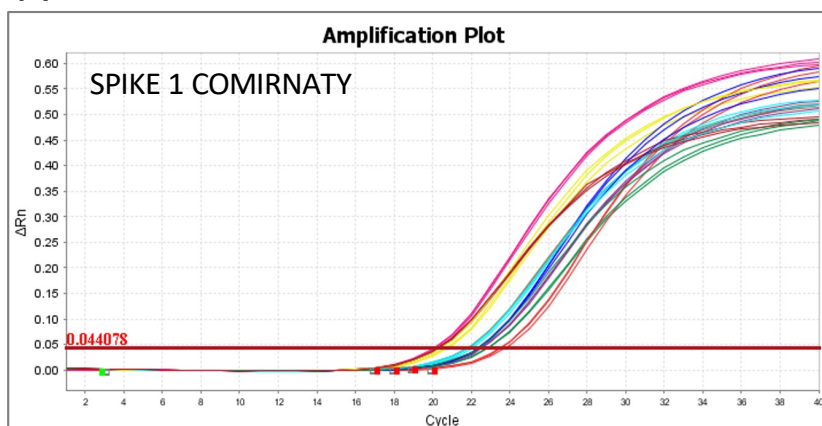
Celkovo sme prítomnosť DNA vo vakcínach analyzovali pomocou 6 typov qPCR testov. Výstupy z týchto qPCR analýz všetkých šarží analyzovaných vakcín sú zobrazené na obr. 2.2.5 – 2.2.11.

Primárny výstup z qPCR analýz, Ct hodnoty pre jednotlivé vzorky, boli na základe štandardných kriviek priamo obslužným softvérom qPCR prístroja vyjadrené vo forme počtu kópií (molekúl) na μ l vzorky. Tieto hodnoty sme následne prepočítali na celú dávku vakcíny. Keďže sú však normy regulátorov stanovené vo forme celkového množstva DNA v nanogramoch na dávku vakcíny a nie v počte kópií, tieto dáta o počte kópií sme následne na základe molekulovej hmotnosti templátovej DNA prepočítavali na nanogramy DNA na 1 dávku. Tieto prepočty používajú aj kontrolné laboratória pre rozhodnutie o uvoľnení šarží vakcín. Vychádza sa pri nich z predpokladu, že počet kópií konkrétneho fragmentu plazmidovej DNA stanovených pomocou konkrétneho qPCR testu zodpovedá počtu kópií pôvodného celého, nedegradovaného plazmidu. Ide teda o teoreticky maximálne možné množstvá, vypočítané na základe molekulovej hmotnosti celého plazmidu.

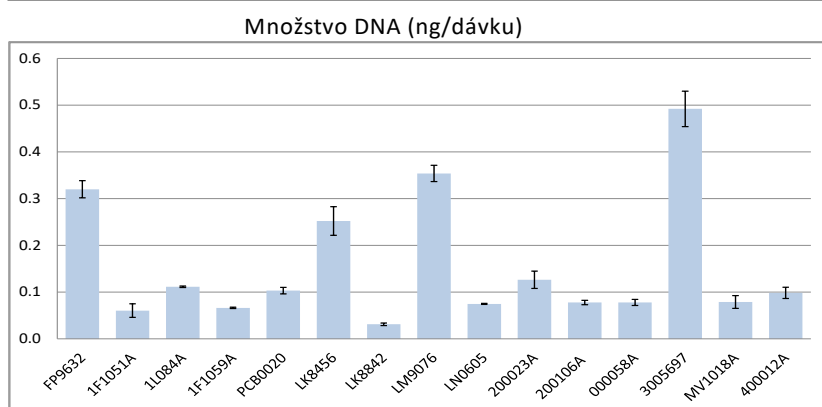
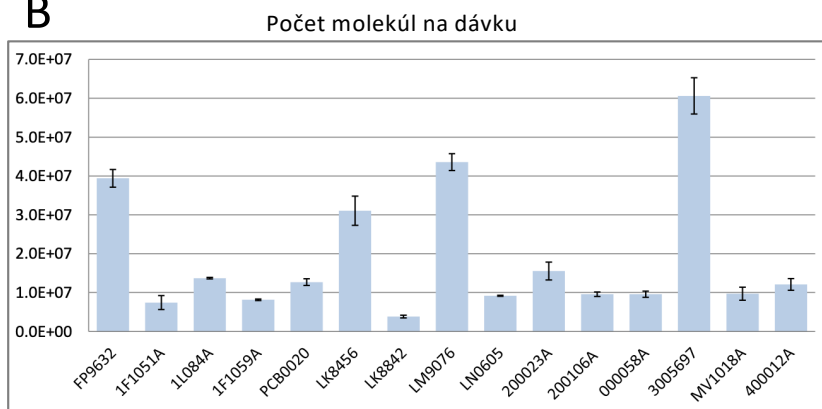
Analýza všetkých šarží vakcín s využitím všetkých šiestich etablovaných qPCR testov ani v jednom prípade neukázala prekročenie stanoveného limitu 10 ng DNA na dávku vakcíny. Najvyššie počty kópií a k tomu adekvátne najvyššie prepočítané množstvá DNA v nanogramoch na dávku boli zistené pri použití KAN 1 qPCR. Najvyššia priemerná hodnota počtu kópií bola $9,8 \times 10^8$ kópií fragmentu, čo by pri prepočte na kompletný plazmid zodpovedalo 8 ng DNA na dávku. Najnižšie počty kópií aj prepočítané množstvá DNA na dávku (0.5 ng na dávku) boli zistené pri použití SPIKE 1 a SPIKE 2 qPCR. Testy zamerané na oblasť ORI indikovali maximálne hodnoty v rozpätí 3,3-5 ng DNA na dávku.

Rozdiely medzi stanovenými množstvami zvyškovej templátovej DNA pri použití rôznych qPCR testov sú v niektorých prípadoch pomerne výrazné. Vzhľadom k tomu, že parametre kalibračných kriviek jednotlivých qPCR testov s výnimkou SPIKE 2 spĺňali odporúčané rozmedzie, nedajú sa tieto rozdiely vysvetliť len rozdielmi v účinnosti qPCR. Za najdôležitejší faktor, ktorý môže mať vplyv na pozorované rozdiely, považujeme dĺžku amplifikovaného PCR produktu. Zvyšková templátová DNA sa totiž vo vakcíne nenachádza vo forme kompletných molekúl plazmidovej DNA, ale je v rámci purifikačného procesu náhodne štiepená pomocou špecifických enzýmov od dinukleotidov až po krátke fragmenty. Na základe analýzy sekvencií uvedenej v kapitole 2.5 sa v analyzovaných šaržiach vakcín nachádzajú fragmenty s priemernou dĺžkou 150 bp. Čím je amplifikačný produkt dlhší, tým je väčšia pravdepodobnosť, že je molekula DNA štiepená aj v tejto oblasti a preto je takýchto neporušených celistvých fragmentov vo vakcíne prítomných menej. Týmto vysvetľujeme, že najvyššie hodnoty zvyškovej DNA boli zistené pomocou KAN 1 qPCR, pri ktorej je amplifikačný produkt veľmi krátky, len 63 bp. Na druhej strane, najnižšie množstvá boli systematicky detegované pri SPIKE 1 a SPIKE 2 testoch, ktoré detegujú fragmenty s 228 až 233 bp. Aj pri najmenšom technicky realizovateľnom amplikóne s primermi KAN je však prepočítané množstvo templátovej DNA na 1 dávku vakcíny pod limitnou hodnotou. Zároveň je však dôležité poznamenať, že profil rozdielov v počte amplifikovaných molekúl v rôznych qPCR testoch je medzi jednotlivými šaržami veľmi konzistentný.

A

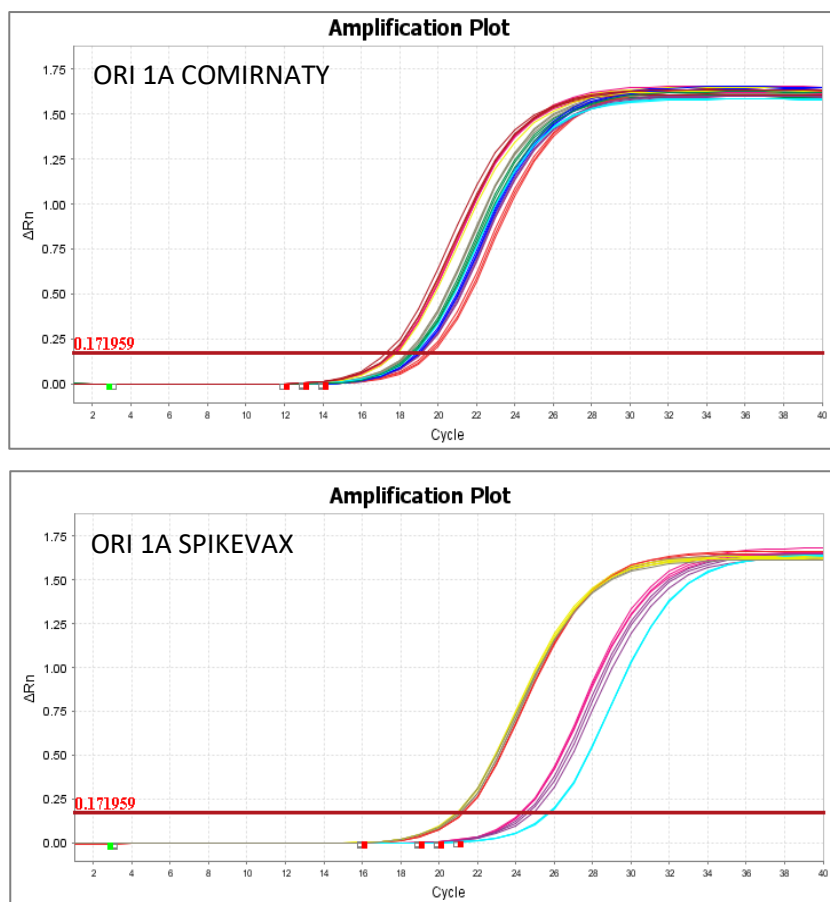


B

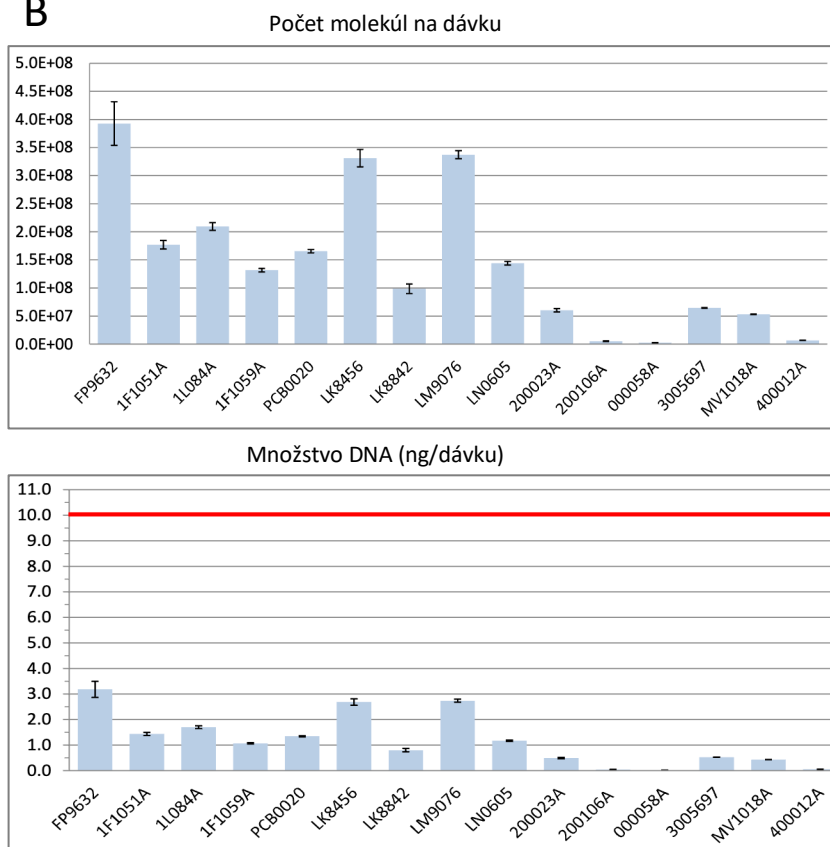


Obr. 2.2.5
 (A) Amplifikačné krivky oblasti kódujúcej časť Spike proteínu všetkých šarží vakcín, výsledky s použitím primerov SPIKE 1.
 (B) Grafické znázornenie výsledného počtu amplifikovaných molekúl a prepočet na množstvo plazmidovej DNA v ng/dávku.

A

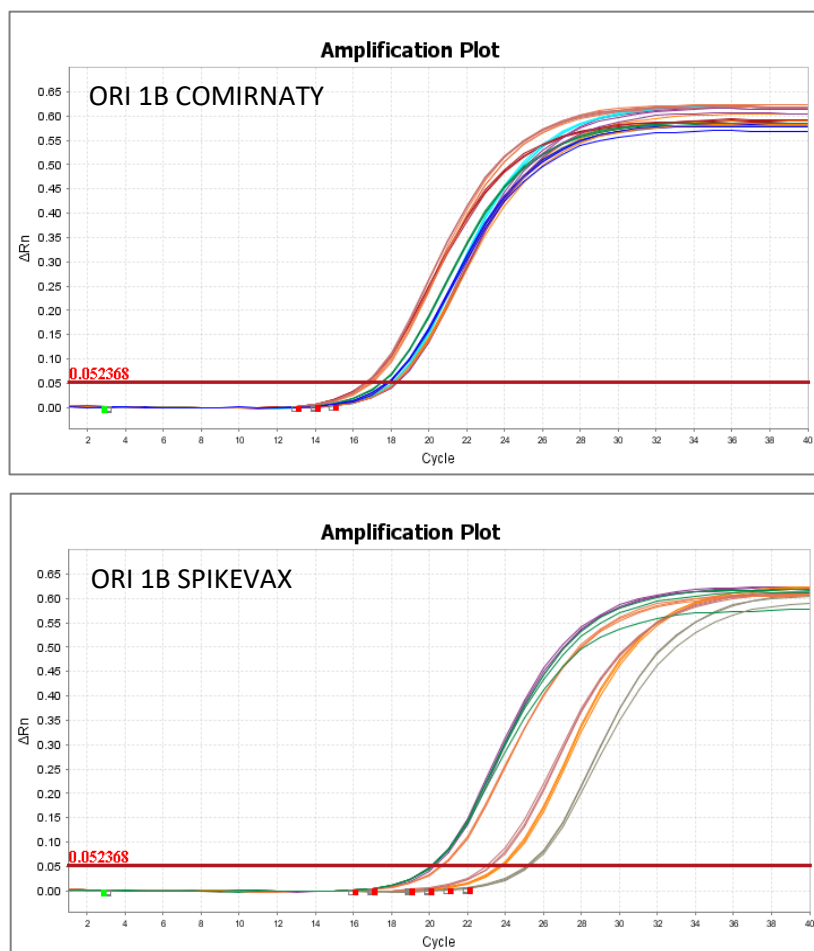


B

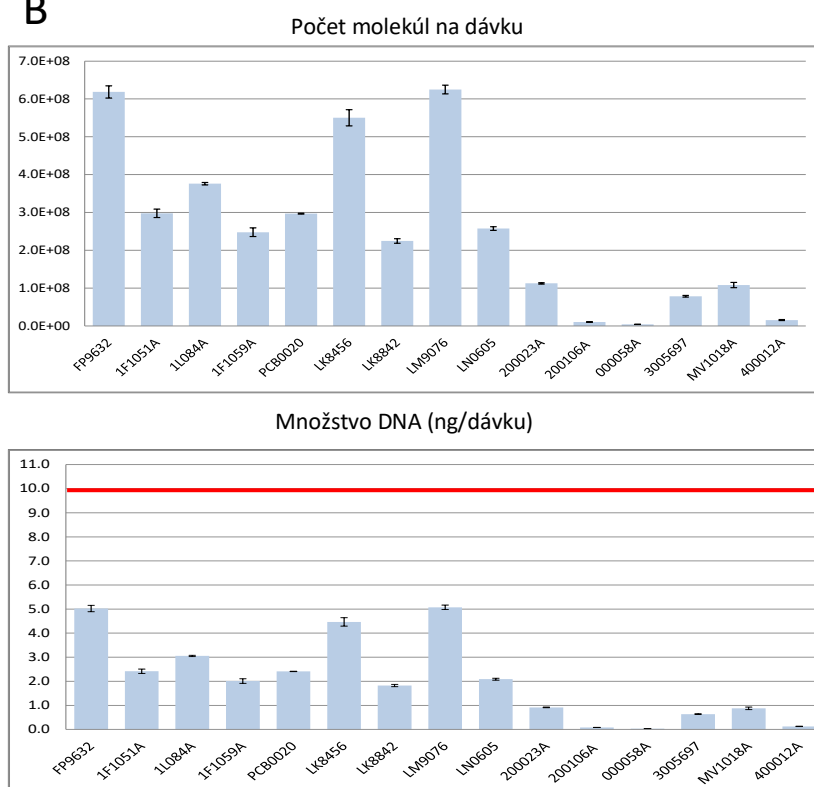


Obr. 2.2.6
(A) Amplifikačné krivky oblasti ORI všetkých šarží vakcín, výsledky s použitím primerov ORI 1A.
(B) Grafické znázornenie výsledného počtu amplifikovaných molekúl a prepočet na množstvo plazmidovej DNA v ng/dávku. Červená čiara označuje limit 10 ng/dávku.

A



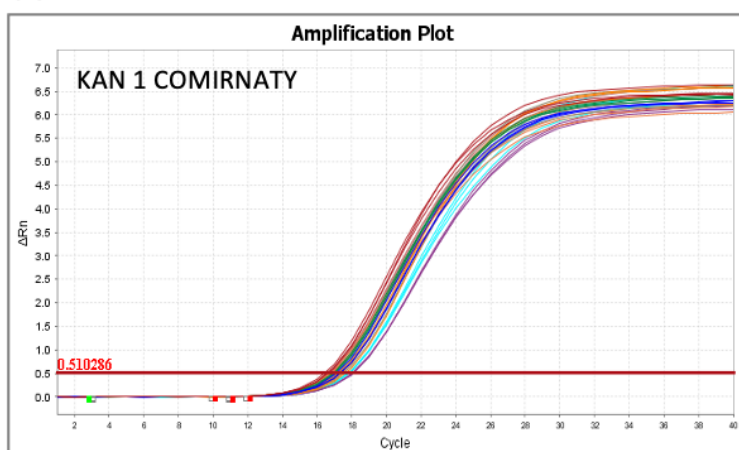
B



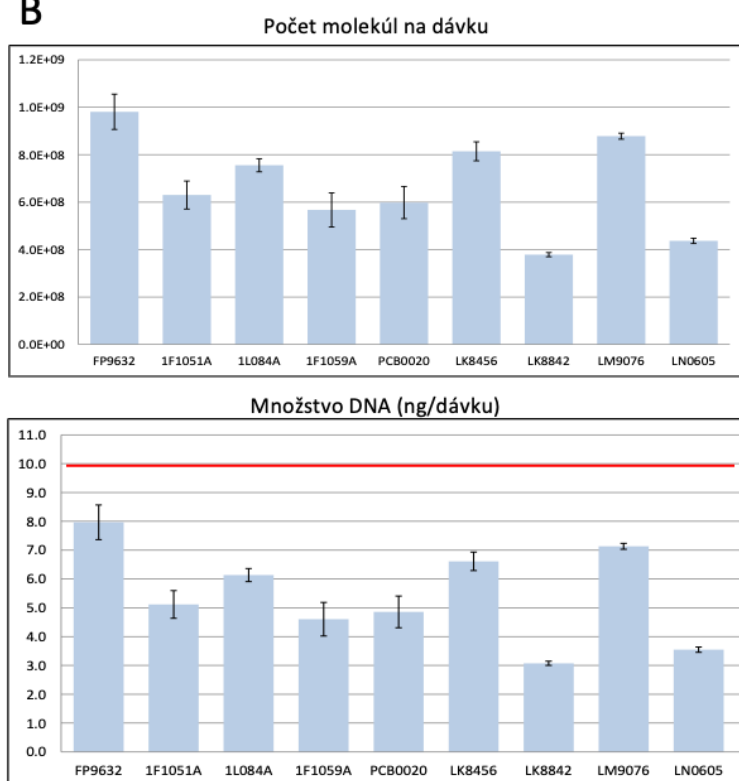
Obr. 2.2.7

(A) Amplifikačné krivky oblasti ORI všetkých šarží vakcín, výsledky s použitím primerov ORI 1B.
(B) Grafické znázornenie výsledného počtu amplifikovaných molekúl a prepočet na množstvo plazmidovej DNA v ng/dávku. Červená čiara označuje limit 10 ng/dávku.

A



B

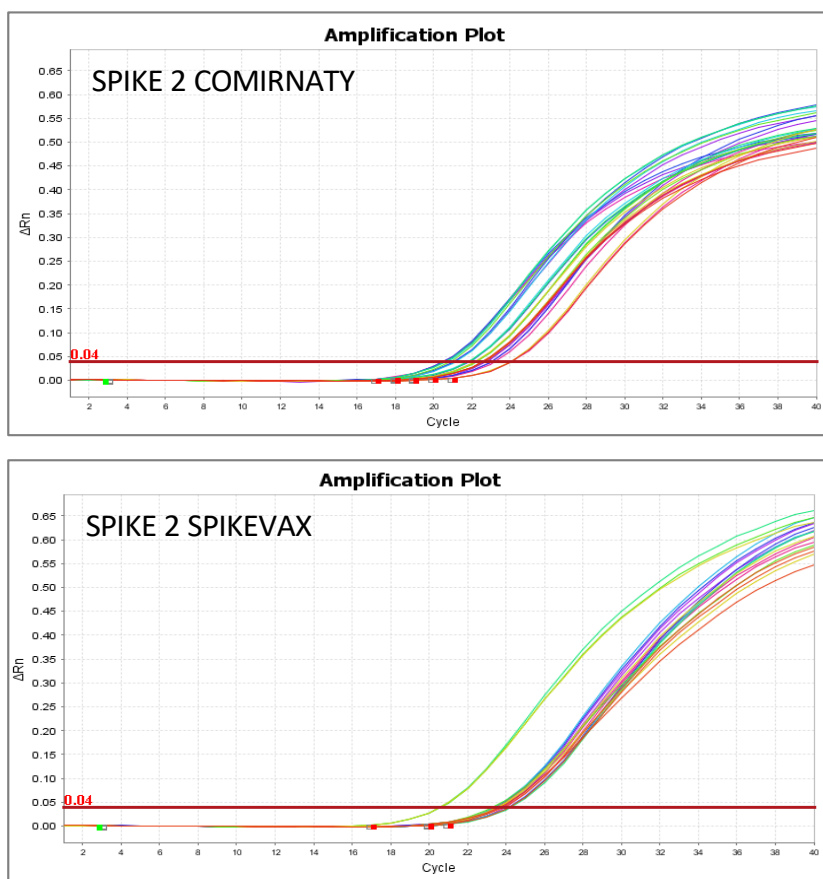


Obr. 2.2.8

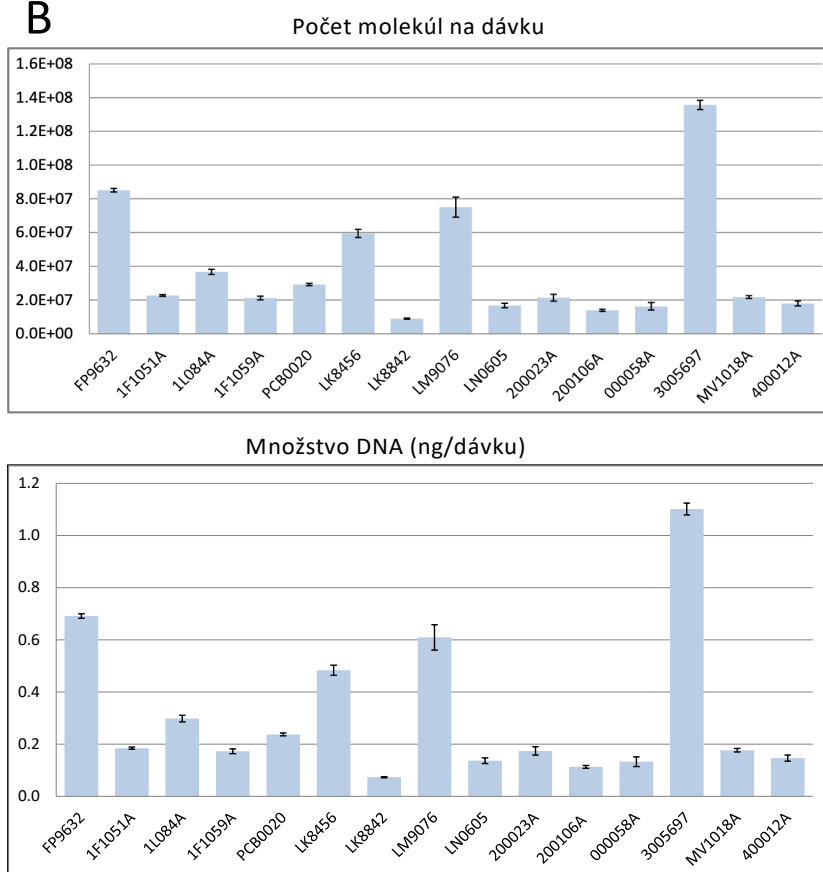
(A) Amplifikačné krivky oblasti KAN (kódujúca rezistenciu na kanamycín) všetkých šarží vakcín, výsledky s použitím súboru primerov KAN 1.

(B) Grafické znázornenie výsledného počtu amplifikovaných molekúl a prepočet na množstvo plazmidovej DNA v ng/dávku. Červená čiara označuje limit 10 ng/dávku.

A

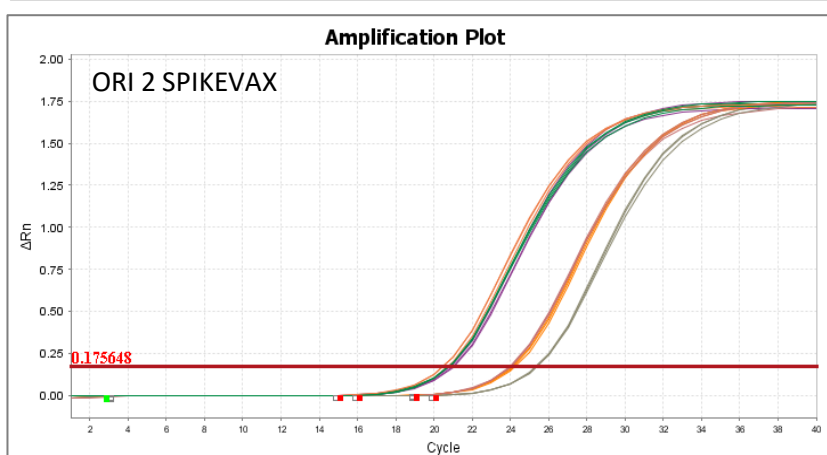
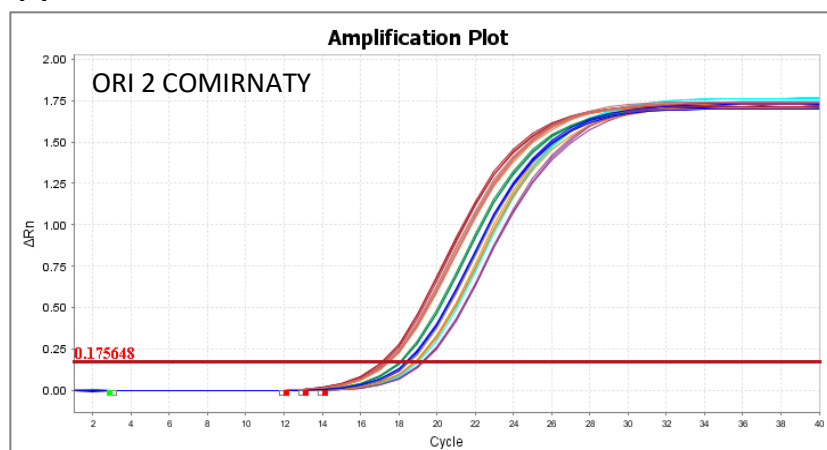


B



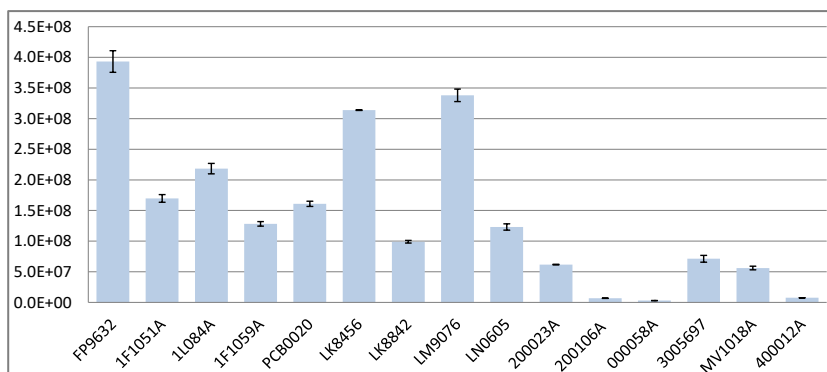
Obr. 2.2.9
(A) Amplifikačné krivky oblasti kódujúcej časť Spike proteínu všetkých šarží vakcín, výsledky s použitím primerov SPIKE 2 (podľa Fleming et al, 2025, s optimalizovanými podmienkami simplexnej qPCR).
(B) Grafické znázornenie výsledného počtu amplifikovaných molekúl a prepočet na množstvo plazmidovej DNA v ng/dávku.

A

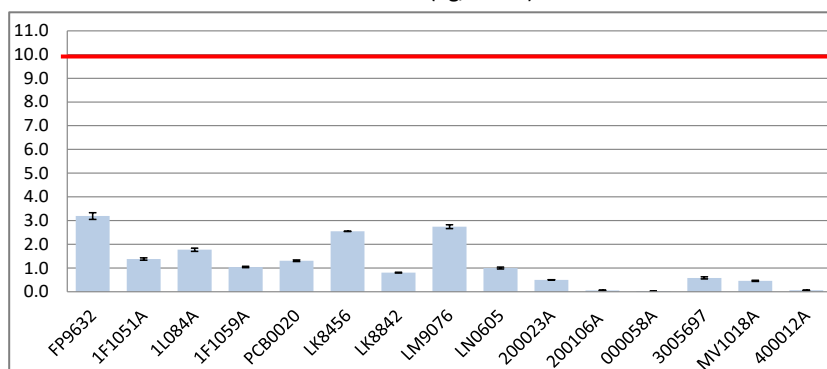


B

Počet molekúl na dávku



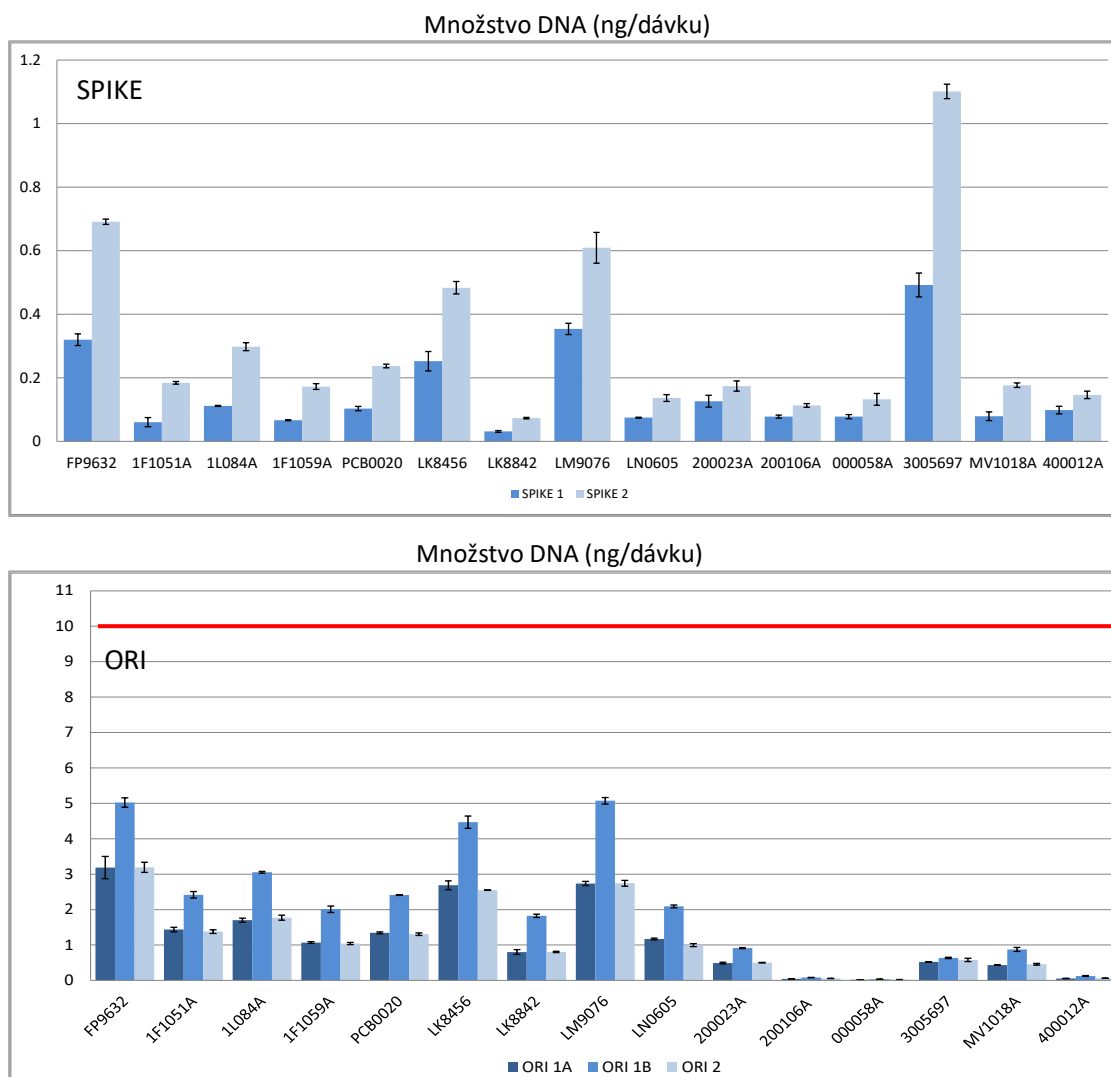
Množstvo DNA (ng/dávku)



Obr. 2.2.10

(A) Amplifikačné krivky oblasti ORI všetkých šarží vakcín, výsledky s použitím primerov ORI 2.

(B) Grafické znázornenie výsledného počtu amplifikovaných molekúl a prepočet na množstvo plazmidovej DNA v ng/dávku. Červená čiara označuje limit 10 ng/dávku.



Obr. 2.2.11

Súhrnný graf porovnávajúci výsledky všetkých simplexných qPCR v tejto analýze po prepočítaní na množstvo plazmidovej DNA v jednej dávke mRNA vakcín.

ZÁVER:

Obsah DNA vo všetkých analyzovaných šaržiach vakcín metódou qPCR vyhovuje limitom stanoveným regulačnými autoritami (EMA, FDA, WHO).

Naše výsledky sú tiež v zhode s výsledkami oficiálnych kontrolných laboratórií „Official Control Authority Batch Release for Human Biologicals“ (OCABR) a aj Austrálskej „Therapeutic Goods Administration“ (TGA). TGA na svojich webových stránkach uvádza, že doposiaľ analyzovala 28 finálnych produktov šarží mRNA vakcín Comirnaty a Spikevax a v žiadnej šarži nepotvrdila prekročené limity zvyškovej DNA. Pričom v zhode z našou analýzou vakcíny Spikevax výrobcu Moderna vykazujú všeobecne nižšie hladiny zvyškovej DNA v porovnaní s vakcínami Comirnaty výrobcu Pfizer, čo potvrdzuje relevantnosť našich postupov a výsledkov.

Všetkých 11 exspirovaných šarží, ktoré sú predmetom tejto správy, bolo podrobených aj multiplexnej PCR analýze, ktorá je opísaná v práci *Fleming et al, HSOA J Angiol & Vasc Surgery, 2025*. Metodické a interpretačné nedostatky uvedenej PCR analýzy (s predradenou reverznou transkripciou mRNA) sú

opísané v úvode tejto časti správy a evidentne prispeli k výraznej deformácii výsledkov prezentovaných v danej publikácii.

Na základe kvantitatívnej PCR zacielenej na 3' oblasť sekvencie kódujúcej SPIKE proteín autori Fleming et al. tvrdia, že vakcíny obsahujú „signifikantné množstvo DNA“ a to:

$10^7 - 10^8$ kópií na ml vakcíny Spikevax, čo by zodpovedalo $5 \times 10^6 - 5 \times 10^7$ kópií na jednu dávku vakcíny a $10^8 - 10^9$ kópií na ml vakcíny Comirnaty, čo by zodpovedalo $3 \times 10^7 - 3 \times 10^8$ kópií na jednu dávku vakcíny. Tieto počty kópií pôsobia na laikov ohromujúco, avšak v prepočte na kvantitu DNA v nanogramoch na jednu dávku sú stále pod limitnou hodnotou 10 ng.

Napr. približná hmotnosť $1,4 \times 10^8$ kópií amplikónu SPIKE prepočítaných na počet molekúl templátovej DNA s dĺžkou ~4 000 báзовých párov v jednej dávke vakcíny je približne 1,1 ng (viď Obr. 2.2.9)

Publikácia autorov Fleming et al, 2025 tiež obsahuje tvrdenie o veľkej variabilite medzi jednotlivými šaržami a to v rozsahu až 3 rádov, čo je pravdepodobne dôsledkom nevhodne dizajnovanej a technicky zle uskutočnenej PCR. Výsledky kvantitatívnej PCR na templáte cDNA prepísanej reverznou transkripciou a na templáte zvyškovej DNA nie je vhodné priamo porovnávať. Naše výsledky ukazujú, že variabilita medzi šaržami je v rozsahu jedného rádu.

Autori práce Fleming et al, 2025 tiež na základe RT PCR testu ORI oblasti tvrdia, že „cDNA izoláty“ získané reverznou transkripciou DNA/RNA purifikátov boli veľmi kontaminované klonovacím expresným vektorom („nanogramové až mikrogramové množstvá dsDNA“). Dokonca vyjadrili názor, že je prítomná celá templátová DNA kódujúca kompletnú „kazetu S proteínu“ (3880 bp), čo dedukujú z toho, že v RT PCR teste amplifikovali 5' ORI oblasť ako aj 3' oblasť pre časť S proteínu. Tento záver je vykonštruovaný, pretože na dôkaz celej kazety by musela byť uskutočnená qPCR reakcia iného dizajnu a parametrov. Navyše výsledky našich sekvenančných analýz nič také nepotvrdili.

Práca obsahuje aj úvahu o inom konštrukte v danom expresnom vektore, ktorý by mohol byť „primiešaným“ Omikronom. Naše výsledky sekvenovania, ako aj analýzy fragmentov ukazujú, že v analyzovaných šaržiach sa nenachádza žiadny kompletný DNA templát, iba jeho malé fragmenty, ktoré nemajú kódovaciu kapacitu. Čo sa týka Omikronu, mRNA kódujúca S proteín subvariantov BA.1 a BA.4/BA.5 je jasne deklarovanou súčasťou bivalentných šarží 200023A, 200106A, MV1018A, a 400012A.

2.3 KVANTIFIKÁCIA DNA POMOCOU FLUOROMETRIE

Pri kvantifikácii nukleových kyselín v biologických vzorkách regulačné orgány odporúčajú popri štandardnej qPCR použiť aj nezávislé (tzv. ortogonálne) metódy. Jednou z takýchto metód je fluorometria, nakoľko pri správnom nastavení a overení experimentálnych podmienok poskytuje vysoko citlivú fluorescenčnú detekciu množstva nukleových kyselín. Výhodou je, že tento spôsob merania ponúka flexibilitu pri príprave vzorky s možnosťou nastavenia kvantifikácie pre rôzne fluorescenčné farbivá.

PRINCÍP METÓDY:

Qubit fluorometria je založená na použití fluorescenčných farbív, ktoré sa viažu na dvojvláknovú DNA (dsDNA) a pri špecifickej vlnovej dĺžke emitujú fluorescenciu úmernú množstvu prítomnej dsDNA. Táto metóda je vysoko citlivá a umožňuje presnú kvantifikáciu DNA vo vzorkách s nízkymi koncentráciami, avšak neposkytuje informácie o veľkosti alebo celistvosti fragmentov DNA. Výsledky merania môžu byť významne ovplyvnené prítomnosťou nadbytku RNA, ktorá nešpecificky viaže fluorescenčné farbivá. Táto skutočnosť je podceňovaná, mylne interpretovaná alebo ignorovaná v publikáciách, ktoré deklarujú nadlimitné množstvá zvyškovej DNA v mRNA vakcínach (*Kämmerer et al, Science, Public Health Policy, and the Law, 2024, Speicher et al, preprint, 2023, König and Kirchner. Methods Protoc, 2024, König and Kirchner, Methods Protoc preprint, not peer reviewed, 2024, and related Expression of Concern, Methods Protoc Editorial Office, 2025*). V záujme uskutočniť kvantifikáciu DNA v mRNA vakcínach technicky správne sme najprv demonštrovali nešpecifický signál pochádzajúci z nadbytku RNA pridaním definovanej RNA do vzorky meranej kitom určeným pre DNA. Na základe toho sme pri samotnej analýze vakcín mRNA dôkladne degradovali pomocou RNázy A. Okrem RNA môžu na špecifickosť DNA kvantifikácie pôsobiť aj iné látky, ktoré definuje výrobca v technickej dokumentácii (*Qubit 1x dsDNA HS Assay Kit*).

Hlavné faktory, ktoré významne ovplyvňujú technickú realizáciu kvantifikácie DNA pomocou Qubit fluorometrie:

- Prítomnosť nadbytku RNA – vo vakcíne sa nachádza až vyše 3000-násobné množstvo mRNA v porovnaní so zvyškovou DNA (pričom podľa výrobcu je pre korektnú kvantifikáciu DNA akceptovateľná prímies RNA v pomere 1:1 k DNA)
- Nedostatočné rozvoľnenie a odstránenie lipidových nanočastíc (LNP) detergentmi
- Rešpektovanie rozsahu citlivosti fluorometrickej detekcie DNA a akceptovateľných množstiev prímies (soli, detergenty, RNA)

Nevyhnutným predpokladom spoľahlivého kvantitatívneho stanovenia zvyškovej DNA v mRNA vakcínach pomocou fluorometrických prístupov je extrakcia DNA, ktorá umožňuje minimalizovať prítomnosť zložiek vakcíny interferujúcich s meraním (napr. lipidov, solí, mRNA) a zároveň získať vzorku obohatenú o DNA v menšom objeme tak, aby jej koncentrácia bola v limite citlivosti metódy.

Na zabezpečenie spoľahlivosti a robustnosti výsledkov DNA kvantifikácie sme zvyškovú DNA izolovali dvomi rôznymi spôsobmi (viď nižšie), pričom z každej šarže sme použili tri biologické replikáty (t. j. 3 ampulky z každej šarže) a dva technické replikáty (t. j. fluorometrické merania).

OPIS POSTUPOV:

A. Izolácia DNA pomocou extrakcie fenolom-chloroformom-izoamylalkoholom (PCI extrakcia)

Extrakcia celkových nukleových kyselín zmesou fenol-chloroform-izoamylalkohol umožňuje účinné oddelenie nukleových kyselín od proteínov, lipidov a iných zložiek vakcinačnej matrice. Vakcíny sme najprv opracovali neiónovým detergentom (Triton X-100), ktorý zabezpečil rozrušenie lipidových obalov a uvoľnenie enkapsulovaných nukleových kyselín z lipidových nanočastíc. Následná organická extrakcia zmesou fenol-chloroform-izoamylalkohol zabezpečila separáciu fáz, pričom vodná fáza

obsahovala rozpustné nukleové kyseliny. Sekundárna extrakcia chloroformom zabezpečila odstránenie zvyškov organických kontaminantov. Pre docielenie špecifickej detekcie DNA boli vzorky opracované RNázou A, čím sa minimalizovala prítomná mRNA. Finálny krok, etanolová precipitácia v prítomnosti octanu sodného a glykogénu, umožnil kvantitatívne vyvrážanie nukleových kyselín a ich koncentrovanie do malého objemu pre následné analytické použitie. Tento spôsob extrakcie DNA za účelom jej kvantifikácie vo finálnych produktoch mRNA vakcín bol použitý v práci autorov *Kaiser et al.*, (*Vaccine*, 2025).

Na izoláciu nukleových kyselín touto metódou bolo k 300 µl vzorky vakcíny pridaných 30 µl 10 % Tritonu X-100 (finálna koncentrácia 1 %, v/v). Po 10-minútovej inkubácii pri laboratórnej teplote na rotačnom miešadle sa k vzorke pridal rovnaký objem (330 µl) zmesi fenol:chloroform:izoamylalkohol (25:24:1, pH ~8). Po intenzívnom premiešaní na vortexe (60 sekúnd) nasledovala 2-minútová inkubácia pri izbovej teplote a následná centrifugácia pri 4 °C, 16 000 × g po dobu 10 minút.

Vrchná (vodná) fáza (~300 µl) bola opatrne prenesená do novej sterilnej mikroskúmavky, do ktorej sa následne pridalo rovnaké množstvo čistého chloroformu (300 µl). Po krátkom premiešaní (5 sekúnd) a centrifugácii (5 minút, 4 °C, 16 000 × g) sa opäť odobrala vrchná fáza (~300 µl), ktorá predstavovala purifikovaný extrakt celkových nukleových kyselín.

Za účelom minimalizácie prítomnej mRNA bola do vzorky pridaná RNáza A (9 µl; 10 mg/ml), čím sa dosiahla konečná koncentrácia 0,3 µg/µl. Vzorka bola inkubovaná 2 hodiny pri 37 °C vo vodnom kúpeli a následne rýchlo schladená na ľade.

Pre vyvrážanie nukleových kyselín sa do vzorky pridala 1/10 objemu 3M octanu sodného (pH 5,2), t. j. 31,8 µl, a 1,59 µl glykogénu (20 mg/ml; finálna koncentrácia 100 ng/µl). Po premiešaní bol do zmesi pridaný 2,5-násobný objem predchladeného 100 % etanolu (832 µl). Vzorka bola premiešaná niekoľkonásobným prevrátením a inkubovaná 1 hodinu pri -80 °C.

Po ukončení inkubácie nasledovala centrifugácia (15 minút, 4 °C, 16 000 × g), po ktorej sa supernatant odstránil a sedimentovaný pelet premyl s 500 µl 70 % etanolu. Po premytí a dôkladnom odstránení zvyškového etanolu bola skúmavka ponechaná otvorená pri laboratórnej teplote 5–10 minút, aby sa pelet dosušil. Ten bol následne rozpustený v 30 µl beznukleázovej ultračistej vody.

B. Izolácia DNA pomocou magnetických guľôčok

Komerčná súprava MAGicBead™ cfDNA Isolation Kit od výrobcu Zymo Research je určená na izoláciu voľnej cirkulujúcej DNA v biologických tekutinách (napr. krvná plazma, sliny, moč a iné). Izolácia DNA touto metódou je založená na princípe selektívnej väzby nukleových kyselín na povrch magnetických častíc v prítomnosti chaotropných solí. Výhodou je jednoduchý extrakčný proces s minimálnym počtom úkonov a nevyžaduje sa krok precipitácie DNA. Vyizolovaná DNA neobsahuje enzymatické inhibítory, ktoré by mohli interferovať s PCR alebo inými citlivými aplikáciami.

Keďže sa DNA vo vakcínach môže vyskytovať len vo veľmi nízkych koncentráciách a jej kvantifikácia môže byť výrazne ovplyvnená prítomnosťou veľkého množstva mRNA, bolo nevyhnutné pred samotnou izoláciou odstrániť dominantnú mRNA zložku. Vzorka vakcíny bola preto najprv ošetrovaná neiónovým detergentom (Triton X-100), ktorý narušil lipidové nanočastice a umožnil uvoľnenie enkapsulovanej mRNA. Tá bola následne cielene degradovaná RNázou A, čím sa nielen znížil pomer RNA k DNA, ale zároveň sa minimalizovalo riziko nešpecifickej väzby RNA na magnetické častice počas purifikácie. V ďalšom kroku, ktorý už zodpovedá protokolu súpravy, bola vzorka inkubovaná s proteínázou K, čím sa zabezpečila denaturácia prítomných proteínov (v tomto prípade degradácia RNázy A z predchádzajúceho opracovania). Po pridaní väzobného pufru sa DNA selektívne naviazala na povrch magnetických častíc, zatiaľ čo neviazané zložky boli odstránené sériou premývacích krokov. Finálna elúcia v malom objeme elučného pufru poskytla čistú, zakoncentrovanú DNA vhodnú na následné molekulárno-biologické analýzy.

Na izoláciu DNA touto metódou bolo použitých 200 µl vakcíny, ktoré boli prenesené do sterilnej 1,5 ml mikroskúmavky. Vzorka bola najprv opracovaná 1 % Tritonom X-100 za účelom rozrušenia lipidových

nanočastíc a uvoľnenia enkapsulovaných nukleových kyselín. Následne bola podrobená enzymatickej degradácii mRNA pridaním RNázy A (konečná koncentrácia 0,3 µg/µl) a inkubáciou po dobu 2 hodín pri 37 °C vo vodnom kúpeli.

Ďalší postup prebiehal v súlade s odporúčaním výrobcu súpravy. K upravenej vzorke bolo pridaných 50 µl štiepneho pufra (digestion buffer) a 8 µl proteínázy K. Po krátkom premiešaní na vortexe nasledovala dvojstupňová inkubácia – najskôr 15 minút pri 55 °C, potom 15 minút pri 37 °C. Následne sa do vzorky pridalo 50 µl väzobného roztoku (binding buffer), s ktorým bola vzorka intenzívne premiešaná.

Magnetické častice na zachytenie cfDNA boli pred použitím dôkladne resuspendované na vortexe, aby sa zabránilo ich agregácii a zabezpečila sa homogénna distribúcia. Do každej vzorky sa následne pridalo 10 µl suspenzie častíc, vzorka sa krátko premiešala na vortexe (5 sekúnd) a následne inkubovala pri laboratórnej teplote počas 5 minút na rotačnom miešadle. V tomto kroku dochádzalo k naviazaniu DNA na povrch magnetických častíc.

Po inkubácii bola skúmavka umiestnená na magnetický stojan, ktorý umožnil rýchlu separáciu častíc od zvyšku roztoku. Supernatant bol opatrne odstránený a k peletu častíc sa pridalo 800 µl premývacieho roztoku. Suspenzia bola niekoľkokrát premiešaná pomocou pipety a opätovne umiestnená na magnetický stojan na separáciu. Premývací krok sa zopakoval ešte dvakrát s použitím 300 µl premývacieho roztoku v každom cykle.

Po poslednom premytí boli magnetické častice zbavené zvyškového roztoku a do skúmavky sa pridalo 20 µl elučného pufra (elution buffer). Častice boli jemne premiešané pipetou a vzorka bola inkubovaná 1 minútu pri laboratórnej teplote. Následne bola skúmavka opäť umiestnená na magnetický stojan a číry eluát 20 µl (obsahujúci izolovanú DNA) bol pipetou prenesený do novej sterilnej mikroskúmavky.

C. Príprava vzoriek a Qubit fluorometria

Na stanovenie koncentrácie nukleových kyselín (DNA aj RNA) vo vakcínach a extraktoch z vakcín bol použitý fluorometer Qubit Flex (Invitrogen), v kombinácii s k nemu určenými detekčnými súpravami a jednorazovými plastovými skúmavkami Qubit Flex Assay Tube Strips.

Na kvantifikáciu DNA bola použitá súprava Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit, určená na vysoko citlivú detekciu dvojvláknovej DNA v rozsahu koncentrácií 0,01–100 ng/µl. Na kvantifikáciu mRNA vo vakcínach bola použitá súprava Qubit™ RNA BR Assay Kit, s rozsahom 0,5–1200 ng/µl.

Meranie bolo realizované v súlade s pokynmi výrobcu. Pre každý kit bol prístroj kalibrovaný pomocou štandardov dodávaných v jednotlivých súpravách – a to zmiešaním 10 µl kalibračného štandardu a 190 µl pracovného roztoku (working solution). Kalibračné roztoky boli pripravované pre všetkých 8 pozícií súčasne, aby sa zabezpečila konzistentnosť merania.

Príprava pracovného roztoku a rozdiely medzi súpravami:

- V prípade súpravy Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit bol pracovný roztok pripravený výrobcom už ako hotová zmes obsahujúca interkalačné farbivo, a preto sa mohol bez ďalších príprav priamo miešať so vzorkou.
- Súpravu Qubit RNA BR Assay Kit dodával výrobca vo forme samostatných zložiek: reakčný pufor (RNA BR Buffer) a interkalačné farbivo (Qubit RNA BR Reagent). Pracovný roztok sa preto musel pred použitím čerstvo pripraviť zmiešaním reakčného pufra s farbivom v pomere 1 µl farbiva na jednu reakciu (t. j. 1 µl farbičky na každých 200 µl finálneho objemu roztoku). Miešanie prebiehalo v sterilnej 15 ml plastovej skúmavke.

Meranie vzoriek:

Na kvantifikáciu bola každá vzorka pripravená zmiešaním 2–20 µl vzorky (extrakty 4 µl, čisté vakcíny 10 µl) s pracovným roztokom tak, aby výsledný objem reakčnej zmesi bol 200 µl. Použitý objem vzorky bol určený empiricky – na základe očakávanej koncentrácie nukleových kyselín a dostupnosti vzorky s ohľadom na potrebu jej ďalších analýz. Po dôkladnom premiešaní vzorky na vortexe nasledovala 2-minútová inkubácia v tme a následné meranie na prístroji.

Pred samotným meraním bol do fluorometra zadaný použitý objem vzorky, čo umožnilo automatický výpočet koncentrácie nukleových kyselín vo finálnych jednotkách ng/μl. V prípadoch, keď sa výsledná hodnota nachádzala mimo detekčného rozsahu, bolo meranie zopakované s adekvátne upraveným objemom vzorky, aby výsledná koncentrácia spadala do kalibračného rozsahu použitej metódy.

Prepočet koncentrácie nukleových kyselín na celkové množstvo DNA/RNA v dávke:

Pre výpočet celkového množstva DNA/mRNA v dávke vakcíny v ng/μg boli namerané hodnoty koncentrácie v ng/μl prenasobené príslušným koeficientom:

- V prípade DNA izolovanej PCI extrakciou, ktorá bola vo finálnej elúcii 10-násobne zahustená, bola nameraná koncentrácia násobená koeficientom x30 (Comirnaty), alebo x50 (Spikevax), čo zodpovedá objemu dávky 300 μl, resp. 500 μl.
- V prípade DNA izolovanej magnetickými časticami, ktorá bola vo finálnej elúcii 10-násobne zahustená, bol pri výpočte zohľadnený objem Tritonu X-100 a RNázy A, pridaný do vakcíny pred odobratím východiskového objemu do izolácie. Namerané koncentrácie tak boli násobené koeficientom x33,9 (Comirnaty), alebo x56,5 (Spikevax), čo zodpovedá objemu dávky 300 μl, resp. 500 μl.
- V prípade priamej analýzy vakcín Comirnaty a Spikevax bol pri výpočte zohľadnený objem Tritonu X-100 pridaného za účelom uvoľnenia enkapsulovanej mRNA z lipidových nanočastíc pred samotnou kvantifikáciou. Namerané koncentrácie (x ng/ 1 ul) tak boli násobené koeficientom x315 (Comirnaty), alebo x525 (Spikevax).

VALIDÁCIA POSTUPOV:

Na dôkaz nešpecifického signálu pochádzajúceho z RNA sme rôzne množstvá komerčného RNA vlákna (RNA Control Strand, Oxford Nanopore Technologies) kvantifikovali Qubit fluometriou použitím súpravy 1x dsDNA HS Assay Kit, určenej na kvantifikáciu dvojvláknovej DNA.

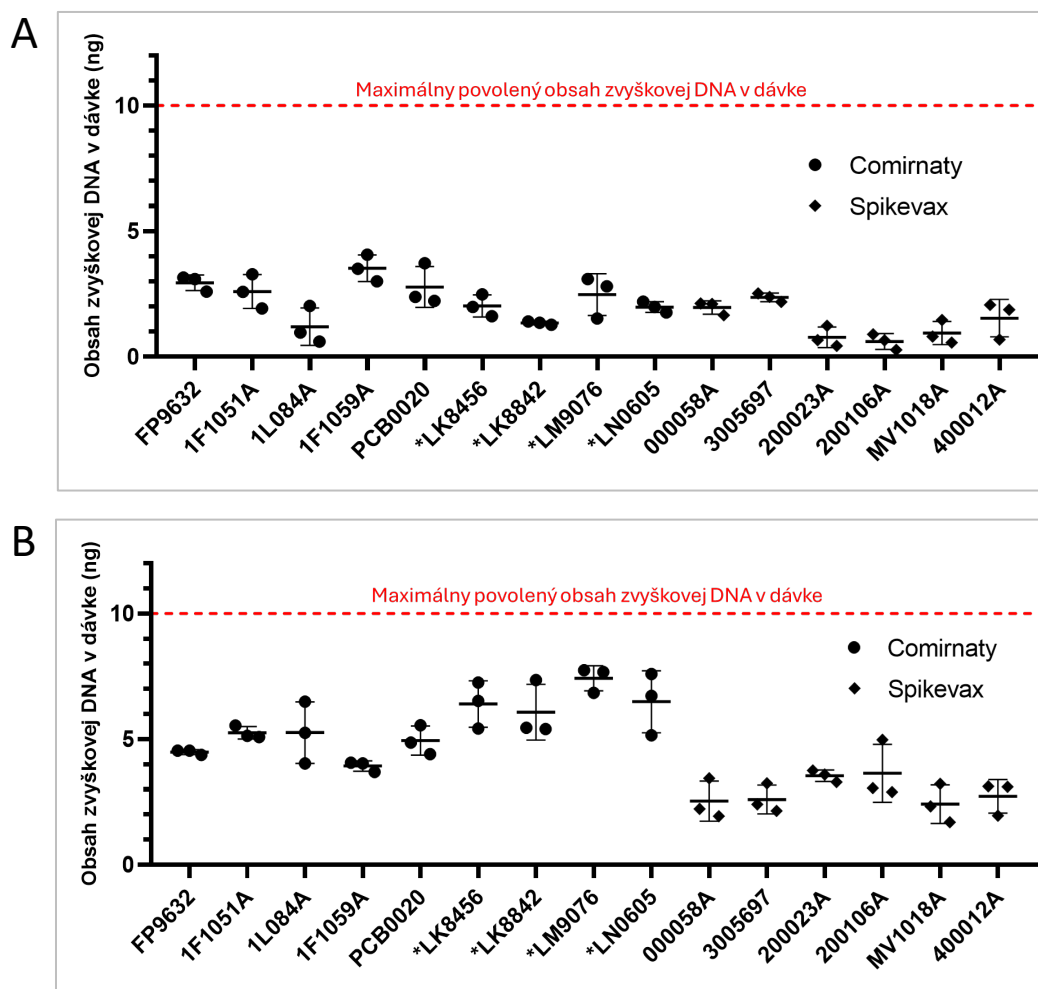
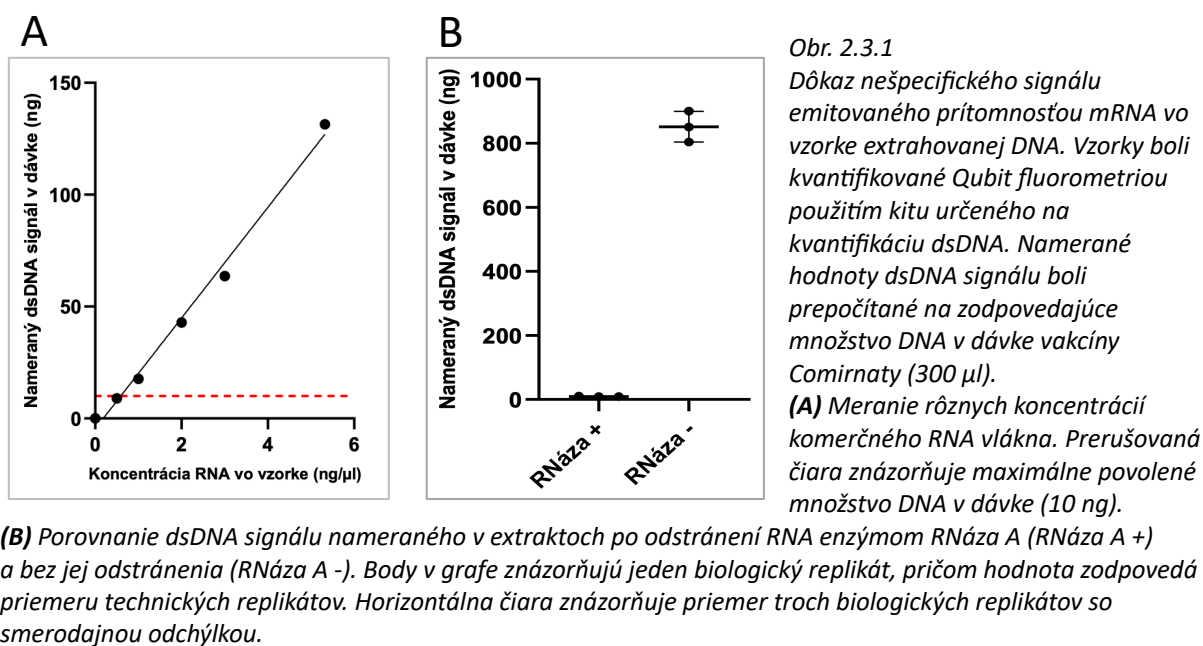
Výsledky merania ukázali, že aj nízke koncentrácie RNA skutočne emitujú značný fluorescenčný signál zodpovedajúci stotinám až desatinám nanogramu DNA v 1 μl vzorky. Hoci sa toto nadhodnotenie môže javiť ako zanedbateľné pri bežných aplikáciách, v prípade analýzy mRNA vakcín môže byť jeho vplyv významný. Je to predovšetkým v prípade, keď sa nameraná koncentrácia prepočítava na jednu dávku vakcíny – násobením nízkych hodnôt z fluorometra sa aj na prvý pohľad drobné oscilácie môžu premietnuť do významného rozdielu kvantity DNA v dávke (Obr. 2.3.1 A).

Analyzovali sme aj vplyv opracovania PCI extraktu vakcíny RNázou A na kvantifikáciu DNA pomocou Qubit fluorometrie. Výsledok potvrdzuje vysoký nešpecifický signál pochádzajúci z veľkého nadbytku RNA, ktorý môže viesť k nesprávnej interpretácii množstva zvyškovej plazmidovej DNA (Obr. 2.3.1 B).

VÝSLEDKY:

Na základe validácie sme vo všetkých prípadoch izoláty dôkladne opracovali RNázou A, aby sme minimalizovali interferenciu signálu spôsobenú prítomnosťou mRNA vo vakcíne.

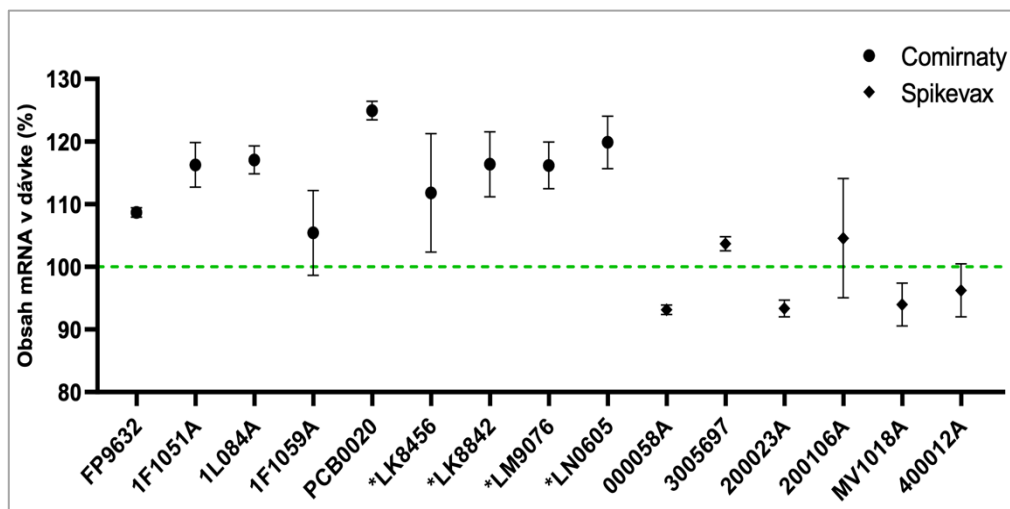
Výsledky DNA kvantifikácie pomocou Qubit 1x dsDNA HS assay vo všetkých analyzovaných šaržiach vakcín sú zobrazené podľa metód izolácie na Obr. 2.3.2.



Obr. 2.3.2

Súhrn výsledkov DNA kvantifikácie vo všetkých analyzovaných šaržiach vakcín pomocou Qubit fluorometrie s použitím súpravy Qubit 1x dsDNA HS Assay Kit. DNA bola izolovaná dvomi rôznymi metódami: (A) extrakcia zmesou fenol-chloroform-izoamylalkohol), (B) izolácia magnetickými guľôčkami MAGicBeads (ZYMO). Červená prerušovaná čiara znázorňuje limit 10 ng na 1 dávku vakcíny. Body v grafe znázorňujú jeden biologický replikát, pričom hodnota zodpovedá priemeru technických replikátov. Horizontálna čiara znázorňuje priemer troch biologických replikátov so smerodajnou odchýlkou. *Neexspirované vakcíny.

Qubit fluorometriu sme použili aj na stanovenie množstva mRNA vo vakcínach. Tento prístup nevyžadoval žiadnu extrakciu, ale vakcíny boli pred meraním opracované 0,5 % Tritonom X-100. Množstvo mRNA sme určili pomocou kitu určeného na tento účel priamo vo vzorkách vakcín. Výsledky merania sú znázornené na Obr. 2.3.3.



Obr.2.3.3

Kvantifikácia množstva mRNA v dávke pre všetky analyzované šarže vakcín pomocou Qubit fluorometrie s použitím súpravy Qubit RNA BR Assay Kit. Body v grafe zázorňujú priemer technických replikátov so štandardnou odchýlkou. Zelená prerušovaná čiara znázorňuje výrobcom deklarovaný obsah mRNA v dávke pre dané vakcíny v grafe. *Neexspirované vakcíny.

ZÁVER:

DNA kvantifikácia pomocou Qubit fluorometrie ukázala, že žiadna analyzovaná šarža mRNA vakcín neobsahuje nadlimitné množstvo zvyškovej DNA. Všetky šarže sú v súlade s požiadavkami regulačných autorít (*Australian Government, TGA, 2024, 2025, Milne et al, NPJ Vaccines 2023, Paul-Ehrlich-Institut 2023*).

RNA kvantifikácia ukázala, že množstvo mRNA vo vakcínach Comirnaty je minimálne na úrovni uvádzanej výrobcom. Pri vakcínach Spikevax štyri zo šiestich vakcín vykazovali mierne nižšie hodnoty, čo naznačuje ich čiastočnú degradáciu (*pozn. všetky vakcíny Spikevax boli dlhodobo po expirácii*).

Na základe toho môžeme skonštatovať, že podľa výsledkov flurometrickej analýzy sa pomer množstva zvyškovej DNA k množstvu mRNA v jednotlivých šaržach pohyboval v rozmedzí 1 : 6000 – 1 : 30 000. Pri takomto vysokom nadbytku mRNA je mimoriadne dôležité dôsledne dbať na minimalizáciu interferencie mRNA pri meraní kvantity DNA. Táto požiadavka vyplýva z faktu, že fluorescenčná značka určená na detekciu DNA sa pri veľkom nadbytku viaže aj na mRNA a emituje nešpecifický fluorescenčný signál, čo vedie k nadhodnoteniu nameraných hodnôt pre DNA. Výrobcovia fluorometrických súprav na kvantifikáciu DNA síce deklarujú vysokú selektivitu fluorescenčných značiek pre dsDNA a minimálnu interferenciu RNA, ale iba pri pomeroch DNA ku RNA 1:1 a 10:100. V prípade mRNA vakcín je však tento pomer výrazne mimo rozsah deklarovanej validity.

Pri purifikácii zvyškovej DNA z vakcíny PCI precipitáciou alebo izoláciou magnetickými guľôčkami sa spolu s DNA do vzorky dostáva v nadbytku aj mRNA, ktorú je potrebné pred meraním degradovať pomocou enzýmu RNázy A, ako sme demonštrovali aj na Obr. 2.3.1B. Ignorovanie tohto kroku predstavuje zásadné metodologické pochybenie, ktoré je zrejmé v práci *Speicher et al., Preprint, 2023*, kde autori fluorometricky kvantifikovali DNA bez predchádzajúcej degradácie mRNA. Výsledkom boli hodnoty v rozsahu niekoľkých mikrogramov DNA na dávku, čo znamená niekoľko stonásobné prekročenie regulačných limitov, ktoré však nezodpovedá skutočnosti a vyvoláva neopodstatnené obavy. Podobný problém je možné vidieť aj v práci *König a Kirschner, Methods Protoc, 2024*, ktorí sa

vo svojich záveroch odvolávajú na vysokú selektivitu fluorometrických farbív, pričom úplne ignorujú extrémny pomer RNA:DNA v analyzovaných vakcínach. Takéto interpretácie sú zavádzajúce, pretože nezohľadňujú základný princíp interferencie pri nevalidovaných podmienkach a vedú k alarmistickým záverom bez reálneho vedeckého opodstatnenia.

Naše validačné experimenty jednoznačne preukázali, že zvyšujúca sa koncentrácia RNA lineárne nadhodnocuje výsledky meraní dsDNA už od relatívne nízkych hladín RNA (Obr. 2.3.1). Hoci sa tento efekt môže zdať zanedbateľný v bežných aplikáciách, pri stanovení reziduálnej DNA v mRNA vakcínach predstavuje zásadný problém. Význam týchto opatrení dokazuje aj analýza práce *Kämmerer et al, Science, Public Health Policy, and the Law, 2024*, kde síce autori degradovali mRNA pomocou RNázy A, avšak vo svojej metodike neuviedli kontrolu zvyškovej RNA po degradácii. To vyvoláva otázky o účinnosti tohto kroku, najmä vzhľadom na vysoké množstvá mRNA vo vakcíne a potrebu optimalizácie enzymatického protokolu. Navyše, autori vzorky pred meraním 10-násobne nariedili, čím ešte zvýšili citlivosť výsledku na malé meracie chyby. Aj napriek tomu boli namerané hodnoty DNA v dávke výrazne nižšie než v prácach, kde sa mRNA enzymaticky nedegradovala, čo nepriamo potvrdzuje našu tézu, že prítomnosť mRNA dramaticky nadhodnocuje merania.

V našej štúdii sme tento problém riešili podobne ako *Kaiser et al, Vaccine, 2025*, kombináciou dôkladnej degradácie mRNA a 10-násobného zahustenia extraktu DNA. Tým sa nielen minimalizoval interferenčný efekt, ale aj znížil násobiaci faktor pri výpočte DNA v dávke. Pre ilustráciu: ak 1 ng/μl mRNA spôsobí nadhodnotenie dsDNA o 0,05 ng/μl, potom pri nezahustenej vakcíne (koeficient x300) ide o nadhodnotenie o 15 ng, zatiaľ čo po zahustení (koeficient x30) len o 1,5 ng. Pri limitnej hodnote 10 ng na dávku je tento rozdiel kritický.

Záverom možno konštatovať, že fluorometria môže byť pri dodržaní prísnych opatrení (enzymatická degradácia mRNA, extrakcia a zahustenie DNA) použitá ako spoľahlivá doplnková metóda, ktorá poskytuje výsledky porovnateľné so špecifickou qPCR. Nerešpektovanie týchto princípov však vedie k zásadne skresleným dátam a chybným interpretáciám, čo je jadrom metodologických nedostatkov uvedených v nekvalitných publikáciách.

2.4 ANALÝZA INTEGRITY ZVÝŠKOVEJ DNA A mRNA POMOCOU KAPILÁRNEJ ELEKTROFORÉZY

PRINCÍP METÓDY:

Kapilárna elektroforéza umožňuje separáciu fragmentov RNA alebo DNA, pričom dokáže určiť distribúciu veľkostí fragmentov, čo je dôležité pri posudzovaní množstva a potenciálnej biologickej aktivity analyzovaných nukleových kyselín. Táto metóda si vyžaduje špecializované vybavenie, správnu technickú realizáciu (*Agilent, Applications, 2022, 2023, Agilent, Technical Overview, 2025*) a odborné znalosti, ktoré sú dôležité pre správnu interpretáciu výsledkov. V našich analýzach sme použili Fragment Analyzer System 5200, v skratke FA5200 (Agilent).

OPIS POSTUPU:

Fragmentová analýza nukleových kyselín kapilárnou elektroforézou bola vykonávaná na prístroji Agilent Fragment Analyzer 5200 s použitím prislúchajúcich súprav dodávaných výrobcom prístroja. V závislosti od zámeru experimentov boli použité nasledujúce súbory:

- Agilent DNF-464 HS Large Fragment 50 kb Kit
Súprava je určená na vysoko citlivú analýzu fragmentov DNA v koncentračnom rozsahu 5 pg/μl – 600 pg/μl (50 pg/μl – 5 ng/μl na vzorku) a veľkosti 75 – 48 500 bp. Bola použitá na analýzu zvyškovej DNA vo vakcínach po enzymatickej degradácii mRNA RNázou A.
- Agilent DNF-930 dsDNA 930 Reagent Kit (75 – 20000 bp)
Súprava je určená na analýzu fragmentov DNA o veľkosti 75 – 20000 bp v rozšírenom rozsahu koncentrácií (0,5 ng/μl – 50 ng/μl). Bola použitá na analýzu zvyškovej DNA vo vakcínach po enzymatickej degradácii mRNA RNázou A a na vizuálnu demonštráciu príkladu nadlimitného množstva DNA v analyzovanej vzorke.
- Agilent DNF-471 (15nt) RNA Kit – Total RNA
Súprava je určená na analýzu celkovej RNA v koncentračnom rozsahu 5 ng/μl – 500 ng/μl a veľkosti fragmentov od 200 do 6000 nukleotidov. Bola použitá na analýzu integrity mRNA vo vakcínach.

Príprava prístroja

Pred začiatkom analýzy bol prístroj pripravený podľa štandardných postupov predpísaných výrobcom:

- Ekvilibrácia výrobcom dodávaných roztokov a reagentov na laboratórnu teplotu
- Príprava a výmena/doplnenie prevádzkových roztokov (inlet buffer, storage buffer, conditioning solution) podľa predpísaných intervalov
- Vyprázdnenie zbernej odpadovej nádoby
- Príprava potrebného množstva separačného gélu určeného pre daný kit zmiešaním gélu a interkalačného farbiva (1 μl farbiva/1 ml gélu)

Analýza DNA pomocou súpravy DNF-464 HS Large Fragment DNA Kit

Analýza bola vykonávaná na kompatibilnej 96-jamkovej PCR platničke. Za účelom analýzy DNA boli vzorky vakcín inkubované pri laboratórnej teplote s 1 % Tritonom X-100 (10 minút) pre uvoľnenie mRNA z lipidových nanočastíc a následne bola k vzorkám pridaná RNáza A (konečná koncentrácia 0,3 μg/μl). Vzorky boli inkubované 2 hodiny vo vodnom kúpeli pri 37 °C, aby sa docielila enzymatická degradácia mRNA a minimalizoval sa tak jej signál pri vizualizácii DNA. Takto pripravené vzorky boli priamo v platničke zmiešané s riediacim roztokom (2 μl + 22 μl) obsahujúcim hraničné veľkostné markery (diluent marker). Do pozície 12 prvého analyzovaného riadka platničky bol pridaný molekulárny štandard veľkosti fragmentov (ladder) jeho zmiešaním s diluent markerom (2 μl + 22 μl). Do nepoužitých jamiek analyzovaného riadka platničky bolo pridaných 24 μl „slepého“ roztoku (blank solution), dodávaného spolu so súpravou. Obsah v jamkách so vzorkami bol dobre premiešaný

opakovaným pipetovaním, platnička bola prelepená krycou fóliou a krátko centrifugovaná, aby došlo k usadeniu vzoriek na dno jamiek a odstráneniu bublín. Fólia bola následne odstránená a platnička so vzorkami bola umiestnená do zásuvky č. 1. Premývací pufor (rinse buffer) bol podľa protokolu výrobcu umiestnený v samostatnej 96-jamkovej platničke (riadok A, 200 µl/jamka) do zásuvky M. Elektroforetická separácia bola zahájená spustením separačnej metódy DNF-464-33 – HS Large Fragment 50Kb.mthds. Výsledky analýzy boli vyhodnotené v softvéri ProSize Data Analysis Software.

Analýza DNA pomocou súpravy DNF-930 dsDNA 930 Reagent Kit (75-20000 bp)

Pracovný postup v prípade tejto súpravy bol identický ako v prípade kitov DNF-471 a DNF-464 s výnimkou niekoľkých modifikácií:

- Pri použití tohto kitu bola príprava vzorky závislá od očakávanej koncentrácie DNA. Ak bola koncentrácia < 10 ng/µl, vzorka bola riedená zmiešaním 4 µl vzorky s 20 µl 0,1× TE pufra. Ak bola koncentrácia > 10 ng/µl, zmiešali sa 2 µl vzorky s 22 µl TE pufra.
- Do nepoužitých jamiek platničky bol pridaný čistý 0,1× TE pufor, ktorý slúžil ako blank roztok
- Roztok obsahujúci hraničné veľkostné markery bol v tomto prípade pridaný namiesto rinse bufferu do platničky v zásuvke M (riadok A, 30 µl/jamka).

Elektroforetická separácia bola zahájená spustením separačnej metódy DNF-930-33 – dsDNA 75-20000bp.mthds. Výsledky analýzy boli vyhodnotené v softvéri ProSize Data Analysis Software.

Analýza integrity mRNA pomocou súpravy DNF-471 (15nt) RNA Kit

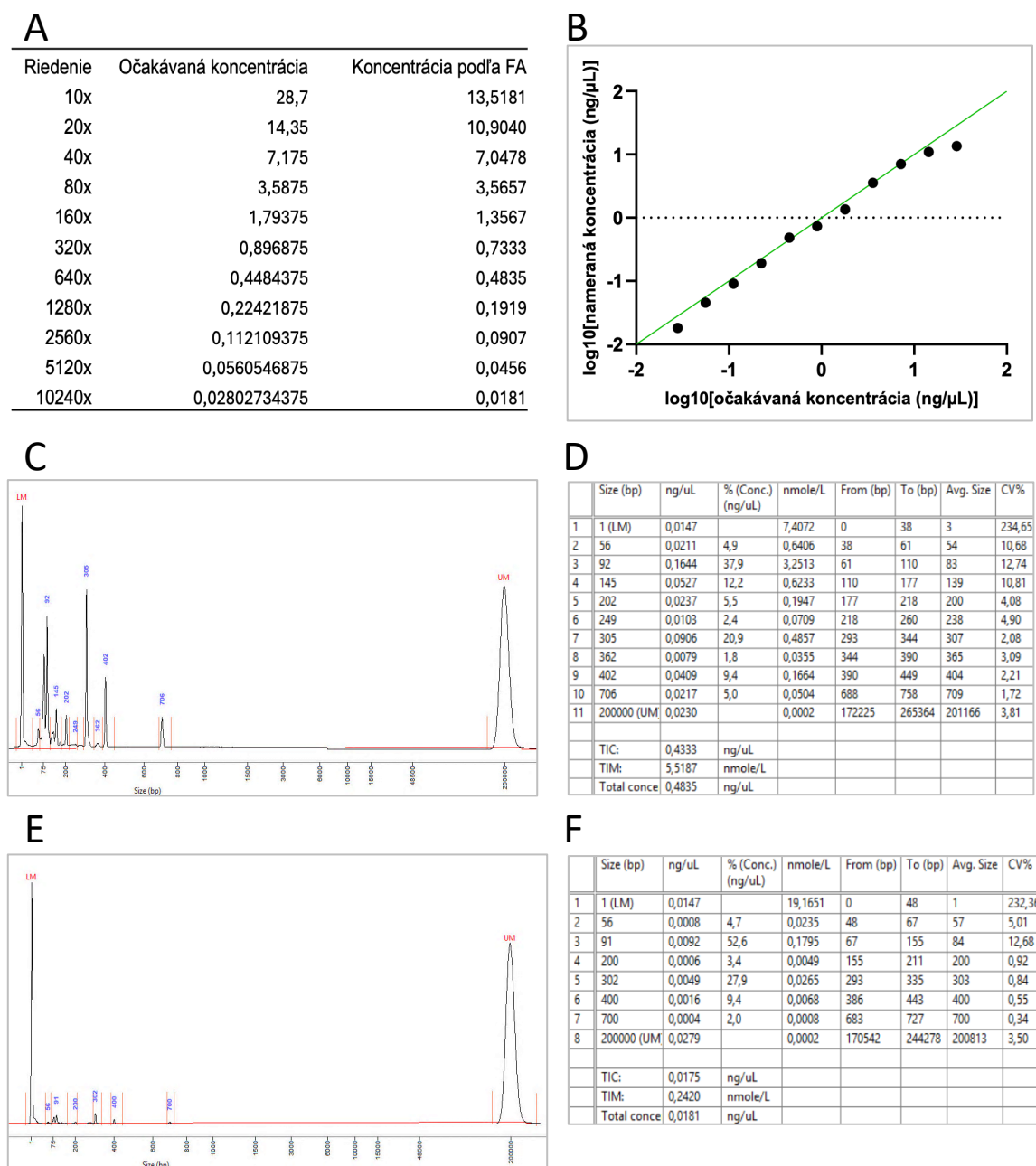
Vzorky vakcín určené na analýzu mRNA boli pred aplikáciou na platničku krátko zahriate na 70 °C počas 2 minút, čo podľa odporúčania výrobcu zabezpečuje dostatočné uvoľnenie mRNA z lipidových nanočastíc pre jej spoľahlivú vizualizáciu. Rovnakým spôsobom bol podľa inštrukcií výrobcu denaturovaný aj RNA ladder dodávaný spolu so súpravou. Po ochladení na ľade bola každá vzorka priamo v jamke platničky zmiešaná s diluent markerom (2 µl + 22 µl). Pracovný postup bol ďalej identický so súpravou DNF-464 HS Large Fragment DNA Kit. Proces elektroforetickej separácie bol zahájený spustením príslušnej separačnej metódy (DNF-471-33-SS Total RNA 15nt.mthds).

Výsledky analýzy boli vyhodnotené v softvéri ProSize Data Analysis Software. Integrita vakcíny bola stanovená ako percentuálny pomer špecifického vrcholu pre SPIKE mRNA voči celkovej koncentrácii RNA vo vzorke.

VALIDÁCIA POSTUPOV:

Pred samotnou analýzou sme presnosť kvantifikácie DNA na FA5200 testovali v sériových dvojkových riedeniach vzorky DNA markerov, GeneRuler Low Range DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), s použitím kitu DNF-464 HS Large Fragment 50kb Kit, ktorý má koncentračný rozsah 0,005-0,6 ng/µl pre DNA fragmenty a 0,05 – 5 ng/µl pre DNA smear (t.j. úplne degradovanú DNA), pričom deteguje DNA molekuly s veľkosťou 75 bp - 48 000 bp.

Koncentrácie stanovené pomocou kapilárnej elektroforézy sú blízke očakávaným hodnotám na základe sériových riedení východiskovej vzorky, ktorej koncentrácia bola určená fluorometricky (Qubit 1x dsDNA HS Assay Kit) (Obr. 2.4.1 A,B). Markery, ktoré boli najviac zastúpené, boli viditeľné aj v najvyššom riedení 10 240-krát, pričom určenie ich veľkosti na FA5200 bolo presné (Obr. 2.4.1 E,F). Metóda je teda svojou citlivosťou, rozsahom koncentrácií, ako aj rozsahom veľkostí fragmentov vhodná na analýzu zvyškovej DNA v mRNA vakcínach proti COVID-19. Keďže sa jedná o metódu, ktorá využíva väzbu farbivky na nukleové kyseliny (DNA aj RNA), jej špecifickosť je aj podľa výrobcu ovplyvnená touto skutočnosťou.



Obr. 2.4.1

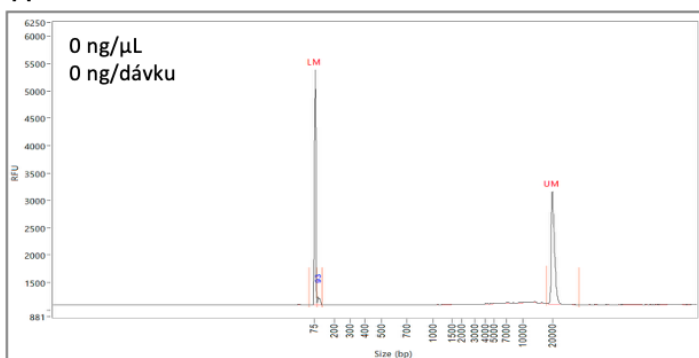
Kvantifikácia markerovej DNA metódou kapilárnej elektroforézy na zariadení FA5200 s použitím kitu DNF-464 HS Large Fragment 50kb Kit.

- (A) Zoznam riedení, očakávanej koncentrácie na základe sériového riedenia fluorometricky kvantifikovanej východiskovej vzorky a skutočnej nameranej koncentrácie.
- (B) Grafické provnanie očakávaných a skutočne nameraných hodnôt.
- (C) Denzitogram z fragmentačnej analýzy DNA vo vzorke riedenej 640-krát (LM – dolný marker označujúci 1 bp, UM – horný marker označujúci 20 000 bp).
- (D) Tabuľka s údajmi o množstve jednotlivých markerov v analyzovanom DNA ladderi riedenom 640-krát.
- (E) Denzitogram z fragmentačnej analýzy DNA vo vzorke riedenej 10 240-krát.
- (F) Tabuľka s údajmi o množstve jednotlivých markerov v analyzovanom DNA ladderi riedenom 10 240-krát.

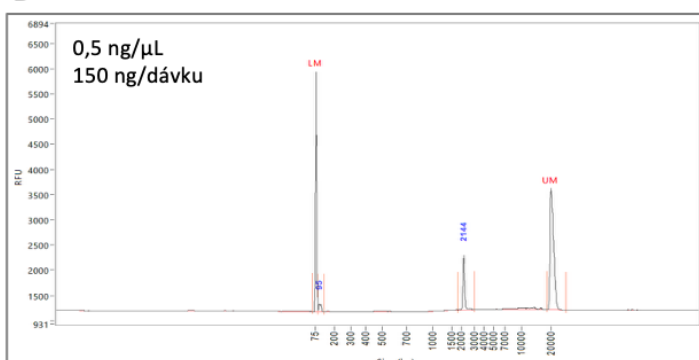
Metódu na detekciu DNA sme tiež otestovali pomocou pridania definovaného množstva DNA fragmentu s definovanou dĺžkou 2000 bp (kontrolný inzert z komerčnej súpravy In-Fusion HD Cloning Kit, Takara).

Ak by vakcína obsahovala také nadlimitné množstvá DNA, aké reportovali niektorí autori (*Speicher et al, Preprint, 2023*) na základe nesprávne uskutočnených meraní, tak by mali byť v denzitograme viditeľné vysoké vrcholy kriviek. Výsledky analýzy pomocou kapilárnej elektroforézy, ktorá je opísaná nižšie, však nič podobné neukazujú.

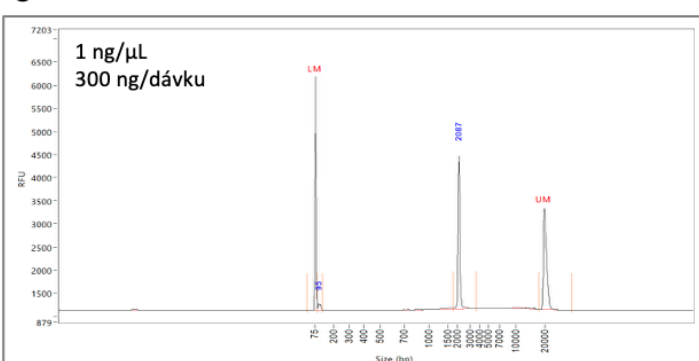
A



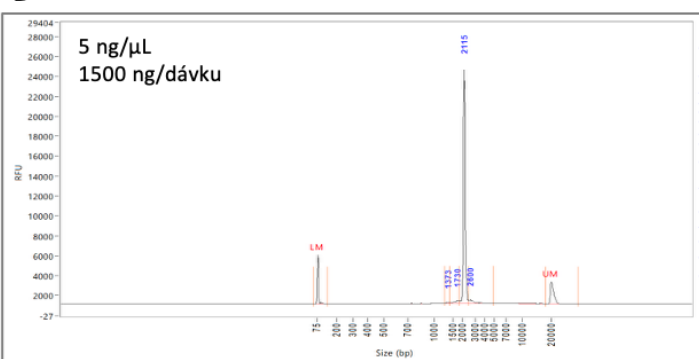
B



C



D

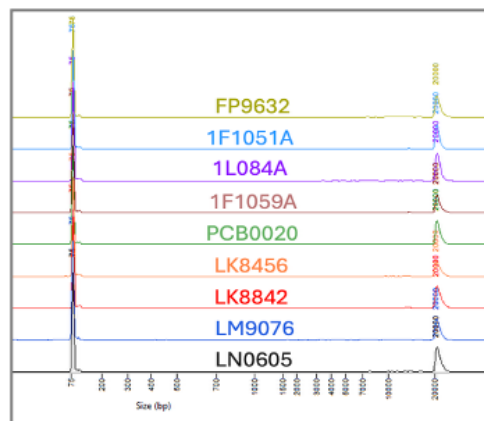
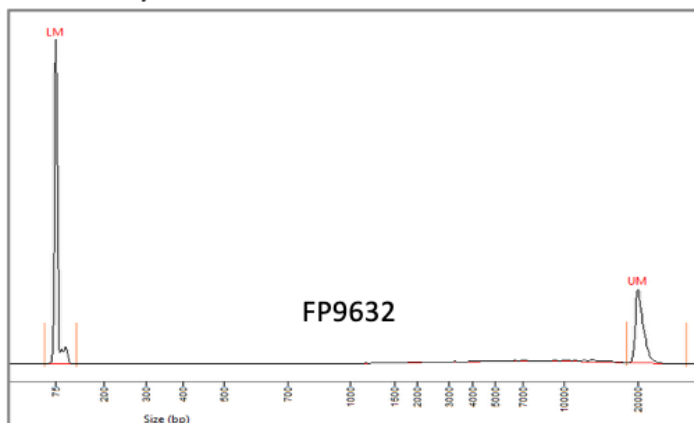
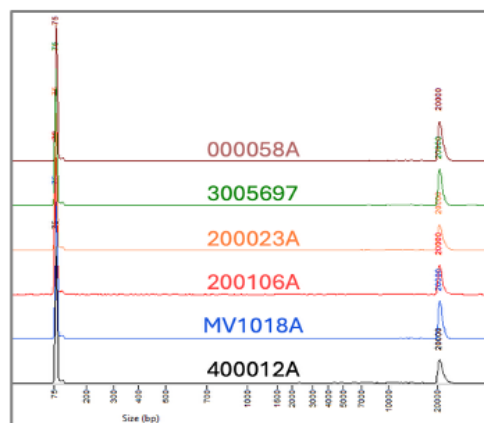
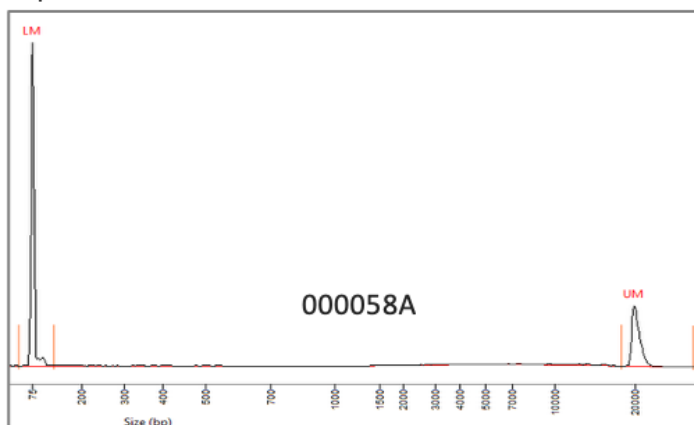


Obr. 2.4.2

Densitogramy kapilárnej elektroforézy externe pridanej DNA ku kontrolnej vzorke (Kit DNF-930 dsDNA 930 Reagent Kit). (A) Blank (t.j. prázdna kontrola) bez pridanej DNA – dva vrcholy signálu na začiatku (75 bp) a na konci (20 000 bp) zodpovedajú molekulárnym štandardom. (B-D) Vzorky s pridaným stúpajúcim množstvom externého DNA fragmentu. Signál je detegovaný v oblasti okolo 2100 bp a jeho výška zodpovedá množstvu pridanej DNA.

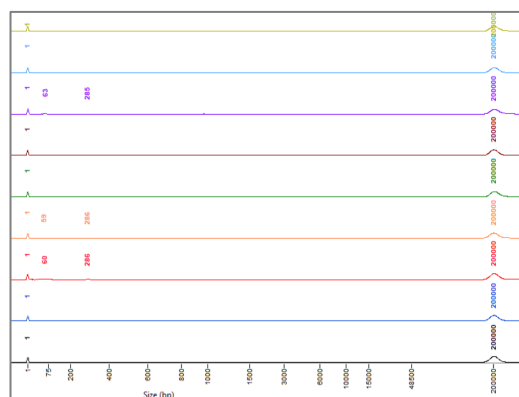
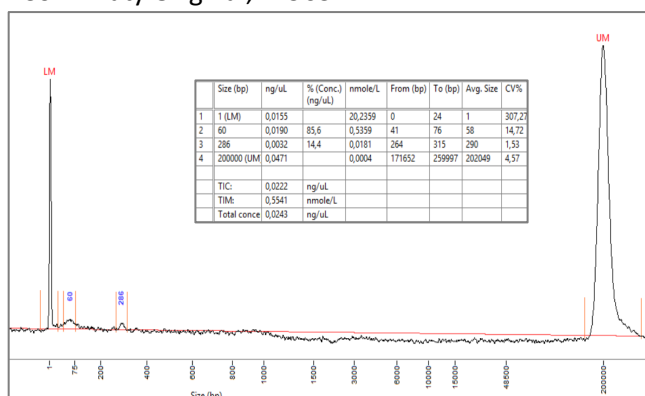
VÝSLEDKY ANALÝZY DNA:

Na základe validácie sme na analýzu použili vzorky vakcín priamo opracovaných RNázou A a Tritonom X-100. Výsledky analýzy pomocou kapilárnej elektroforézy zvyškovej DNA v jednotlivých šaržiach vakcín sú uvedené na Obr. 2.4.3 a 2.4.4.

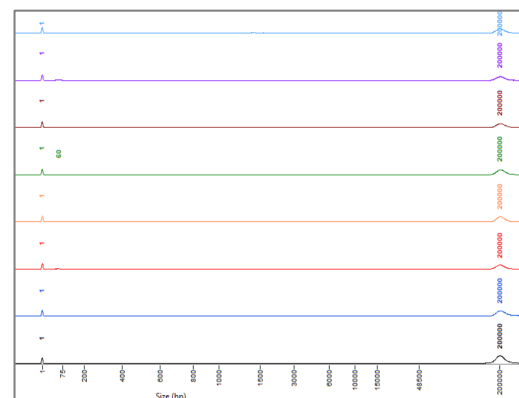
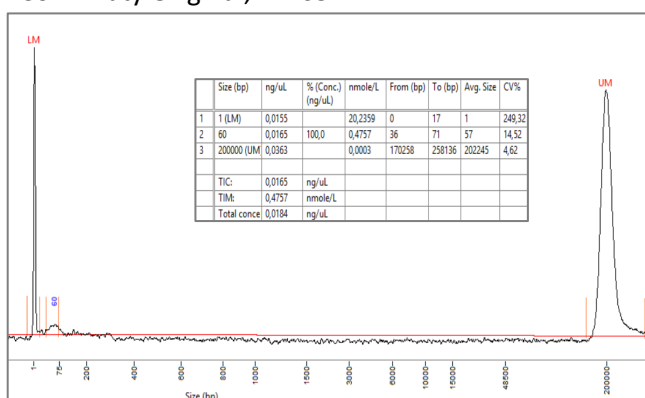
Comirnaty**Spikevax****Obr. 2.4.3**

Fragmentová analýza vakcín Comirnaty a Spikevax súpravou DNF-930 dsDNA 930 Reagent Kit. Vľavo je uvedený reprezentatívny denzitogram šarže FP9632 Comirnaty a šarže 000058A Spikevax, vpravo je porovnanie denzitogramov ďalších analyzovaných šarží. Všetky šarže vykazovali porovnateľný elektroforetický profil a v žiadnej z nich nebol zaznamenaný špecifický vrchol naznačujúci prítomnosť DNA v detekčnom rozsahu použitej súpravy. Miera výskytu nešpecifických signálov vo vakcínach bola totožná ako v prípade negatívnej kontroly (Obr. 2.4.2A), demonštrujúcej detekčné pozadie prístroja.

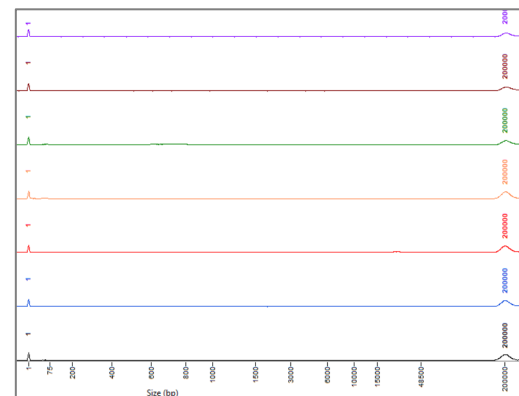
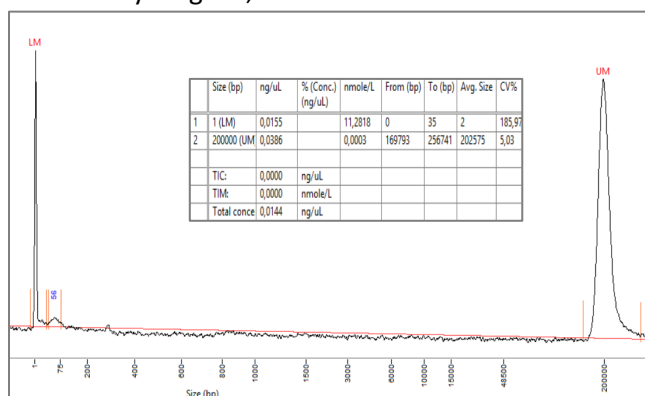
Comirnaty Original, FP9632



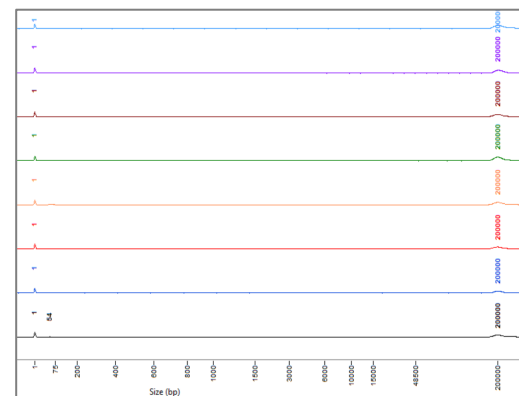
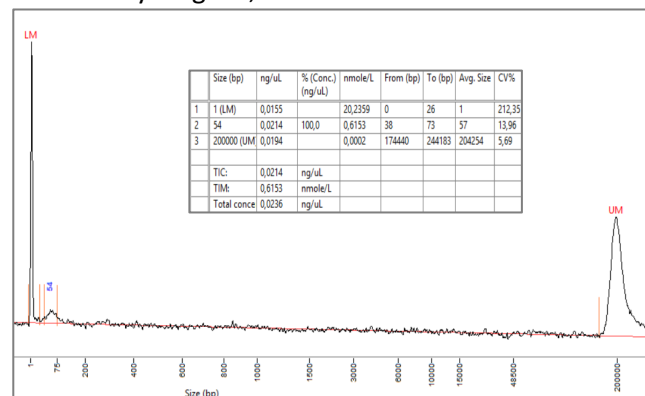
Comirnaty Original, 1F1051A



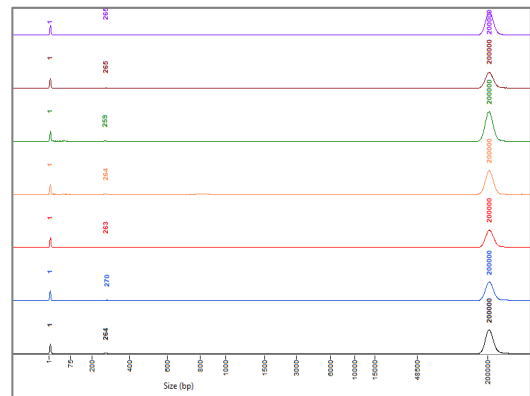
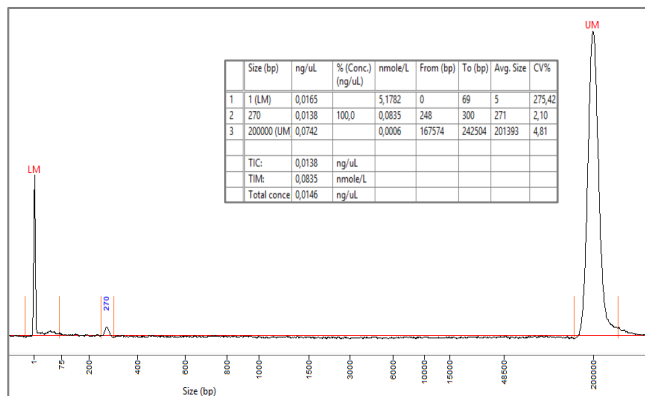
Comirnaty Original, 1L084A



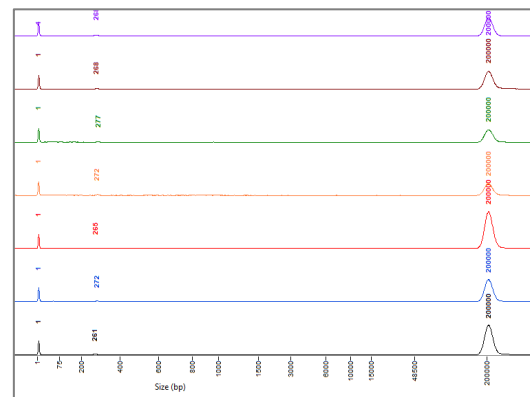
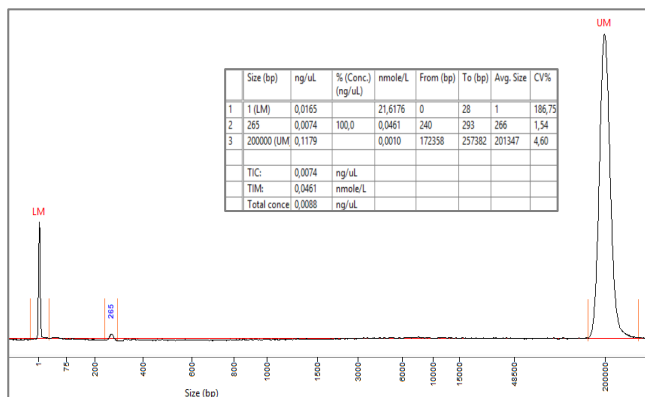
Comirnaty Original, 1F1059A



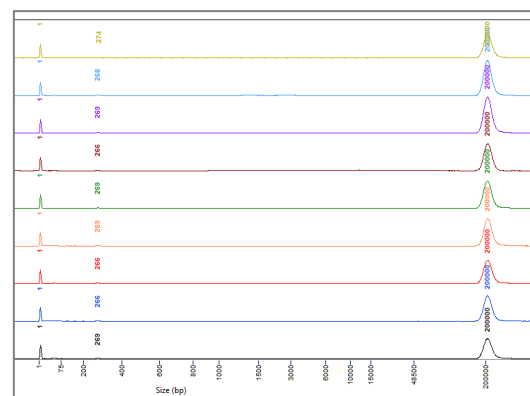
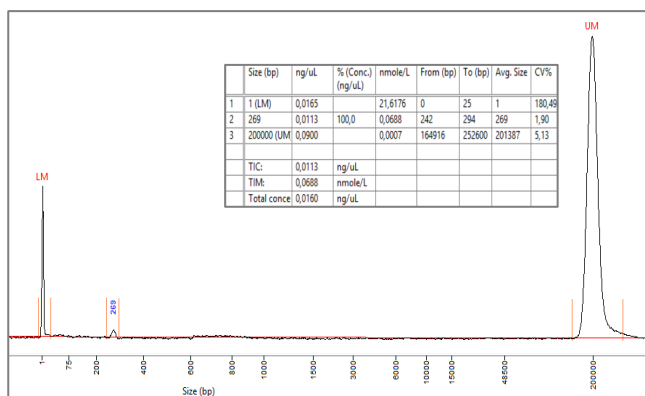
Comirnaty Omicron, LK8456



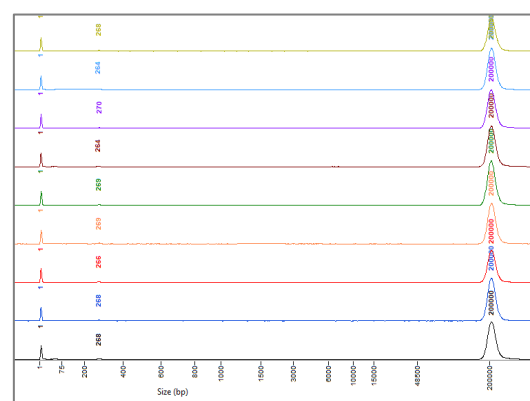
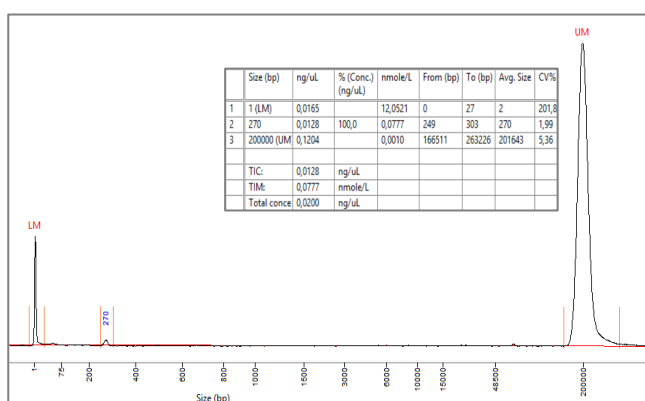
Comirnaty Omicron, LK8842



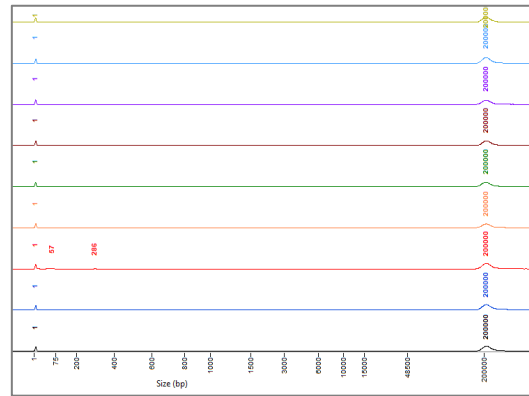
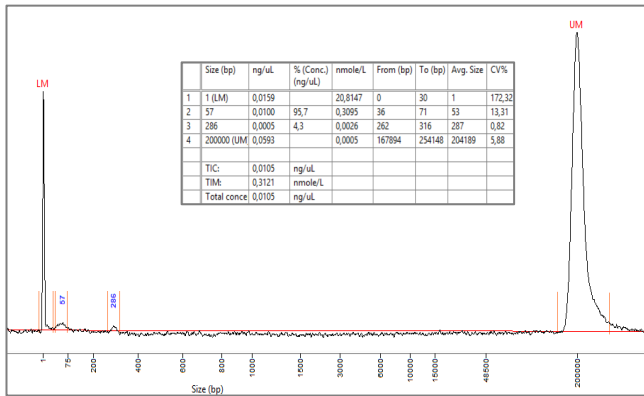
Comirnaty Omicron, LM9076



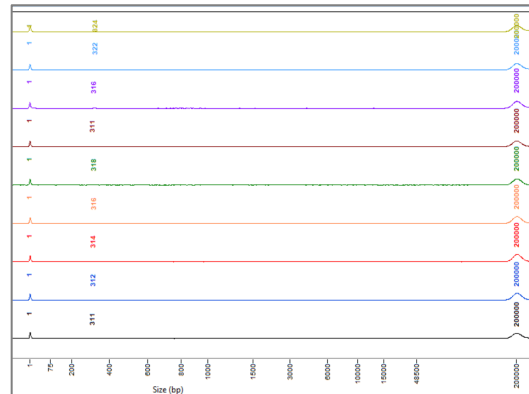
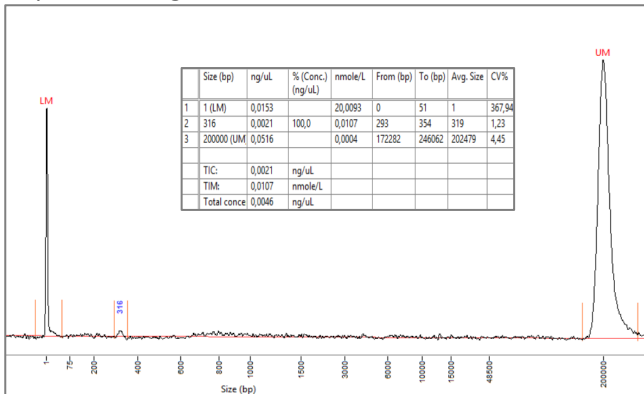
Comirnaty Omicron, LN0605



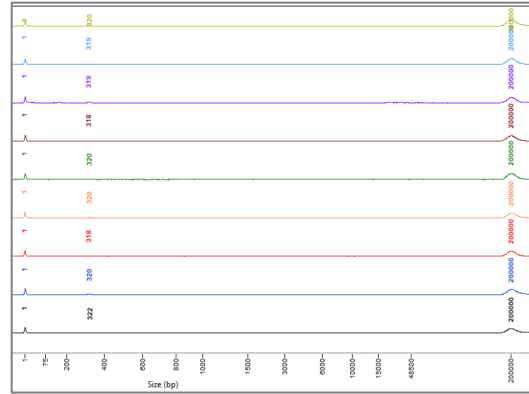
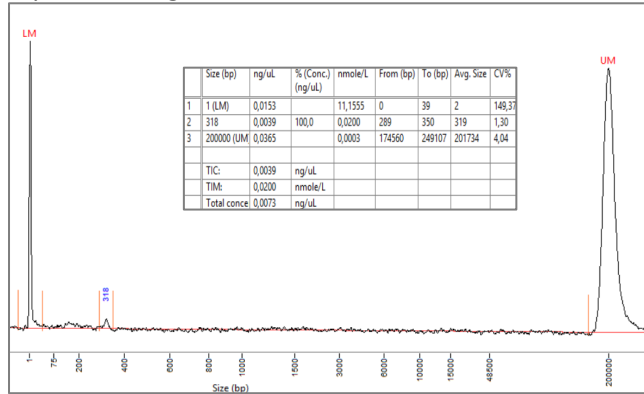
Comirnaty Original, PCB0020



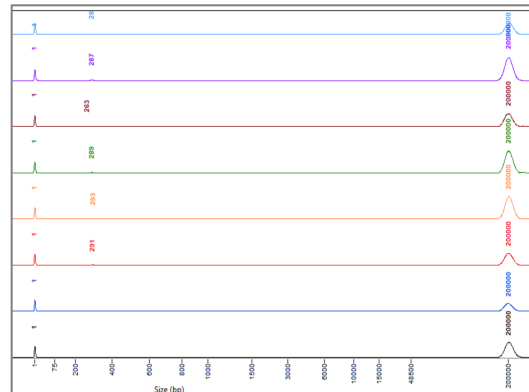
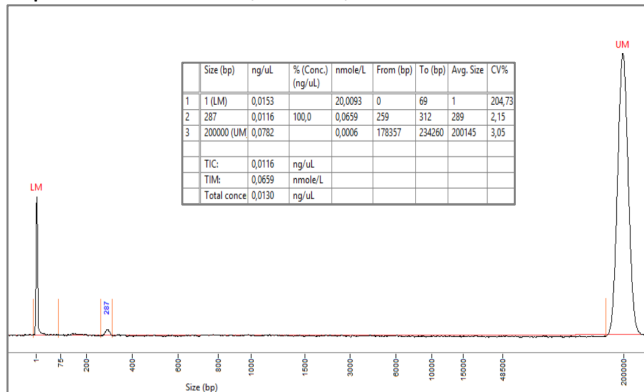
Spikevax Original, 000058A



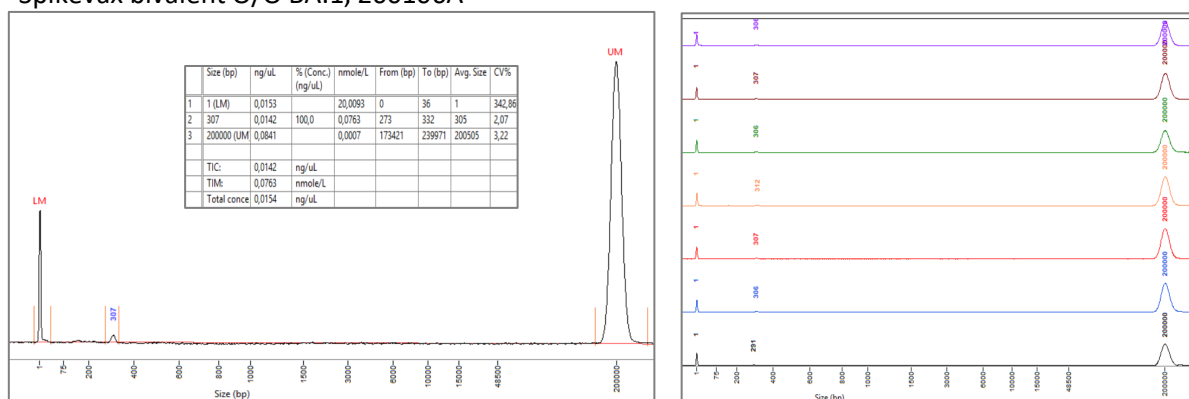
Spikevax Original, 3005697



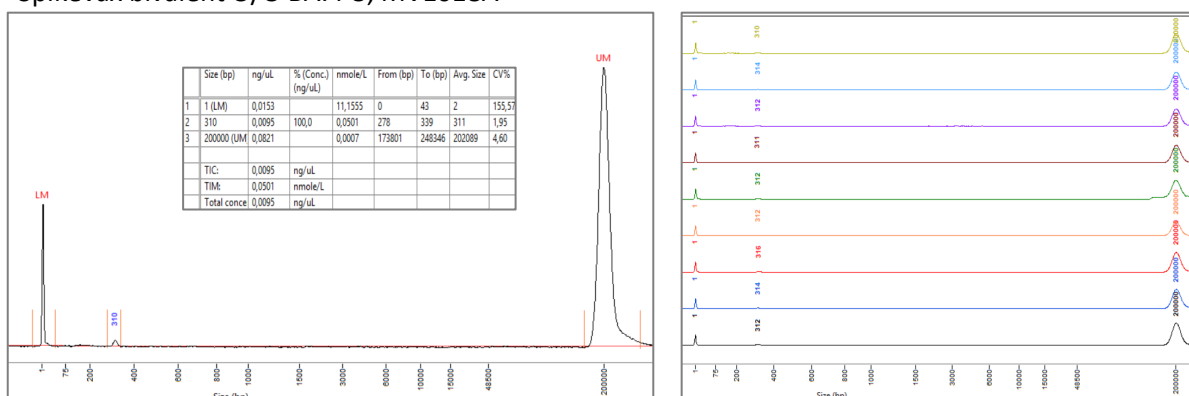
Spikevax bivalent O/O BA.1, 200023A



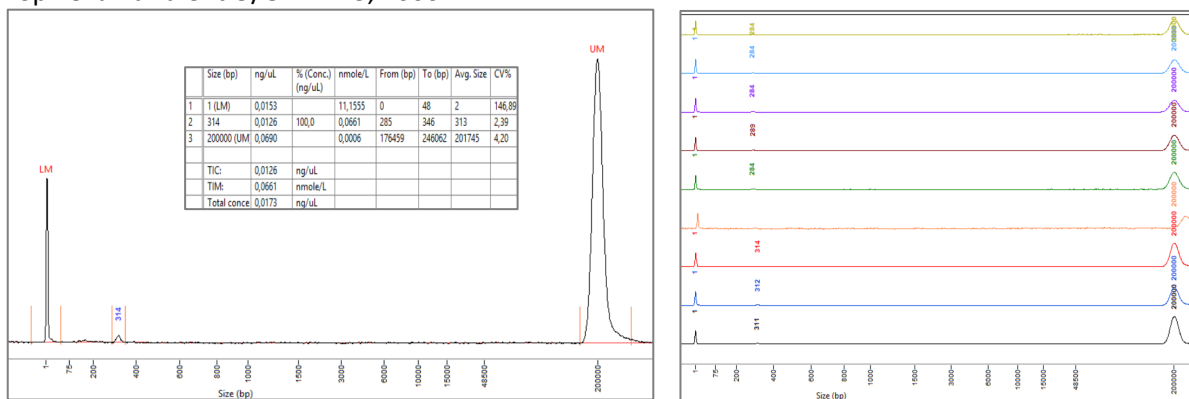
Spikevax bivalent O/O BA.1, 200106A



Spikevax bivalent O/O BA.4-5, MV1018A



Spikevax bivalent O/O BA.4-5, 400012A



Obr. 2.4.4

Denzitogramy z kapilárnej elektroforézy zvyškovej DNA v jednotlivých šaržiach vakcín analyzovaných na zariadení Agilent Fragment Analyzer 5200 s použitím kitu DNF-464 HS Large Fragment DNA Kit.

Merania boli uskutočnené v 3 biologických replikátoch a 3 technických replikátoch.

Vľavo je vždy uvedený reprezentatívny denzitogram spolu s údajmi o veľkosti detegovaných fragmentov, ich množstve a o celkovom množstve DNA v 1 µl vzorky vakcíny.

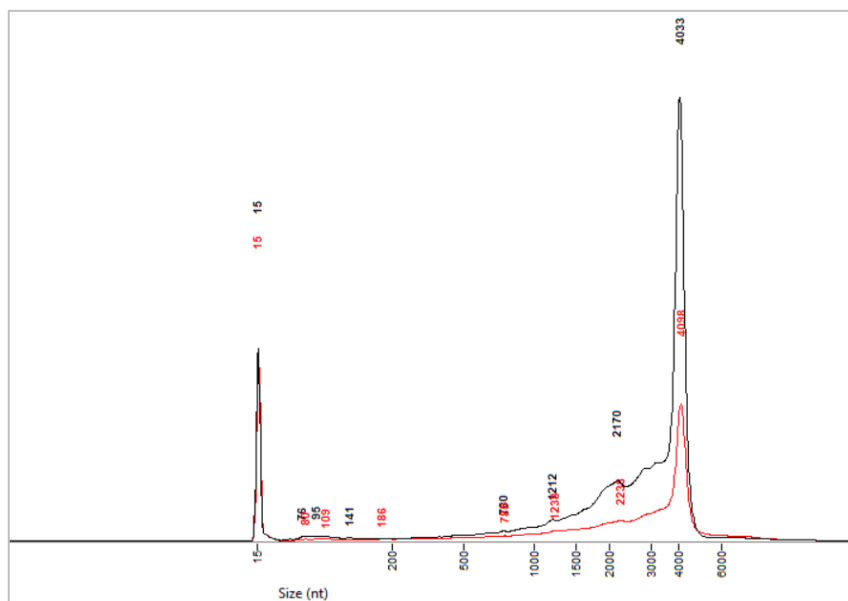
Vpravo sú znázornené denzitogramy z replikátov danej šarže vakcíny.

V žiadnej šarži analyzovaných vakcín sme nedetegovali špecifický signál, ktorý by naznačoval nadlimitné množstvá zvyškovej DNA, čo je v súlade s výsledkami fluorometrie (Qubit).

VÝSLEDKY ANALÝZY RNA:

Analýza kapilárnou elektroforézou umožňuje overiť aj integritu RNA a to priamo detekciou veľkosti a zastúpenia RNA fragmentov pomocou RNA kitu. mRNA integrita je parameter, ktorý definuje celistvosť mRNA vo vakcíne (teda stav, keď nie je degradovaná). Proces degradácie prebieha pri nesprávnom skladovaní, transporte alebo manipulácii, najmä pri prekročení doby určenej na použitie vakcíny (po expirácii). Pre dostatočnú funkčnosť vakcíny by RNA integrita mala byť zachovaná minimálne na úrovni 50 % (European Commission, APA BioNTech Pfizer, 2020).

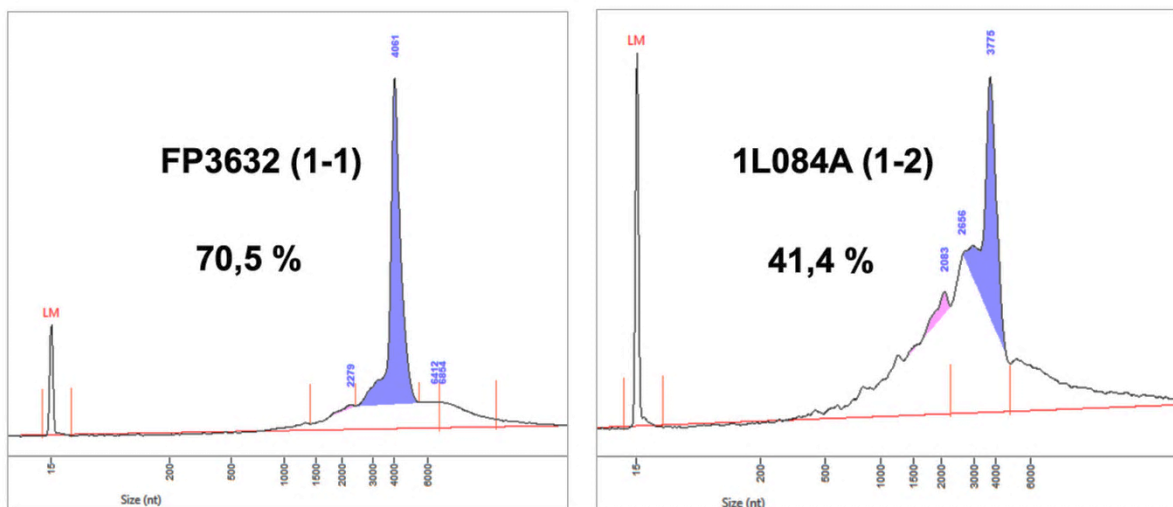
Analýzu integrity RNA sme sa rozhodli uskutočniť vzhľadom na fakt, že väčšina dostupných šarží vakcín bola dlhšiu dobu po dátume expirácie a dokumentáciu o podmienkach ich skladovania nemáme k dispozícii. Porovnali sme kvalitatívne a kvantitatívne vyhodnotenie dvoch rôznych riedení vakcín (Obr. 2.4.5).



Obr. 2.4.5

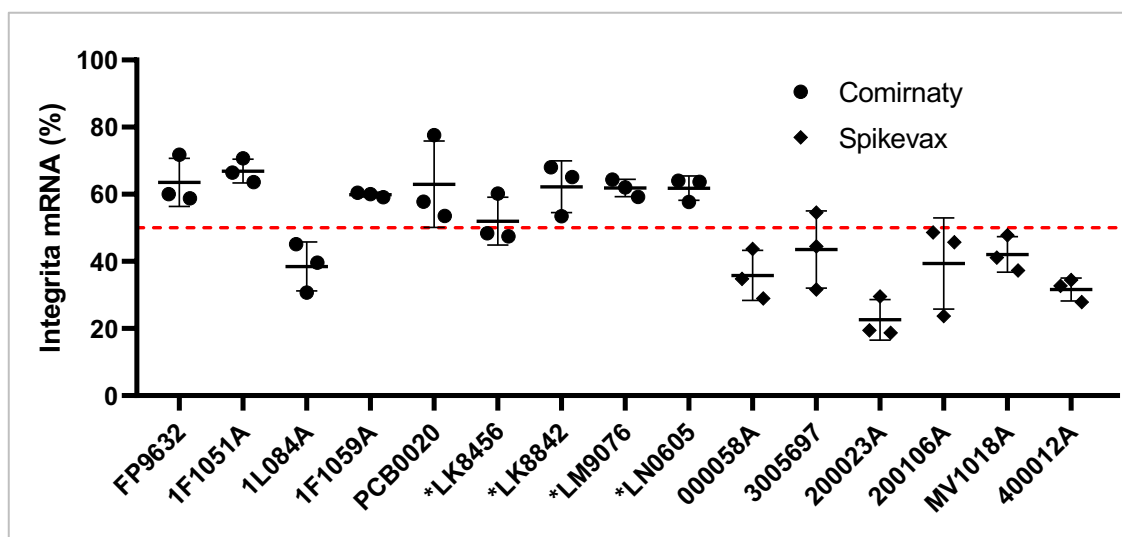
Analýza integrity mRNA vo vakcíne Comirnaty, šarža LK8456, ktorá bola opracovaná 0,2 % Tritonom X100 a nariedená 20-krát (5 ng/μl, čierna línia) a 40-krát (2,5 ng/μl, červená línia). Graf ukazuje, že integrita mRNA je na úrovni 63,4 % a demonštruje aj rozdiel v množstve mRNA v rozdielne nariadených vzorkách.

Obr. 2.4.6 ukazuje, ako sa degradácia mRNA prejaví na denzitograme a ako sa na jeho základe počíta % integrity mRNA. Súhrnné výsledky analýzy integrity mRNA vo všetkých šaržiach vakcín sú znázornené na Obr. 2.4.7.



Obr.2.4.6

Porovnanie dvoch šarží vakcín Comirnaty s vyhovujúcou (vľavo) a nevyhovujúcou (vpravo) integritou a relatívnym množstvom celistvej mRNA.

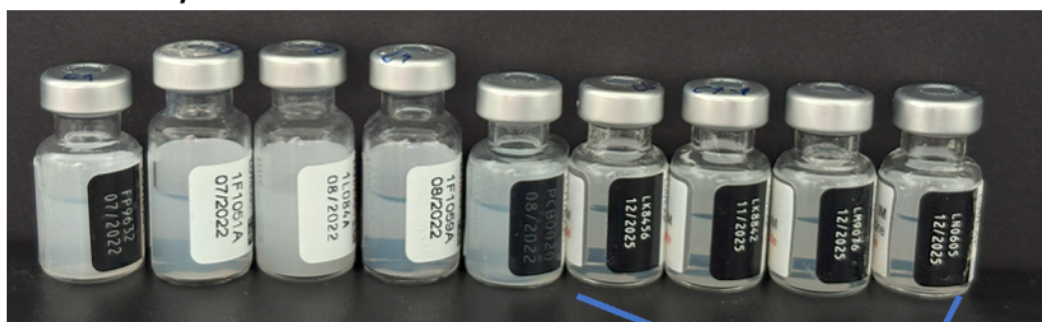


Obr.2.4.7

Súhrnný graf znázorňujúci percentuálne vyjadrenie integrity mRNA vo všetkých analyzovaných šaržiach vakcín. Prerušovaná čiara znázorňuje minimálnu prípustnú integritu mRNA vo vakcíne (50 %). Body v grafe znázorňujú jeden biologický replikát, pričom hodnota zodpovedá priemeru technických replikátov. Horizontálna čiara znázorňuje priemer troch biologických replikátov so smerodajnou odchýlkou. *Neexspirované vakcíny.

Šarža 1L084A, v ktorej bola detegovaná znížená integrita mRNA, bola vizuálne odlišná od ostatných šarží vakcín Comirnaty, ktoré mali integritu RNA dobre zachovanú, pričom vykazovala jasne viditeľné zakalenie (Obr. 2.3.8). Opalizujúci vzhľad bol viditeľný aj na vzorkách šarží vakcín Moderna, v ktorých bola integrita mRNA pod prípustnou hodnotou. Tieto efekty môžu byť dôsledkom skladovania a dlhej doby po expirácii.

Comirnaty



Spikevax



Neexspirované
šarže

Obr. 2.4.8

Fotografie ampuliek obsahujúcich analyzované šarže vakcíny Comirnaty a Spikevax, ktoré boli rozmrazené podľa inštrukcií výrobcu. Vakcíny, ktoré ešte neboli po dátume expirácie mali číry vzhľad, kým exspirované vakcíny boli viditeľne opalizujúce.

ZÁVER:

Kapilárna elektroforéza je metóda používaná výrobcami, ale aj kontrolnými laboratóriami na monitorovanie RNA integrity vo vakcínach. Z verejne dostupných zdrojov je známe, že u vakcín Comirnaty sa za vyhovujúcu hodnotu považuje, ak je vo vakcíne 50 % a viac intaktnej RNA. Túto hodnotu sme ako hraničnú zvolili aj v našej analýze s vedomím, že väčšina nami analyzovaných vakcín je dlhodobá po dátume expirácie.

Množstvo a integrita mRNA vo vakcínach sú dôležitými parametrami pri uvoľňovaní vyrobených šarží na trh. Výrobcovia a regulačné authority tieto parametre monitorujú a kontrolujú v procese výroby (drug substance specification) a taktiež u finálnych produktov (drug product specification). U vakcín po dobe expirácie sa stanovovanie hodnôt týchto parametrov (ale aj zvyškovej DNA) vyslovene neodporúča. Integritu mRNA sme stanovili, pretože znížená integrita mRNA preexspirovaných vakcín mohla byť jedným z dôvodov pozorovanej variability výsledkov kvantitatívnej PCR analýzy DNA a RNA, ktorú opísali autori Fleming et al (2025) a na jej základe prezentovali dôkazmi nepodložené vyjadrenia.

Hoci sa kapilárna elektroforéza pri analýze vakcín štandardne využíva najmä na hodnotenie integrity mRNA, jej princíp umožňuje aj vizualizáciu a charakterizáciu prítomných fragmentov DNA. Keďže detekcia nukleových kyselín počas elektroforetickej separácie je založená na fluorescenčných interkalačných farbivách, bolo nevyhnutné pred analýzou dôkladne odstrániť mRNA. Na tento účel sme mRNA vo vakcínach po jej uvoľnení z lipidových nanočastíc Tritonom X-100 enzymaticky degradovali RNázou A. Vzhľadom na to, že primárnym cieľom tejto analýzy nebola presná kvantifikácia, ale predovšetkým kvalitatívne vylúčenie nadlimitných množstiev DNA, analyzovali sme vakcíny bez extrakcie DNA.

Najprv sme analyzovali modelové vzorky s pridaným 2 kb fragmentom DNA v rôznych koncentráciách výrazne presahujúcich regulačný limit 10 ng na dávku vakcíny. Týmto experimentom sme vytvorili vizuálny referenčný rámec denzitogramov pre nadlimitné množstvá DNA. Následná analýza všetkých šarží vakcín pomocou súpravy s rozšíreným koncentračným rozsahom neukázala žiadne špecifické signály, ktoré by zodpovedali DNA v detekčnom rozsahu kitu. Denzitogramy vzoriek vakcín boli prakticky identické s kontrolnými vzorkami (fyziologický roztok, sterilná voda). Tieto výsledky jednoznačne vylučujú prítomnosť DNA v rozsahu stoviek nanogramov či dokonca mikrogramov na dávku, ako uvádzajú viaceré publikácie založené na nesprávne interpretovanej fluorometrii bez odstránenia mRNA.

Pre vylúčenie nižších koncentrácií DNA, ktoré sa mohli nachádzať pod detekčným limitom prvej použitej súpravy, sme všetky šarže analyzovali opakovane pomocou vysoko senzitívneho kitu s dolnou hranicou detekcie zodpovedajúcou koncentráciám vyhovujúcim regulačnému limitu (10 ng/dávku). Ani táto analýza nepreukázala prítomnosť nadlimitných množstiev DNA, pričom i kvantitatívne výstupy boli v súlade s očakávaniami na základe fluorometrie a qPCR.

Tieto dáta potvrdzujú, že mRNA vakcíny neobsahujú množstvá DNA v mikrogramových rozsahoch, ako uvádzajú niektoré práce, ale iba nízke podlimitné hladiny fragmentov DNA v súlade s regulačnými požiadavkami. Fragmentová analýza tak poskytuje ďalší dôkaz podporujúci konzistentnosť našich výsledkov.

2.5 ANALÝZA DNA POMOCOU SEKVENOVANIA NOVEJ GENERÁCIE

PRINCÍP METÓDY:

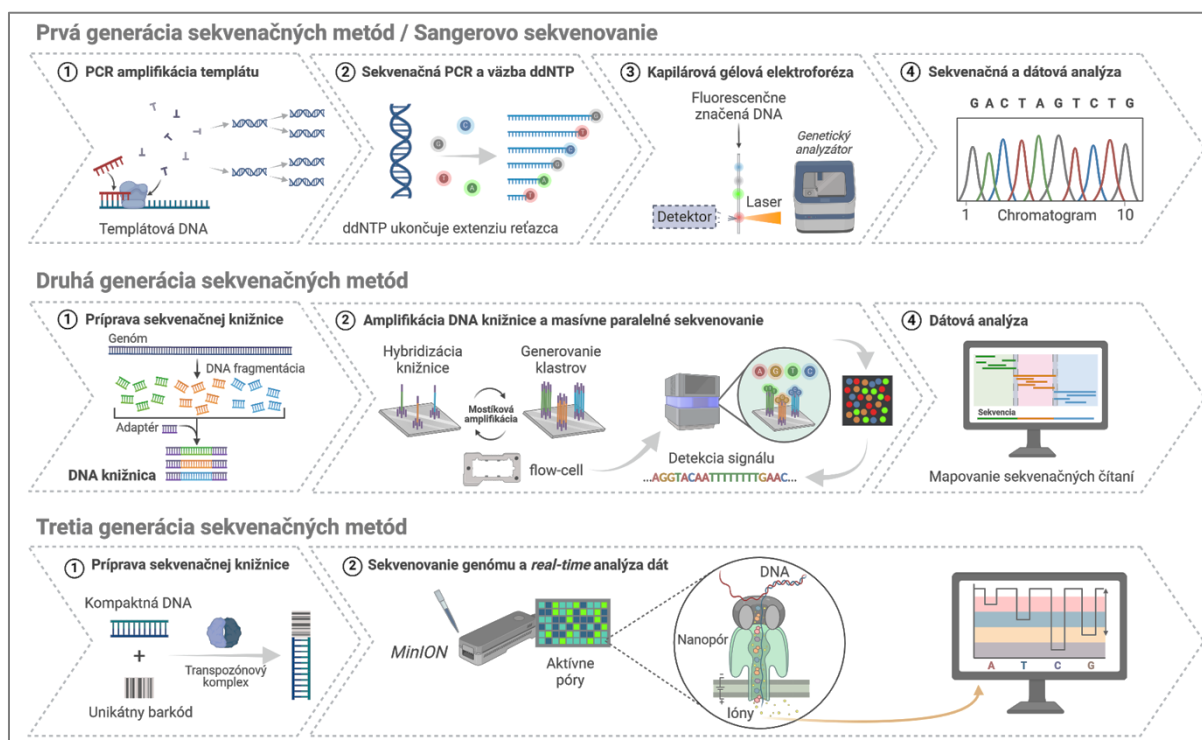
Sekvenovanie DNA je metóda stanovenia presného poradia (t.j. sekvencie) nukleotidov v reťazcoch DNA. Je to najdetailnejšia molekulárna metóda na analýzu DNA. Prvou a dodnes používanou je tzv. enzymatická metóda podľa Sangera z roku 1977 (*Sanger et al, PNAS, 1977*). Hoci metóda aj v najmodernejšej implementácii umožňuje na najnovších automatizovaných kapilárnych sekvenátoroch (napr. Applied Biosystems 3500) dosahovať až 1000 nukleotidové čítania, metóda dokáže v jedinej analýze čítať iba jediný vopred známy a tzv. primermi definovaný úsek DNA. Technológia síce bola nosnou pri vytvorení prvého draftu ľudského genómu v projekte Human Genome Project (*Lander et al, Nature, 2001*), avšak kvôli zdĺhavosti, práci a vysokým nákladom nie je vhodná na analýzy komplexných zmesí molekúl DNA, čo je predmetom preverovania šarží vakcín podľa zadania.

Celkovú DNA z vakcín sme preto podrobili analýze pomocou druhogeneračného vysokoparalelného sekvenovania (taktiež označované NGS - next generation sequencing, short read sequencing a MPS - massively parallel sequencing). Využitá bola technológia vysokoparalelného sekvenovania syntézou s použitím tzv. reverzibilných fluorescenčne značených terminátorov (*Ju et al, PNAS, 2006*) od spoločnosti Illumina Inc. (San Diego, CA, USA). Táto technológia bola zvolená ako optimálna pre podrobnú charakterizáciu všetkej prítomnej DNA vo vakcínach pre jej špecifické výhody:

- Pri tejto metóde je možné analyzovať iba dvojvláknové molekuly DNA spracované do tzv. sekvenačných knižníc (sequence library).
- Každá molekula je analyzovaná jednotlivo (v samostatnom sekvenačnom klastri). Preto je možné v sekvenačnej analýze zároveň relatívne kvantifikovať prítomnú DNA a to počítaním molekúl.
- Technológia sa vyznačuje extrémne vysokým paralelizmom (analyzuje naraz obrovské množstvo fragmentov DNA). V prípade použitého prístroja Illumina NextSeq 2000 dokáže v jednom behu prístroja analyzovať až 1,7 miliardy samostatných molekúl DNA.
- Hoci ide o „short read“ technológiu, teda využívajúcu krátke čítania, prístroj umožňuje tzv. párové čítanie, teda čítanie oboch koncov analyzovaných molekúl DNA. Preto je možné pri tzv. mapovaní stanoviť presnú veľkosť každej molekuly. Takto je možné priamo zo sekvenačného výsledku zistiť východiskový stav DNA (teda jej celistvosť).
- Má vysokú hodnotu tzv. kvality volania bázy (basecalling) a teda hodnovernosti výsledku (spoľahlivosti volania jednotlivého nukleotidu na úrovni 99,99 % alebo vyššej pre 90 % analyzovanej sekvencie).

Hoci je dnes dostupné aj tzv. tretogeneračné sekvenovanie (napr. Oxford Nanopore Technology MinIon), ktoré sa vyznačuje schopnosťou dlhých čítaní a analýzy jednotlivých molekúl nukleových kyselín natívne (*Wang et al, Nature Biotech, 2021*), niektoré špecifické vlastnosti túto metódu diskvalifikujú pre analýzu DNA prítomnú v preverovaných vakcínach:

- Technológia optimalizovaná pre dlhé čítania nie je dobrá na analýzu krátkych fragmentov prítomných v degradovanej DNA zistenej vo vakcínach.
- Prístroj umožňuje analyzovať priamo aj molekuly RNA, čo je pri obrovskom nadbytku RNA voči DNA veľkou nevýhodou.
- Vysoké vstupné nároky na množstvo DNA na úrovni mikrogramov DNA. Keďže v prípade všetkých preverovaných vakcín bolo množstvo v jednej dávke nižšie ako limit 10 nanogramov, bolo by nutné izolovať DNA na sekvenovanie zo stoviek dávok, čo by bolo extrémne zdĺhavé a nákladné.
- Nižší paralelizmus (menej analyzovaných molekúl) v porovnaní s výkonnými druhogeneračnými sekvenátormi.
- Nemá priamu implementáciu párového čítania fragmentov (paired-end).



Obr. 2.5.1

Zjednodušené schematické porovnanie troch generácií metód sekvenovania (Szemes et al. 2024)

OPIS POSTUPOV:

Izolácia DNA z analyzovaných šarží vakcín na účel sekvenovania

Získanie DNA v dostatočnom množstve a vhodnej čistote zo šarží preverovaných vakcín nebolo jednoduché ani priamočiare. V prvom rade, minimálnym vstupným množstvom podľa špecifikácie použitého kitu na prípravu ligačnej knižnice TruSeq DNA Nano Library Prep Kit (Illumina, CA, USA) je 100 ng DNA. Stanovené výťažky DNA v ekvivalente očkovacej dávky však boli všetky nižšie, ako stanovený limit 10 ng, teda menej ako desatina minimálneho vstupného množstva podľa protokolu výrobcu. Ako výsledky kvantifikačných experimentov dokazujú, všetky preverované šarže vakcín tento limit nedosahujú, resp. sú násobne nižšie. Ako sme však v publikovaných prácach viackrát potvrdili, aj veľmi nízke vstupné množstvá fragmentovanej DNA možno úspešne sekvenovať aj v podmienkach klinickej diagnostiky (Minarik et al, *PLoS ONE*, 2015, Kucharik et al, *PLoS ONE*, 2020, Holesova et al, *BMC Genomics*, 2024).

Významnejším problémom však bola prítomnosť obrovského nadbytku molekúl účinnej látky, teda mRNA, ktorá interferovala s meraniami pri príprave sekvenačných knižníc. Vo vakcíne sme pri meraniach pomocou Qubit High Sensitivity eseje stanovili 3300 až 20700-krát viac modifikovanej mRNA ako zvyškovej DNA (v priemere 11360-krát viac, hmotnostné vyjadrenie). Úvodné výsledky si vyžiadali optimalizáciu najmä v kroku odstránenia prítomnej mRNA pred samotným sekvenovaním. Bolo nutné zaradiť a optimalizovať krok opracovania RNázou (enzým rozkladajúci molekuly RNA). V prípade vakcín Comirnaty bolo optimálne množstvo 60 µl RNázy (PureLink RNase A, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), no v prípade Spikevax až 100 µl. Ako kritérium pre kvalitu DNA sme použili nemerateľné množstvo RNA (hodnota výsledku too low) pomocou Qubit RNA High Sensitivity eseje (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Pri optimalizácii s použitím vakcíny Spikevax sa ukázalo ako esenciálne zaradenie prvého kroku zahriatia vzorky na 95°C na 10 minút pre rozvoľnenie lipidovej frakcie, čo bolo následne použité aj pri vakcínach Comirnaty.

Na kontrolu kontaminácie vzoriek v procese izolácie vzoriek, následnej prípravy sekvenančných knižníc a identifikáciu pozadia laboratória vykonávajúceho analýzy, bola do analýzy zahrnutá NTC (non template control) vzorka, kde bol ako vstupný materiál použitý fyziologický roztok.

Izolácia DNA na účel následného sekvenovania, bola uskutočnená pomocou Qiagen koloniek. Použili sme súpravu QIAamp Blood Mini Kit (Qiagen), ktorá je vhodná na extrakciu DNA zo vzoriek rôzneho pôvodu (plnej krvi, kultivovaných buniek, telesných tekutín, tkanív, vysušených krvných kvapiek a pod). V prvom kroku sa vzorky lyzujú, pričom uvoľnená DNA sa naviaže na silikátovú membránu na kolónke. DNA sa následne prečistí pomocou dvoch premytí, ktorými sa odstránia kontaminanty. Purifikovaná DNA sa z kolónky uvoľní pomocou sterilnej vody alebo špeciálneho elučného pufru. Je to rýchla a účinná metóda extrakcie vysoko kvalitnej DNA, ktorá je vhodná pre rôzne aplikácie, ako napríklad PCR alebo sekvenovanie.

Na izoláciu DNA z vakcín Comirnaty bolo použitých 300 µl vakcíny (zodpovedajúce objemu očkovacej dávky), ktoré boli prenesené do sterilnej 2 ml mikroskúmavky a zahriate na 95 °C počas 10 minút za účelom uvoľnenia lipidovej frakcie. Vzorky boli následne schladené ponorením do ľadu. Ku vzorkám bola pridaná RNáza A v objeme 60 µl, vzorky boli dôkladne premiešané vortexovaním a sedimentované krátkou centrifugáciou (15 s). K zmesi bolo následne pridaných 300 µl roztoku AL (lyzačný pufr) a 30 µl proteinázy K. Vzorka bola premiešaná vortexovaním, sedimentovaná krátkou centrifugáciou (15 s) a inkubovaná v termobloku 90 minút pri 37 °C a následne 10 minút pri 56 °C.

Po inkubácii bolo pridaných 300 µl 96 % etanolu, zmes bola dôkladne premiešaná na vortexe (15 s) a opäť krátko centrifugovaná. Takto pripravená vzorka bola nanosená na QIAamp spin kolónku umiestnenú v 2 ml zbernej skúmavke. V prvom kroku bolo na membránu aplikovaných 640 µl vzorky, kolónka bola centrifugovaná 1 min pri 6 000 × g a prietok v zbernej skúmavke bol odstránený. Následne bol na kolónku aplikovaný zvyšný objem vzorky (~350 µl) a centrifugácia zopakovaná za rovnakých podmienok.

Po naviazaní DNA na membránu kolónky nasledovali tri kroky premývania:

- 500 µl roztoku AW1 (prvé premytie), centrifugácia 1 min pri 6 000 × g,
- 500 µl roztoku AW2 (druhé premytie), centrifugácia 1 min pri 6 000 × g,
- 500 µl absolútneho etanolu (tretie premytie), centrifugácia 1 min pri 6 000 × g.

Na odstránenie zvyškového etanolu bola kolónka umiestnená do novej zbernej skúmavky a centrifugovaná 3 min pri 14 000 × g. Potom bola vložená do čistej sterilnej 1,5 ml mikroskúmavky a inkubovaná 2 min v termobloku pri 56 °C, aby sa zabezpečilo úplné vysušenie membrány.

Elúcia DNA bola uskutočnená pridaním 200 µl roztoku MPW (elučný roztok) priamo na membránu kolónky pre vakcíny šarží LN0605, LK8842, LK8456, LM9076 (neexspirované), resp. 60 µl pre vakcíny šarží FP9632, 1F1051A, 1L084A, 1F1059A, PCB0020 (exspirované). Po 10-minútovej inkubácii pri laboratórnej teplote bola kolónka centrifugovaná 1 min pri 14 000 × g a získaný eluát (izolovaná DNA) bol použitý na následné analýzy.

Na izoláciu DNA z vakcín Spikevax bolo použité množstvo 500 µl vzorky (zodpovedajúce objemu očkovacej dávky). V tomto prípade však, na zabezpečenie efektívnej eliminácie mRNA pomocou RNázy A, boli vakcíny zo šarží 000058A a 3005697 riedené v pomere 1:3 s roztokom MPW, zatiaľ čo vakcíny zo šarží 400012A, 200106A, MV1018A a 200023A (tzv. boostre) boli riedené v pomere 1:1 s MPW, vzhľadom na ich deklarovaný obsah mRNA - 100 µg, resp. 50 µg.

Takto pripravené vzorky vakcín boli prenesené do sterilnej 2 ml mikroskúmavky a zahriate na 95 °C počas 10 minút za účelom uvoľnenia lipidovej frakcie. Vzorky boli následne schladené ponorením do ľadu. Ku vzorkám bola pridaná RNáza A v objeme 100 µl, dôkladne premiešané vortexovaním a sedimentované krátkou centrifugáciou (15 s). K zmesi bolo následne pridaných 500 µl roztoku AL (lyzačný pufr) a 50 µl proteinázy K. Vzorka bola premiešaná vortexovaním, sedimentovaná krátkou centrifugáciou (15 s) a inkubovaná v termobloku 90 minút pri 37 °C a následne 10 minút pri 56 °C.

Po inkubácii bolo pridaných 500 µl absolútneho etanolu, zmes bola dôkladne premiešaná na vortexe (15 s) a opäť krátko centrifugovaná. Takto pripravená vzorka bola nanosená na QIAamp spin kolónku

umiestnenú v 2 ml zbernej skúmavke celkovo v troch krokoch. V prvom kroku bolo na membránu aplikovaných 640 µl vzorky, kolónka bola centrifugovaná 1 min pri 6 000 × g a prietok v zbernej skúmavke bol odstránený. V druhom kroku bolo na kolónku opäť aplikovaných ďalších 640 µl vzorky, kolónka bola centrifugovaná 1 min pri 6 000 × g a prietok v zbernej skúmavke bol odstránený. Následne bol na kolónku aplikovaný zvyšný objem vzorky (~370 µl) a centrifugácia bola zopakovaná za rovnakých podmienok.

Po naviazaní DNA na membránu kolónky nasledovali tri kroky premývania:

- 500 µl roztoku AW1 (prvé premytie), centrifugácia 1 min pri 6 000 × g,
- 500 µl roztoku AW2 (druhé premytie), centrifugácia 1 min pri 6 000 × g,
- 500 µl absolútneho etanolu (tretie premytie), centrifugácia 1 min pri 6 000 × g.

Na odstránenie zvyškového etanolu bola kolónka umiestnená do novej zbernej skúmavky a centrifugovaná 3 min pri 14 000 × g. Potom bola vložená do čistej sterilnej 1,5 ml mikroskúmavky a inkubovaná 2 min v termobloku pri 56 °C, aby sa zabezpečilo úplné vysušenie membrány.

Elúcia DNA bola uskutočnená pridaním 60 µl roztoku MPW (elučný roztok) priamo na membránu kolónky pre zahustenie DNA vo výslednej izolovanej vzorke. Po 10-minútovej inkubácii pri laboratórnej teplote bola kolónka centrifugovaná 1 min pri 14 000 × g a získaný eluát (izolovaná DNA) bol použitý na následné analýzy.

Fluorometrické stanovenie množstva DNA

Na stanovenie koncentrácie DNA v izolovaných vzorkách bol použitý prístroj fluorometer Qubit™ 3.0 (Invitrogen), v kombinácii s určenými detekčnými súpravami a jednorazovými plastovými skúmavkami Qubit™ Assay Tubes. Na kvantifikáciu DNA bola použitá súprava Qubit™ dsDNA HS Assay Kit určená na vysoko citlivú detekciu dvojvláknovej DNA v rozsahu koncentrácií 0,005–120 ng/µl.

Meranie bolo realizované v súlade s pokynmi výrobcu. Prístroj bol kalibrovaný pomocou štandardov dodávaného k uvedenej súprave, a to zmiešaním 10 µl kalibračného štandardu a 190 µl pracovného roztoku (working solution).

Súpravu Qubit™ dsDNA HS Assay Kit a Qubit™ RNA HS Assay Kit výrobca dodáva ako samostatné zložky: reakčný pufo (DNA HS Buffer) a interkalačné farbivo (Qubit DNA HS Reagent). Pracovný roztok sme preto museli pred použitím čerstvo pripraviť zmiešaním reakčného pufru s farbivom v pomere 1 µl farbiva na jednu reakciu (t. j. 1 µl farbičky na každých 200 µl finálneho objemu roztoku). Miešanie prebiehalo v sterilnej 15 ml plastovej skúmavke.

Na kvantifikáciu bola každá vzorka pripravená zmiešaním 5 µl vzorky s pracovným roztokom tak, aby výsledný objem reakčnej zmesi bol 200 µl. Každá vzorka bola meraná ako technický triplikát. Po dôkladnom premiešaní vzorky na vortexe nasledovala 2-minútová inkubácia v tme a následné meranie na prístroji.

Pred samotným meraním bol do fluorometra zadaný použitý objem vzorky, čo umožnilo automatický výpočet koncentrácie nukleových kyselín vo finálnych jednotkách ng/µl. Podľa nameraných hodnôt koncentrácie DNA (Tab. 3) sa následne nastavili protokoly na prípravu sekvenáčnych knižníc.

Tab. 3

Koncentrácie zvyškovej DNA izolovanej z analyzovaných šarží vakcín na účel sekvenovania.

Názov vakcíny	Šarža vakcíny	Koncentrácia DNA v extrakte (ng/µl)
Comirnaty Original	FP9632	0,0444
	1F1051A	0,0547
	1L084A	0,0631
	1F1059A	0,0220
	PCB0020	0,0302
Comirnaty Omicron JN.1	LK8456	0,0387

	LK8842	0,0285
	LM9076	0,0416
Comirnaty Omicron KP.2	LN0605	0,0341
Spikevax Original	000058A	0,0331
	3005697	0,0291
Spikevax bivalent Original/Omicron BA.1	200023A	0,0275
	200106A	0,0496
Spikevax bivalent Original/Omicron BA.4-5	MV1018A	0,0288
	400012A	0,0267

Príprava knižníc na sekvenovanie

Cieľom analýzy bolo nielen určiť, aké molekuly DNA sú prítomné v šaržiach vakcín, ale aj v akom stave degradácie sa tieto molekuly nachádzajú. Ide o tzv. fragmentomickú analýzu, ktorá má špeciálny význam pri tzv. tekutej nádorovej biopsii (*Bao et al, Nature Medicine, 2025*). Preto bolo kľúčové po izolácii DNA vzorky viac nefragmentovať v zmysle štandardných metód sekvenovania vysokomolekulárnej DNA, ale použiť metódu, ktorá zachováva pôvodnú dĺžku fragmentov. Zvolili sme preto ligačný typ knižnice s čo najnižším vstupným množstvom DNA, teda použili sme vyššie spomenutý knižničný kit TruSeq DNA Nano. Z pôvodného protokolu sme vynechali prvý krok fragmentácie DNA (ten slúži na štiepenie vysokomolekulárnej DNA, ktorú získavame pri štandardnej izolácii napr. z bunkových kultúr) práve na to, aby sme zistili skutočné dĺžky fragmentov prítomných v šaržiach vakcín.

Sekvenačné knižnice boli pripravené v polovičnom objeme v porovnaní s originálnym protokolom z dôvodu nízkeho (podlimitného) obsahu DNA vo vzorkách.

Vstupný objem 30 µl izolovanej DNA bol prenesený do nízkoadhezívnej PCR platničky (LoBind, Eppendorf). K vzorke bol pridaný 20 µl roztok End Repair Mix 2, ktorý zabezpečuje zarovnanie koncov fragmentov DNA. Zmes bola krátko premiešaná pipetovaním a následne bola inkubovaná v termocykleri pri 30 °C počas 30 minút a schladená na 4 °C. Po inkubácii bol k reakčnej zmesi pridaný 4-násobok objemu Sample Purification Beads (SPB), t. j. 200 µl magnetických guľôčok, aby bolo zabezpečené zachytenie všetkých fragmentov DNA. Zmes bola dôkladne premiešaná pipetovaním a bola inkubovaná 5 minút pri laboratórnej teplote. Magnetické guľôčky boli separované umiestnením PCR platničky na magnetický stojan s inkubáciou počas 10 minút. Supernatant bol odstránený a pelet bol dvakrát premytý 200 µl čerstvo pripraveného 80 % etanolu. Zvyškový etanol bol odstránený sušením pri laboratórnej teplote. K peletu bolo následne pridaných 10 µl Resuspension Buffer (RSB), zmes bola dôkladne premiešaná pipetovaním, inkubovaná 2 minúty pri izbovej teplote a magnetické guľôčky boli opäť separované na magnetickom stojane počas 5 minút. Z eluátu bolo prenesených 8,75 µl do novej jamky v PCR platničke.

Adenylácia 3' koncov fragmentov DNA (pridanie jedného nukleotidu adenínu) bola uskutočnená pridaním 6,25 µl A-Tailing Mix k eluátu. Zmes bola premiešaná a následne bola inkubovaná pri 37 °C počas 30 minút, pri 70 °C počas 5 minút a nakoniec bola schladená na 4 °C počas 5 minút.

Ligácia adaptérov bola realizovaná pridaním 1,25 µl Indexed Adapter (podľa multiplexového dizajnu – unikátne označenie každej sekvenovanej vzorky individuálnou krátkou sekvenciou slúžiacou na jej identifikáciu v zmesi sekvenovaných DNA fragmentov), 1,25 µl Ligation Mix 2 a 1,25 µl RSB ku každej vzorke. Zmes bola premiešaná a inkubovaná pri 30 °C počas 10 minút a následne bola schladená na 4 °C. Ligácia bola zastavená pridaním 2,5 µl Stop Ligation Buffer.

Odstránenie nezabudovaných adaptérov a adaptér dimérov bolo uskutočnené dvoj krokovým čistením pomocou SPB. V prvom kroku bolo pridaných 21,25 µl SPB, zmes bola dôkladne premiešaná pipetovaním a inkubovaná 5 minút pri laboratórnej teplote. Magnetické guľôčky boli separované na magnetickom stojane (5 minút), supernatant bol odstránený a pelet bol dvakrát premytý 200 µl čerstvo pripraveného 80 % etanolu. Zvyškový etanol bol odstránený sušením pri laboratórnej teplote. Následne

bolo k peletu pridaných 26,25 µl RSB, zmes bola premiešaná pipetovaním, inkubovaná 2 minúty pri laboratórnej teplote a separácia bola vykonaná rovnakým spôsobom. Do novej jamky PCR platničky bolo prenesených 25 µl eluátu. V druhom kroku čistenia bolo k eluátu pridaných 25 µl SPB. Zmes bola dôkladne premiešaná pipetovaním, inkubovaná 5 minút pri laboratórnej teplote a separácia bola opäť vykonaná na magnetickom stojane. Supernatant bol odstránený a pelet bol dvakrát premytý 200 µl 80 % etanolu. Po odstránení zvyškového etanolu sušením bolo pridaných 13,25 µl RSB, zmes bola dôkladne premiešaná pipetovaním, inkubovaná 2 minúty pri laboratórnej teplote a separovaná na magnetickom stojane. Do novej jamky PCR platničky bolo prenesených 12,5 µl eluátu.

PCR obohatenie knižnice (Library enrichment) bolo vykonané pridaním 12,5 µl EPM (Enhanced PCR Mix) a 2,5 µl PPC (PCR Primer Cocktail) k eluátu. Reakcia bola uskutočnená v termocykléri za nasledovných podmienok: úvodná denaturácia: 95°C na 3 minúty, 10 cyklov: denaturácia 98°C na 20 sekúnd, anelácia 60°C na 15 sekúnd, 72°C na 30 sekúnd, záverečná polymerizácia: 72°C na 5 minút, chladenie: 4°C.

Záverečné čistenie knižnice bolo uskutočnené pridaním 25 µl SPB k PCR produktu. Zmes bola premiešaná pipetovaním a inkubovaná 5 minút pri laboratórnej teplote. Magnetické guľôčky boli separované, supernatant bol odstránený a pelet bol dvakrát premytý 200 µl 80 % etanolu. Po odstránení zvyškového etanolu sušením bolo pridaných 13 µl RSB, zmes bola premiešaná, inkubovaná 2 minúty pri laboratórnej teplote a následne separovaná na magnetickom stojane. Z eluátu bolo prenesených 12,5 µl do novej jamky PCR platničky.

Finálne sekvenačné knižnice boli podrobené kontrole kvality pomocou fluorometrického merania koncentrácie (Qubit 3.0, Qubit DNA HS assay) a stanovenia dĺžky fragmentov (Agilent Bioanalyzer 2100, High Sensitivity DNA Kit). Na základe získaných hodnôt bola vypočítaná nanomolarita knižníc podľa vzorca: $(\text{Koncentrácia vzorky [ng/}\mu\text{l}] / \text{Priemerná dĺžka fragmentov [bp]} * 660) * 10^6$.

Knižnice, ktoré nedosiahli požadovanú koncentráciu 2 nM, boli opätovne amplifikované s pridaním troch PCR cyklov. Následne bolo vykonané čistenie pomocou SPB podľa postupu popísaného vyššie a znovu bola vykonaná kontrola kvality. Vzorky, ktoré ani po opätovnej amplifikácii nespĺňali potrebnú koncentráciu, boli zakoncentrované odparením elučného roztoku na vákuovej centrifúge Concentrator Plus (Eppendorf AG, Hamburg, Germany).

Na stanovenie koncentrácie finálnych knižníc bol použitý prístroj fluorometer Qubit™ 3.0 (Invitrogen) v kombinácii s Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (detekčný rozsah 0,005–120 ng/µl) a jednorazovými plastovými skúmavkami Qubit™ Assay Tubes. Meranie bolo realizované v súlade s pokynmi výrobcu. Prístroj bol pred začatím merania kalibrovaný pomocou štandardov dodávaných v spolu so súpravou – a to zmiešaním 10 µl kalibračného štandardu a 190 µl pracovného roztoku (working solution). Príprava pracovného roztoku je popísaná v predchádzajúcej kapitole Qubit fluorometrie. Stručne: pripravuje sa zmiešaním reakčného pufra s farbivom v pomere 1 µl farbiva na jednu reakciu (t. j. 1 µl farbičky na každých 200 µl finálneho objemu roztoku). Miešanie prebieha v sterilnej 15 ml plastovej skúmavke. Na kvantifikáciu bola každá vzorka finálnej knižnice pripravená zmiešaním 1 µl vzorky s pracovným roztokom tak, aby výsledný objem reakčnej zmesi bol 200 µl. Po dôkladnom premiešaní vzorky na vortexe nasledovala 2-minútová inkubácia v tme a následné meranie na prístroji. Pred samotným meraním bol do fluorometra zadáný použitý objem vzorky, čo umožnilo automatický výpočet koncentrácie nukleových kyselín vo finálnych jednotkách ng/µl.

Analýza dĺžkového profilu pomocou Agilent Bioanalyzer 2100

Na určenie dĺžkového profilu finálnych knižníc bola použitá metóda elektroforézy na čipe na prístroji Bioanalyzer 2100 (Agilent), v kombinácii s Agilent High Sensitivity DNA kit (detekčný rozsah 100 pg/µl – 10 ng/µl pre fragmentovanú DNA a knižnice, 5 – 500 pg/µl pre PCR produkty). Analýza bola vykonaná v súlade s odporúčaniami výrobcu podľa originálneho protokolu.

Pred začiatkom analýzy boli všetky reagenty temperované na laboratórnu teplotu po dobu 30 minút. K jednej fľaštičke High Sensitivity DNA gel matrix bolo pridaných 15 µl DNA dye concentrate. Zmes bola dôkladne premiešaná na vortexe, prenesená do spin filtra a centrifugovaná pri 2240 × g po dobu 15

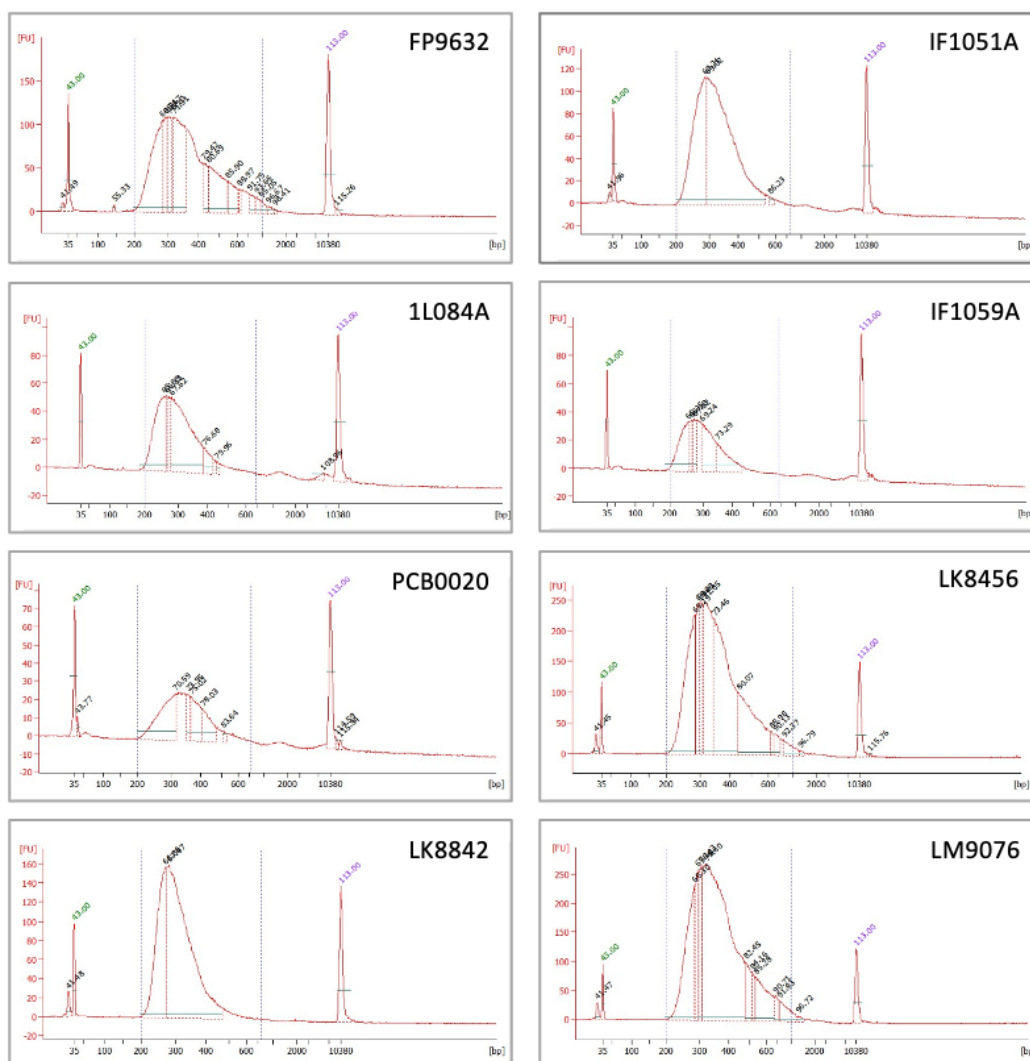
minút. Pripravený gel-dye mix bol chránený pred svetlom a skladovaný pri 4 °C (použiteľný do 6 týždňov).

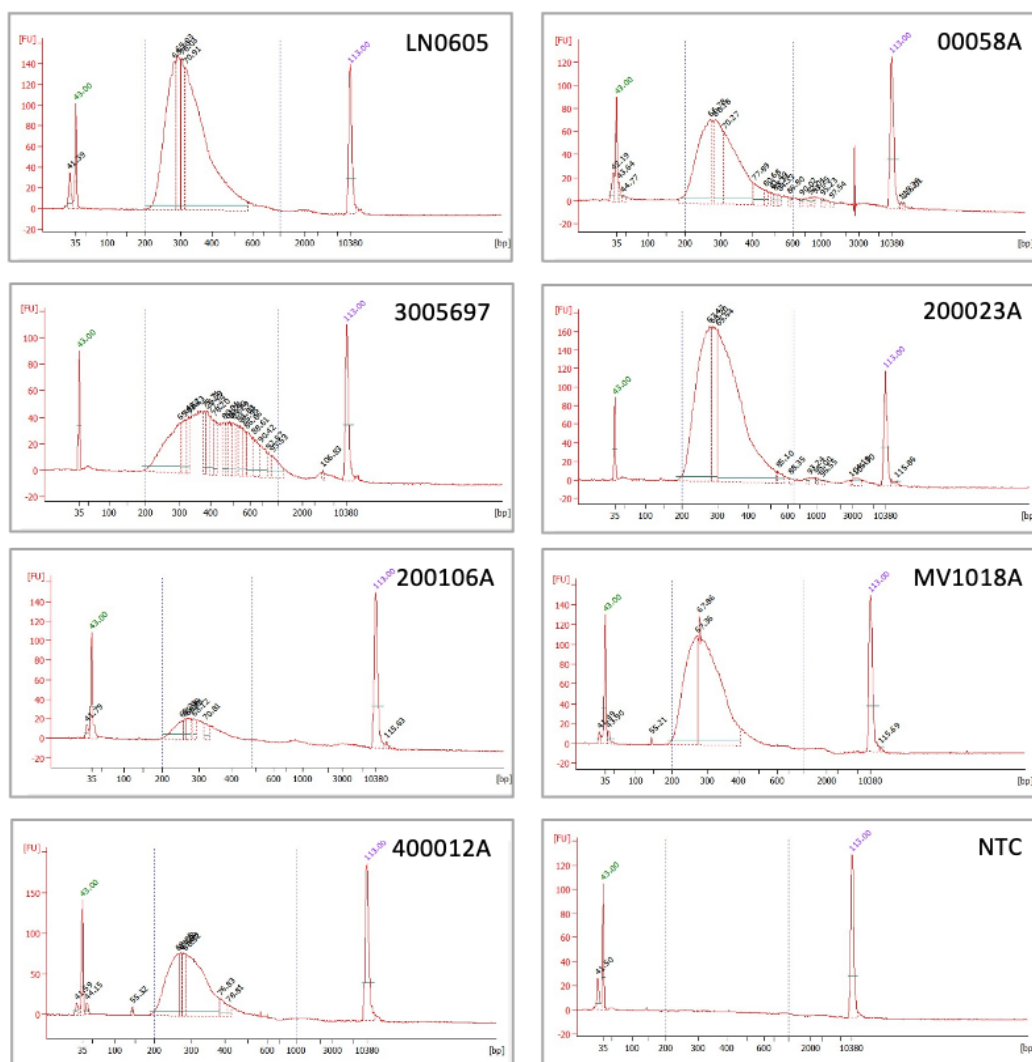
Na čipovú prípravnú stanicu (chip priming station) bol umiestnený nový High Sensitivity DNA čip. Do jamky označenej **G** bolo pipetovaných 9 µl gel-dye mixu. Piest striekačky bol nastavený na pozíciu 1 ml a po zatvorení stanice bol zatlačený, kým sa nezachytil klipom. Po uplynutí 60 sekúnd bol klip uvoľnený, po 5 sekundách bol piest pomaly vytiahnutý späť na pôvodnú pozíciu. Následne bol čip otvorený a do všetkých ostatných jamiek označených **G** bolo pridaných 9 µl gel-dye mixu. Do všetkých jamiek pre vzorky a veľkostný štandard bolo následne pridaných 5 µl markera. Do jamky určenej pre veľkostný štandard bol pridaný 1 µl High Sensitivity DNA veľkostného štandardu. Do každej vzorkovej jamky bol pridaný 1 µl analyzovanej vzorky - knižnice. Do nepoužitých jamiek bol pipetovaný 1 µl markeru, aby sa predišlo chybám pri elektroforéze. Po napipetovaní všetkých reagentov bol čip vložený do horizontálneho adaptéru a vortexovaný po dobu 1 minúty pri 2400 rpm. Takto pripravený čip bol do 5 minút vložený do prístroja Agilent Bioanalyzer 2100, kde bola následne spustená analýza.

Kontrola kvality sekvenačných knižníc

Sekvenačné knižnice sa podarilo úspešne pripraviť zo všetkých analyzovaných šarží vakcín Comirnaty aj Spikevax. Fragmentové profily jednotlivých knižníc sú znázornené na Obr. 2.5.2.

Hodnoty a parametre z kontroly kvality finálnych knižníc sú uvedené v Tab. 4. Všetky pripravené knižnice spĺňali kvalitatívne podmienky na následné sekvenovanie na platforme Illumina NextSeq 2000 – minimálna koncentrácia 2 nM, absencia nezabudovaných adaptérov a adaptér dimérov.





Obr. 2.5.2

Dĺžkové profily jednotlivých knižníc pripravených použitím TruSeq DNA Nano kitu podľa upraveného protokolu.

Tab. 4.

Hodnoty a parametre z kontroly kvality finálnych sekvenačných knižníc.

Šarža	Koncentrácia finálnej knižnice (ng/μl)	Dĺžkový profil finálnej knižnice (bp)	Koncentrácia finálnej knižnice (nM)
FP9632	2.06	388	10.1
1F1051A	1.64	339	7.1
1L084A	0.926	319	4.1
1F1059A	0.598	312	2.1
PCB0020	0.642	364	2.1
LK8456	4.28	373	17.1
LK8842	2.22	310	10.1
LM9076	5.9	383	23.1
LN0605	2.32	339	10.1
000058A	0.96	319	4.1
3005697	1.07	440	5.1
200023A	2.52	320	11.1
200106A	0.54*	308	2.66*
MV1018A	1.66	304	8.1
400012A	1.05	309	7.1
NTC	0.17	NA**	NA**

* hodnota po zakoncentrovaní na vákuovej centrifúge

**NA - „not available“ - nedostupné dáta z dôvodu nemerateľných hodnôt

NTC – kontrola bez templátu, t.j. fyziologický roztok

Sekvenačná analýza

Sekvenačné behy boli realizované na prístroji Illumina NextSeq 2000 s použitím sekvenačného kitu XLEAP-SBS 200 cyklov. Pre každý beh boli použité indexy TruSeq Index Adapter Ready s konfiguráciou 2 × 8 cyklov pre indexové čítanie. Sekvenovanie prebiehalo v móde párového čítania (paired-end) s dĺžkou čítania 2 × 100 bp.

Parametre jednotlivých behov vykazovali vysokú kvalitu dát, pričom podiel čítaní s hodnotou kvality $\geq Q30$ sa pohyboval v rozmedzí 92,3 % až 93,47 %.

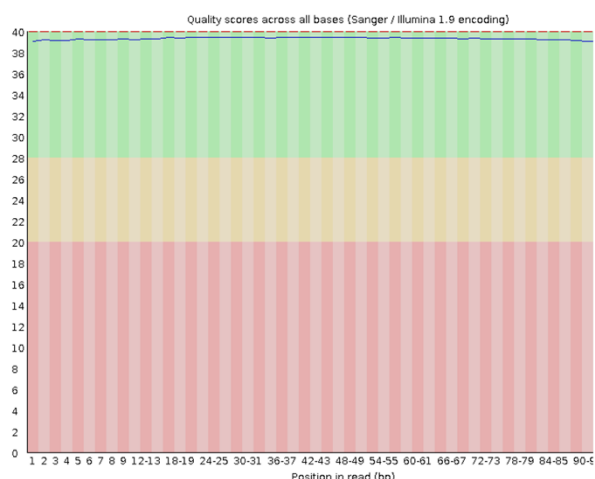
Bioinformatické spracovanie sekvenačných dát

Kontrola kvality sekvenačných dát

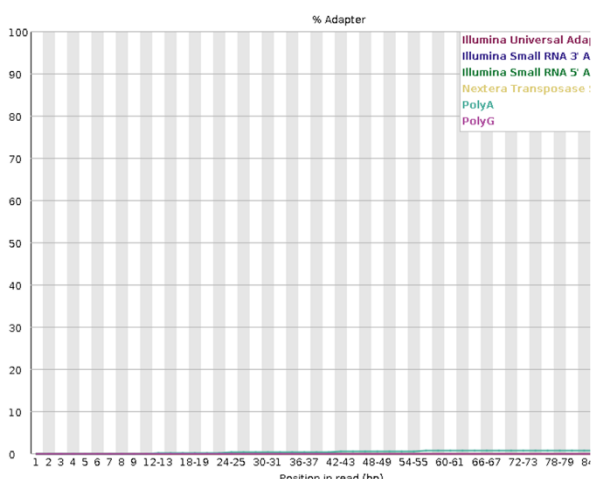
Súbory vo formáte FASTQ získané zo sekvenovania boli podrobené kontrole kvality pomocou nástroja FastQC (Andrews, 2010). Vzhľadom na vysokú kvalitu sekvenovaných báz nebolo potrebné pristúpiť k orezávaniu čítaní.



Per base sequence quality



Adapter content



Obr. 2.5.3

Ukážka výstupu kontroly kvality pre čítania pomocou FastQC.

Skladanie plazmidových kontigov

Skladanie čítaní do kontigov bolo realizované nástrojom Unicycler (Wick et al., *PLoS Comp Biol*, 2017). Vzhľadom na nadmerný počet čítaní bolo skladanie vykonané na prvých 100 000 čítaní pre každú vzorku. Výnimkou boli 2 vzorky Spikevax bivalent Original/Omicron BA.4/BA.5, kde tento počet nepostačoval na kvalitné skladanie, preto bol pre tieto vzorky použitý kontig zostavený z 1 000 000 čítaní (šarža MV1018A). Každá vzorka bola reprezentovaná jedným kontigom, ktorý bol ďalej použitý ako referenčná sekvencia na mapovanie čítaní pre danú vzorku.

Úprava referenčných sekvencií na mapovanie čítaní z cirkulárnych plazmidov

Štandardné nástroje na mapovanie sekvenačných čítaní vyžadujú lineárne referenčné sekvencie, pričom priamo nepodporujú cirkulárny charakter plazmidov. Cirkulárny kontig je preto umelo prerušený na náhodne zvolenom mieste, čím vzniká požadovaný lineárny reťazec znakov. Čítania nachádzajúce sa na rozhraní tohto technického zlomu by štandardné mapovacie nástroje neboli schopné korektne mapovať. Aby sa predišlo tejto technickej strate čítaní, bol na koniec lineárnej

referenčnej sekvencie pridaný dodatočný 100 bp úsek (maximálna dĺžka čítania) zo začiatku tej istej sekvencie. Táto modifikácia zabezpečila správne mapovanie aj týchto čítaní na zlome.

Mapovanie sekvenačných čítaní

Mapovanie k vyskladaným kontigom bolo realizované pomocou nástroja Bowtie2 (Langmead a Salzberg, *Nature Methods*, 2012) a podrobené kontrole kvality pomocou nástroja Qualimap (García-Alcalde et al., *Bioinformatics*, 2012). Z výstupov nástroja boli extrahované a analyzované nasledovné metriky:

- počet analyzovaných čítaní
- počet mapovaných čítaní
- pokrytie referenčného genómu mapovanými čítaniami
- dĺžkové profily fragmentov.

VÝSLEDKY:

Zistené prítomné molekuly DNA

Sekvenovaná DNA predstavuje pozostatky degradovaných molekúl plazmidu, ktorý slúžil ako templát na produkciu mRNA v produkčnom procese. Úplnú sekvenciu plazmidu bolo možné stanoviť bioinformatickou metódou *de novo* skladania (*de novo* assembly) krátkych čítaní na základe prekrývajúcich sa úsekov. Aj pri použití milióna čítaní pre každú vzorku bol výsledkom skladania vo všetkých prípadoch iba jeden jediný kontig (dlhšia sekvencia vytvorená skladaním na základe prekryvov krátkych čítaní), čo preukazuje dominantnú prítomnosť.

Vysoko kvalitné kontigy plazmidov (príloha so sekvenciami) získané bioinformatickým *de novo* skladaním sme následne použili na tzv. mapovanie všetkých sekvencií na stanovenie podielu čítaní prislúchajúcich tomuto plazmidu v jednotlivých vzorkách šarží vakcín.

Čítania pochádzajúce z plazmidu tvorili v priemere 96,62 % (95,26 % - 98,08 %) celkových čítaní pri vakcínach Comirnaty a 88,71 % (83,52 % - 94,51 %) pri vakcínach Spikevax.

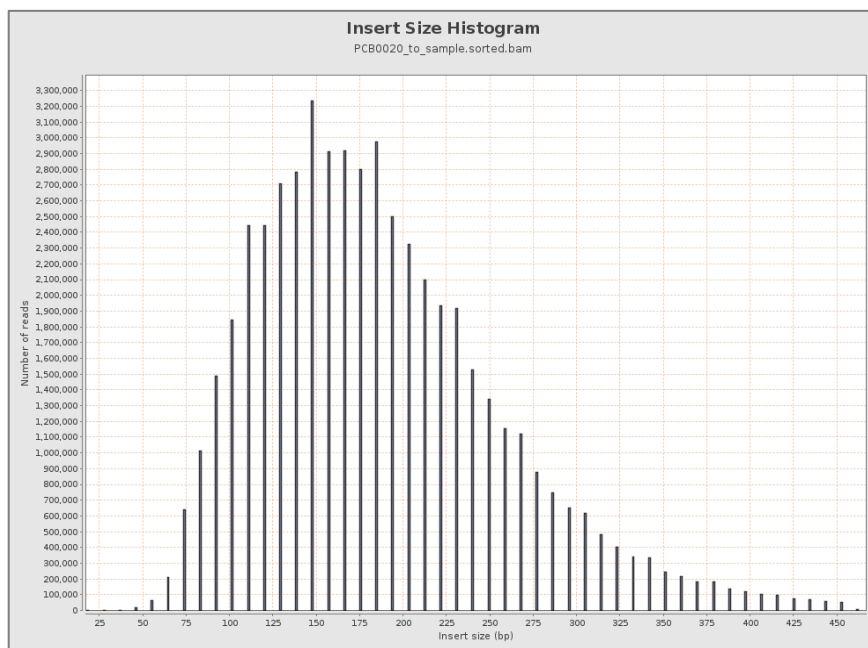
Tab.5

Parametre čítaní sekvencií zvyškovej DNA analyzovaných šarží vakcín

Šarža	Počet čítaní	Počet mapovaných čítaní	Podiel mapovaných čítaní	Medián dĺžky fragmentu
FP9632	128 633 986	124 303 165	96,63 %	161
1F1051A	128 754 938	126 281 087	98,08 %	155
1L084A	114 100 030	109 945 922	96,36 %	130
1F1059A	129 743 660	123 597 428	95,26 %	134
PCB0020	110 126 612	105 815 251	96,09 %	181
LK8456	200 055 240	194 161 206	97,05 %	165
LK8842	195 186 178	188 261 908	96,45 %	136
LM9076	195 994 470	189 729 969	96,80 %	170
LN0605	198 887 382	192 564 352	96,82 %	153
000058A	103 869 046	90 339 760	86,97 %	131
3005697	103 602 508	93 207 924	89,97 %	201
200023A	122 199 366	115 491 409	94,51 %	142
200106A	107 421 496	89 717 345	83,52 %	132
MV1018A	96 552 136	88 102 825	91,25 %	128
400012A	102 951 692	88 568 921	86,03 %	127

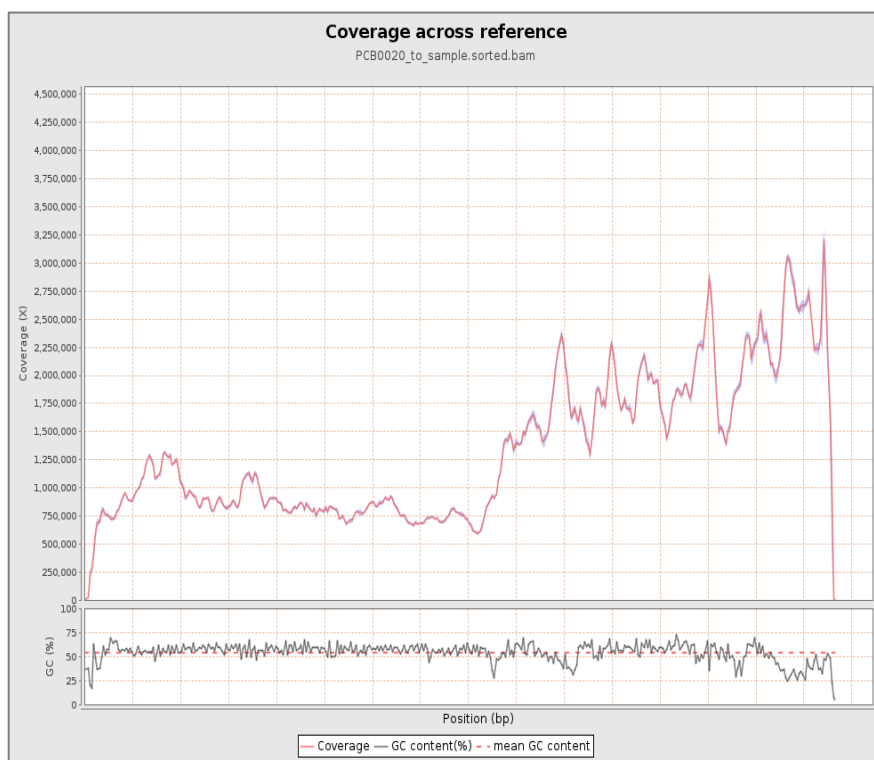
Zostávajúce čítania boli podrobené analýze pomocou BLAST no v drvivej väčšine bez signifikantnej podobnosti s akýmkoľvek záznamom v globálnej databáze nukleotidových sekvencií ENA/GenBank. Vzhľadom na nízke vstupné množstvo DNA ide pravdepodobne o fenomén kontaminácie východiskových roztokov popísaný v práci *Asplund et al. (Clin Microbiol & Infect, 2019)*.

Keďže sme pri sekvenovaní použili párové čítania, teda sekvenovanie z oboch koncov fragmentov, bolo možné stanoviť presnú dĺžku týchto fragmentov. Z tejto analýzy vypláva, že DNA je silno degradovaná a priemerné dĺžky sekvenovaných fragmentov boli 154 báz (rozptyl priemerných hodnôt 130 - 181) pri vakcínach Comirnaty a 144 báz (rozptyl 127 - 201) pri vakcínach Spikevax.



Obr. 2.5.4
Ukážka dĺžkového profilu
sekvenovaných fragmentov
(Comirnaty šarža PCB0020).

Pokrytie genómu bolo vo všetkých vzorkách značne nehomogénne, pravdepodobne v dôsledku nerovnomernej degradácie genetického materiálu.



Obr. 2.5.5
Ukážka pokrytia referenčnej
sekvencie plazmidu
mapovanými čítaniami
(Comirnaty šarža PCB0020)

Nižšie uvádzame reprezentatívne sekvencie získané druhogeneračným sekvenovaním v rámci tejto analýzy s vyznačením základnej kompozície templátovej DNA:

>1F1051A Comirnaty

```
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAGAGCTCCAACCGGTGTGGTAGCTCCGCC
GTTTAACATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGAGATCCAATTTTAAAGTGTA
TAATGTGTAACTACTGATTCTAATTGTTTGTGTATTTTAGATTACAGTCCCAAGGCTCATTTTCAG
GCCCCTCAGTCCTCACAGTCTGTTTCATGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTG
CTTTAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAAC
TTGTTTATTGTCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATT
TTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTAACGCGTAAATTGTAAGC
```

>F1 origin of replication

```
GTTAATATTTTGTAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGA
AATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGGA
ACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGAT
GGCCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCG
GAACCCTAAAGGGAGCCCCCGATTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAG
GGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACC
ACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGG
```

<

```
AACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGAT
SV40 promoter/enhancer >
```

```
AAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAATCCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGTGGAATGTGTGTC
AGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAG
TCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAA
TTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCC
ATTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAG
CTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAGATCGATCAAGAGACAG
```

<

>Kan/Neo start

```
GATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAG
AGGCTATTTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTA
GCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAAGACGA
GGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTG
AAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCT
CCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTG
CCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCG
ATCAGGATGATCTGGACGAAGAACATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAAGTTCGCCAGGCTCAAGGCG
AGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGA
AAATGGCCGCTTTTCTGGATTTCATGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAG
CGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAACTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTAC
GGTATCGCCGCTCCCGATTTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGG
```

Kan/Neo stop <

```
ACTCTGGGGTTCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCCAACCTGCCATCACGAGATTTGATTCCACCGC
CGCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCG
GGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCCACCTAGGGGGAGGCTAACTGAAACACGGAAGGAGACAATA
CCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGCACGGTGTTGGGTGCTTTGT
TCATAAACGCGGGGTTCCGGTCCAGGGCTGGCACTCTGTGATACCCACCGAGACCCATTGGGGCC
AATACGCCGCGTTTCTTCCTTTTCCCCACCCACCCCAAGTTCGGGTGAAGGCCAGGGCTCGCA
GCCAACGTCGGGGCGGCAGGCCCTGCCATAGCCTCAGGTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAA
ACTTCATTTTAAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTT
```

>pUC origin of replication

```
AACGTGAGTTTTCGTTTCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCT
TTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCC
GGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTG
TTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCT
```


CTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAG
 ACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCTGGGCTGAACGGGGGGTTCTGTCACACAGCCCAGCTTGG
 AGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAA
 GGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCTGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCC
 AGGGGGAAACGCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCTGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTT
 TGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTTACGGTTCTCTG
 GCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTAT

<

>T7 promoter

TACCGCCATGCATTAGTTATTAATTAATACGACTCACTATAAGAATAAACTAGTATTCTTCTGGTCCC

SPIKE start >

CACAGACTCAGAGAGAACCCGCCACCATGTTTCGTGTTTCTGGTGCTGCTGCCTCTGGTGTCCAGCCAG
 TGTGTGAACCTGACCACCAGAACACAGCTGCCTCCAGCCTACACCAACAGCTTTACCAGAGGCGTGTA
 CTACCCCGACAAGGTGTTTCCAGATCCAGCGTGCTGCACTCTACCCAGGACCTGTTCTCTGCCTTTCTTCA
 GCAACGTGACCTGGTTCACGCCATCCACGTGTCCGGCACCAATGGCACCAAGAGATTCGACAACCC
 GTGCTGCCCTTCAACGACGGGGTGTACTTTGCCAGCACCGAGAAGTCCAACATCATCAGAGGCTGGAT
 CTTCCGGCACCACTGGACAGCAAGACCCAGAGCCTGCTGATCGTGAACAACGCCACCAACGTGGTCA
 TCAAAGTGTGCGAGTTCCAGTCTTGCAACGACCCCTTCTGGGCGTCTACTACCACAAGAACAACAAG
 AGCTGGATGGAAAGCGAGTTCCGGGTGTACAGCAGCGCCAACAACCTGCACCTTCGAGTACGTGTCCCA
 GCCTTTCTCTGATGGACCTGGAAGGCAAGCAGGGCAACTTCAAGAACCTGCGCGAGTTCGTGTTAAGA
 ACATCGACGGCTACTTCAAGATCTACAGCAAGCACACCCCTATCAACCTCGTGCGGGATCTGCCTCAG
 GGCTTCTCTGCTCTGGAACCCCTGGTGGATCTGCCCATCGGCATCAACATCACCCGGTTTCAGACACT
 GCTGGCCCTGCACAGAAGCTACCTGACACCTGGCGATAGCAGCAGCGGATGGACAGCTGGTGCCGCCG
 CTTACTATGTGGGCTACCTGCAGCCTAGAACCTTCTGCTGAAGTACAACGAGAACGGCACCATCACC
 GACGCCGTGGATTGTGCTCTGGATCCTCTGAGCGAGACAAAGTGCACCTGAAGTCTTACCGTGGA
 AAAGGGCATCTACCAGACCAGCAACTTCCGGGTGCAGCCCACCGAATCCATCGTGCGGTTCCCCAATA
 TCACCAATCTGTGCCCTTCCGCGAGGTGTTCAATGCCACCAGATTTCGCTCTGTGTACGCCTGGAAC
 CGGAAGCGGATCAGCAATTGCGTGGCCGACTACTCCGTGCTGTACAACCTCCGCCAGCTTCAGCACCTT
 CAAGTGCTACGGCGTGTCCCCTACCAAGCTGAACGACCTGTGCTTCACAAACGTGTACGCCGACAGCT
 TCGTGATCCGGGAGATGAAGTGCAGGAGATTGCCCTGGACAGACAGGCAAGATCGCCGACTACAAC
 TACAAGCTGCCCGACGACTTCACCGGCTGTGTGATTGCCTGGAACAGCAACAACCTGGACTCCAAAGT
 CGGCGGCAACTACAATTACCTGTACCGGCTGTTCCGGAAGTCCAATCTGAAGCCCTTCGAGCGGGACA
 TCTCCACCGAGATCTATCAGGCCGGCAGCACCCCTTGTAACGGCGTGGAAGGCTTCAACTGCTACTTC
 CCACTGCAGTCTTACGGCTTTTACGCCACAAATGGCGTGGGCTATCAGCCCTACAGAGTGGTGGTGCT
 GAGCTTCGAAGTCTGTCATGCCCCTGCCACAGTGTGCGGCCCTAAGAAAAGCACCAATCTCGTGAAGA
 ACAATGCGTGAACCTTCAACTTCAACGGCCTGACCGGCACCGGCGTGCTGACAGAGAGCAACAAGAAG
 TTCTTGCCATTCCAGCAGTTTGGCCGGGATATCGCCGATACCACAGACGCCGTTAGAGATCCCCAGAC
 ACTGGAAATCCTGGACATCACCCCTTGACGCTTCGGCGGAGTGTCTGTGATCACCCCTGGCACCAACA
 CCAGCAATCAGGTGGCAGTGCTGTACCAGGACGTGAACGTGACCGAAGTGGCGTGGCCATTACGCC
 GATCAGCTGACACCTACATGGCGGGTGTACTCCACCGGCAGCAATGTGTTTCAGACCAGAGCCGGCTG
 TCTGATCGGAGCCGAGCACGTGAACAATAGCTACGAGTGCGACATCCCCATCGGCGCTGGAATCTGCG
 CCAGCTACCAGACACAGACAAACAGCCCTCGGAGAGCCAGAAGCGTGGCCAGCCAGAGCATCATTGCC
 TACACAATGTCTCTGGGCGCCGAGAACAGCGTGGCCTACTCCAACAACCTCTATCGCTATCCCCACCAA
 CTTACCATCAGCGTGACCACAGAGATCCTGCCTGTGTCCATGACCAAGACCAGCGTGGACTGCACCA
 TGTACATCTGCGGCGATTCCACCGAGTGCTCCAACCTGCTGCTGCAGTACGGCAGCTTCTGCACCCAG
 CTGAATAGAGCCCTGACAGGGATCGCCGTGGAACAGGACAAGAACACCCAAGAGGTGTTGCCCCAAGT
 GAAGCAGATCTACAAGACCCCTCCTATCAAGGACTTCGGCGGCTTCAATTTACGCCAGATTCTGCCCCG
 ATCCTAGCAAGCCAGCAAGCGGAGCTTCATCGAGGACCTGCTGTTCAACAAAGTGACACTGGCCGAC
 GCCGGCTTCATCAAGCAGTATGGCGATTGTCTGGGCGACATTGCCGCCAGGGATCTGATTTGCGCCCCA
 GAAGTTTAAACGGACTGACAGTGCTGCCTCCTCTGCTGACCGATGAGATGATCGCCCAGTACACATCTG
 CCTGCTGGCCGGCACAATCACAAGCGGCTGGACATTTGGAGCAGGCGCCGCTCTGCAGATCCCCCTTT
 GCTATGCAGATGGCCTACCGGTTCAACGGCATCGGAGTGACCCAGAATGTGCTGTACGAGAACCAGAA
 GCTGATCGCCAACAGTTCAACAGCGCCATCGGCAAGATCCAGGACAGCCTGAGCAGCACAGCAAGCG
 CCCTGGGAAAGCTGCAGGACGTGGTCAACCAGAATGCCAGGCACTGAACACCCTGGTCAAGCAGCTG
 TCCTCCAACCTTCGGCGCCATCAGCTCTGTGCTGAACGATATCCTGAGCAGACTGGACCCTCCTGAGGC
 CGAGGTGCAGATCGACAGACTGATCACAGGACAGCTGCAGAGCCTCCAGACATACGTGACCCAGCAGC
 TGATCAGAGCCGCCGAGATTAGAGCCTCTGCCAATCTGGCCGCCACCAAGATGTCTGAGTGTGTGCTG

GGCCAGAGCAAGAGAGTGGACTTTTGC GGCAAGGGCTACCACCTGATGAGCTTCCCTCAGTCTGCCCC
 TCACGGCGTGGTGTCTTCTGCACGTGACATATGTGCCCGCTCAAGAGAAGAATTTACCACCGCTCCAG
 CCATCTGCCACGACGGCAAAGCCCACCTTTCTAGAGAAGGCGTGTTCGTGTCCAACGGCACCCATTGG
 TTCGTGACACAGCGGAACCTTCTACGAGCCCCAGATCATCACCACCGACAACACCTTCGTGTCTGGCAA
 CTGCGACGTGCTGATCGGCATTGTGAACAATACCGTGTACGACCCTCTGCAGCCCGAGCTGGACAGCT
 TCAAAGAGGAACTGGACAAGTACTTTAAGAACCACACAAGCCCCGACGTGGACCTGGGCGATATCAGG
 GAATCAATGCCAGCGTCGTGAACATCCAGAAAAGAGATCGACCGGCTGAACGAGGTGGCCAAGAATCTG
 AACGAGAGCCTGATCGACCTGCAAGAAGTGGGGAAGTACGAGCAGTACATCAAGTGGCCCTGGTACAT
 CTGGCTGGGCTTTATCGCCGGACTGATTGCCATCGTGATGGTCACAATCATGCTGTGTTGCATGACCA
 GCTGCTGTAGCTGCCTGAAGGGCTGTTGTAGCTGTGGCAGCTGCTGCAAGTTCGACGAGGACGATTCT
 GAGCCCGTGCTGAAGGGCGTGAACTGCACTACACATGATGACTCGAGCTGGTACTGCATGCACGCAA

<SPIKE stop

TGCTAGCTGCCCCCTTTCCCGTCCTGGGTACCCCGAGTCTCCCCGACCTCGGGTCCCAGGTATGCTCC
 CACCTCCACCTGCCCCACTCACCACCTCTGCTAGTTCCAGACACCTCCCAAGCACGCAGCAATGCAGC
 TCAAAACGCTTAGCCTAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAACCTTTAGCAATAAACGAAA
 GTTTAACTAAGCTATACTAACCCACAGGGTTGGTCAATTTTCGTGCCAGCCACACCCTGGAGCTAGCAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCATATGACTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAA

>000058A SPIKEVAX

AAAAAAAAAAAAATCTAGACATCCCTTCAGAGTCCCGGGTAGCATAAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGG
 GTCTTGAGGGGTTTTTTGCGAGCTCGGTACCCAGCCCCGACGAGCTTCATGCCGTTAGTCGCACTGCA
 AGGGGTGTTATGAGCCATATTCAGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTTTCAAGATTGGTTAATTGGTT
 GTAACACTGACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATA

>Kan start

ACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAATATGAGCCATATTC AACGGGAAACGTGCA
 GGCCGCGATTAAATTTCCAACATGGACGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTGCGG
 CAATCAGGTGCGACAATCTATCGCTTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGG
 CAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAAACTGGCTGACGGAATTTATGC
 CACTTCCGACCATCAAGCATTTTATCCGTACTCCTGATGATGCATGGTTACTCACCCTGCGATCCCC
 GGAAAAACAGCGTTCCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGC
 AGTGTTCTGCGCGGTTGCACTCGATTCTGTTTGTAAATGTCCTTTTAAACAGCGATCGCGTCTTCC
 GTCTTGACACAAGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTGTATGACGAGCGT
 AATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAGAAATGCATAAACTTTTGCCATTCTCACC GGATTCACT
 CGTCACTCATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTAATAGTTGTATTG
 ATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATACCAGGATCTTGCCATTCTATGGAAGTGCCTCGGTGAG
 TTTTCTCCTTCATTACAGAAACGGCTTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAATT
 GCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAAGCAGAGCATTACGCTGACTTGACGGGACGGCGCA

<Kan stop

AGCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTACGCGCGCGTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAG

>pUC origin of replication

AAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAA
 CCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAACCTGG
 CTTACAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGA
 ACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGAT
 AAGTCGTGTCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAAC
 GGGGGGTTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTG
 AGCTATGAGAAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTC
 GGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTT
 TCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGA AAAACG

<

CCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGCTGCGCTTTTGTCTCACATGTTCTTTCTGCG
 TTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCTGCTCGCCGACGCCGAACGACCGAGCGCAGCG
 AGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGGCGAGAGTAGGGAAGTCCAGGCATCAAATAAGCAGAAGGCC
 CTGACGCATGGCCTTTTTGCGTTTCTACAACTCTTTCTGTGTTGTAAAACGACGGCCAGTCTTAAGC
 TCGGGCCCTTTTCCGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGAATTCGATCCGGCTCAAGCTTTTGGACCC

```

>T7 promoter
TCGTACAGAAGCTAATACGACTCACTATAGGGAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAA
SPIKE start>
GACCCCGGCGCCGCCACCATGTTCGTGTTCTGGTGCTGCTGCCCCCTGGTGAGCAGCCAGTGCGTGAA
CCTGACCACCCGGACCCAGCTGCCACCAGCCTACACCAACAGCTTCACCCGGGGCGTCTACTACCCCG
ACAAGGTGTTCCGGAGCAGCGTCTTGACAGCACCAGGACCTGTTCTGCCCCTTCTTCAGCAACGTG
ACCTGGTTCCACGCCATCCACGTGAGCGGCACCAACGGCACCAAGCGGTTTCGACAACCCCGTGCTGCC
CTTCAACGACGGCGTGTAATTCGCCAGCACCAGAGAAGAGCAACATCATCCGGGGGCTGGATCTTCGGCA
CCACCCTGGACAGCAAGACCCAGAGCCTGCTGATCGTGAATAACGCCACCAACGTGGTGATCAAGGTG
TGCGAGTTCCAGTTCTGCAACGACCCCTTCTGGGCGTGTAATACCACAAGAACAACAAGAGCTGGAT
GGAGAGCGAGTTCCGGGTGTACAGCAGCGCCAACAACCTGCACCTTCGAGTACGTGAGCCAGCCCTTCC
TGATGGACCTGGAGGGCAAGCAGGGCAACTTCAAGAACCTGCGGGAGTTCGTGTTCAAGAACATCGAC
GGCTACTTCAAGATCTACAGCAAGCACACCCCAATCAACCTGGTGCGGGATCTGCCCCAGGGCTTCTC
AGCCCTGGAGCCCTGGTGACCTGCCCATCGGCATCAACATCACCCGGTTCAGACCCCTGCTGGCCC
TGCACCGGAGCTACCTGACCCCGAGCGACAGCAGCAGCGGGTGACAGCAGGCGCGGCTGCTTACTAC
GTGGGCTACCTGCAGCCCCGACCTTCTGCTGAAGTACAACGAGAACGGCACCATCACCGACGCCGT
GGACTGCGCCCTGGACCCTCTGAGCGAGACCAAGTGCACCCCTGAAGAGCTTCACCGTGGAAGGGCA
TCTACCAGACCAGCAACTTCCGGGTGCAGCCACCGAGAGCATCGTGCGGTTCCCAACATCACCAAC
CTGTGCCCCCTTCGGCGAGGTGTTCAACGCCACCCGGTTCGCCAGCGTGTACGCCTGGAACCGGAAGCG
GATCAGCAACTGCGTGCGCGACTACAGCGTGCTGTACAACAGCGCCAGCTTCAGCACCTTCAAGTGCT
ACGGCGTGAGCCCCACCAAGCTGAACGACCTGTGCTTACCAACGTGTACGCCGACAGCTTCGTGATC
CGTGGCGACGAGGTGCGGCAGATCGCACCCGGCCAGACAGGCAAGATCGCCGACTACAACCTACAAGCT
GCCCCAGCACTTCACCGGCTGCGTGATCGCCTGGAACAGCAACAACCTCGACAGCAAGGTGGGCGGCA
ACTACAACCTACCTGTACCGGCTGTTCCGGAAGAGCAACCTGAAGCCCTTCGAGCGGGACATCAGCACC
GAGATCTACCAAGCCGGCTCCACCCCTTGCAACGGCGTGAGGGCTTCAACTGCTACTTCCCTCTGCA
GAGCTACGGCTTCAGCCACCAACGGCGTGCGCTACCAGCCCTACCGGGTGGTGCTGAGCTTCG
AGCTGCTGCACGCCCCAGCCACCGTGTGTGGCCCCAAGAAGAGCACCAACCTGGTGAAGAACAAGTGC
GTGAATTCAACTTCAACGGCCTTACCGGCACCGCGTGCTGACCGAGAGCAACAAGAAATTCCTGCC
CTTTCAGCAGTTTCGGCCGGGACATCGCCGACACCACCGACGCTGTGCGGGATCCCCAGACCCTGGAGA
TCCTGGACATCACCCCTTGACGCTTCGGCGGCGTGAGCGTGATCACCCAGGCACCAACACCAGCAAC
CAGGTGGCCGTGCTGTACAGGACGTGAAGTGCACCGAGGTGCCCGTGCCATCCACGCCGACCAGCT
GACACCCACCTGGCGGGTCTACAGCACCAGGACGCAACGTGTTCCAGACCCGGGCGGTTGCCTGATCG
GCGCCGAGCAGTGAACAACAGCTACGAGTGCGACATCCCCATCGGCGCCGGCATCTGTGCCAGCTAC
CAGACCCAGACCAATTACACCCGGAGGGCAAGGAGCGTGCCAGCCAGAGCATCATCGCCTACACCAT
GAGCCTGGGCGCCGAGAACAGCGTGCCCTACAGCAACAACAGCATCGCCATCCCCACCAACTTCACCA
TCAGCGTGACCACCGAGATTCTGCCCCTGAGCATGACCAAGACCAGCGTGGAATGCACCATGTACATC
TGCGGCGACAGCACCAGTGACAGCAACCTGCTGCTGCAGTACGGCAGCTTCTGCACCCAGCTGAACCG
GGCCCTGACCGGCATCGCCGTGGAGCAGGACAAGAACACCCAGGAGGTGTTGCGCCAGGTGAAGCAGA
TCTACAAGACCCCTCCCATCAAGGACTTCGGCGGCTTCAACTTCAGCCAGATCCTGCCCGACCCAGC
AAGCCAGCAAGCGGAGCTTCATCGAGGACCTGCTGTTCAACAAGGTGACCCTAGCCGACGCCGGCTT
CATCAAGCAGTACGGGACTGCCTCGGCGACATAGCCGCCCGGGACCTGATCTGCGCCAGAAGTTCA
ACGGCCTGACCGTGCTGCCTCCCTGCTGACCGACGAGATGATCGCCAGTACACAGCGCCCTGTTA
GCCGGAACCATCACAGCGGCTGGACTTTCGGCGCTGGAGCCGCTCTGCAGATCCCCTTCGCCATGCA
GATGGCCTACCGGTTCAACGGCATCGGCGTGACCCAGAACGTGCTGTACGAGAACCAGAAGCTGATCG
CCAACCAGTTCAACAGCGCCATCGGCAAGATCCAGGACAGCCTGAGCAGCACCCTAGCGCCCTGGGC
AAGCTGCAGGACGTGGTGAACCAGAACGCCAGGCCCTGAACACCCTGGTGAAGCAGCTGAGCAGCAA
CTTCGGCGCCATCAGCAGCGTGCTGAACGACATCCTGAGCCGGCTGGACCCCTCCCGAGGCCGAGGTGC
AGATCGACCGGCTGATCACTGGCCGGCTGCAGAGCCTGCAGACCTACGTGACCCAGCAGCTGATCCGG
GCCGCCGAGATTTCGGGCCAGCGCCAACCTGGCCGCCACCAAGATGAGCGAGTGCGTGCTGGGCCAGAG
CAAGCGGGTGGACTTCTGCGGCAAGGGCTACCACCTGATGAGCTTTCCCCAGAGCGCACCCACCGGAG
TGGTGTTCTGTCACGTGACCTACGTGCCCCGCCAGGAGAAGAACTTCACCACCGCCCCAGCCATCTGC
CACGACGGCAAGGCCCACTTTCCCCGGGAGGGCGTGTTCTGTGAGCAACGGCACCCACTGGTTCTGTGAC
CCAGCGGAACCTTCTACGAGCCCCAGATCATCACACCGACAACACCTTCGTGAGCGGCAACTGCGACG
TGGTGATCGGCATCGTGAACAACACCGTGTACGATCCCCTGCAGCCCGAGCTGGACAGCTTCAAGGAG
GAGCTGGACAAGTACTTCAAGAATCACACCAGCCCCGACGTGGACCTGGGCGACATCAGCGGCATCAA
CGCCAGCGTGGTGAACATCCAGAAGGAGATCGATCGGCTGAACGAGGTGGCCAAGAACCTGAACGAGA
GCCTGATCGACCTGCAGGAGCTGGGCAAGTACGAGCAGTACATCAAGTGGCCCTGGTACATCTGGCTG

```

```

GGCTTCATCGCCGGCCTGATCGCCATCGTGATGGTGACCATCATGCTGTGCTGCATGACCAGCTGCTG
CAGCTGCCTGAAGGGCTGTTGCAGCTGCGGCAGCTGCTGCAAGTTCGACGAGGACGACAGCGAGCCCG
TGCTGAAGGGCGTGAAGCTGCACTACACCTGATAATAGGCTGGAGCCTCGGTGGCCTAGCTTCTTGCC
                                <SPIKE stop
CCTTGGGCCTCCCCCAGCCCCCTCCTCCCCCTTCCTGCACCCGTACCCCGTGGTCTTTGAATAAAGTC
TGAGTGGGCGGCACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

ZÁVER:

Sekvenačná analýza pomocou druhogeneračného vysokoparalelného sekvenovania dokázala, že prítomná zvyšková DNA je silno degradovaná a v podobe veľmi krátkych fragmentov, ktoré v drvivej väčšine prislúchajú plazmidovej DNA, ktorá slúžila ako templát pri výrobe mRNA ako účinnej látky vakcíny. Stanovené priemerné dĺžky sekvenovaných fragmentov DNA boli od 130 do 181 bp (priemer 154 bp) pri vakcínach Comirnaty a od 127 do 201bp (priemer 144 bp) pri vakcínach Spikevax.

Vo vakcíne sa nenachádza ani jedna neporušená molekula celého DNA plazmidu.

Vysokoparalelným druhogeneračným sekvenovaním sme zistili prítomnosť sekvencií fragmentov, z ktorých bolo možné rekonštruovať sekvencie plazmidovej DNA. Podiel čítaní prislúchajúcich DNA plazmidu bol od 95,26 % do 98,08 % (priemer 96,62 %) pri vakcínach Comirnaty a od 83,52 % do 94,51 % (priemer 88,71 %) pri vakcínach Spikevax. Zostávajúce čítania považujeme za sekvenačné artefakty.

Pre zhrnutie, dokázali sme, že prítomná zvyšková DNA je vysoko degradovaná na krátke fragmenty pochádzajúce z plazmidového templátu, ktorý bol z hľadiska výroby vakcín východiskovou surovinou.

3. ANALÝZA PRÍTOMNOSTI INÝCH LÁTOK POMOCOU RAMANOVEJ SPEKTROSKOPIE

Ramanova spektroskopia je technikou pre identifikáciu chemických väzieb a štruktúr organických a anorganických materiálov prostredníctvom špecifických, tzv. „fingerprint“ pásov a ich relatívnych intenzít (Mayorga et al, *bioRxiv*, 2025). Zároveň ide o relatívne rýchlu, neinvazívnu analytickú techniku vhodnú aj na identifikáciu chemického zloženia biologických a farmaceutických vzoriek vrátane vakcín (Movasaghi et al, *Appl Spectroscopy Rev*, 2007).

Súčasná mRNA vakcína sú formulované tak, aby mRNA bola chránená lipidovými nanočasticami (LNP), ktoré zároveň sprostredkujú jej doručenie do buniek (Hou et al, *Nat Rev Materials*, 2021, Tenchov et al, *ACS Nano*, 2021). Výskum lipidových nanočastíc (LNP) ako dopravcov malých molekúl do buniek je rozsiahla vedecká oblasť skúmaná už od 60-tych rokov minulého storočia, kedy ich veda poznala najskôr pod názvom „lipozómy“. S príchodom nových odvetví nanovied a nanotechnológií, približne od 90-tych rokov, sa pre ne začal používať názov lipidové nanočastice (LNP) (Sharma & Agrawal, *Materials Today*, 2021). Aplikácia LNP sa postupne rozšírila do ďalších odvetví akými sú zobrazovacie metódy v medicíne, kozmetický priemysel, výživa (doplňky), poľnohospodárstvo a mnoho ďalších inovatívnych zameraní ako sú napríklad nanoreaktory. V súčasnosti sa LNP venuje veľká pozornosť ako hlavným komponentom COVID-19 mRNA vakcín (Tenchov et al, *ACS Nano*, 2021). Tieto lipidové nanočastice sa skladajú zo štyroch komponentov: ionizovateľný kationový lipid, ktorý slúži na zabudovanie do častíc veľkosti vírusov (~100 nm) a umožňuje tým uvoľnenie mRNA z endozómov do cytoplazmy; ďalej lipidovú zložku modifikovanú polyetylén glykolovými (PEG) reťazcami pre zabezpečenie dlhšej doby životnosti; cholesterol ako stabilizátor zloženia a prirodzene sa vyskytujúce fosfolipidy posilňujúce štruktúru lipidovej dvojvrstvy (Pardi et al, *Nat Rev Drug Discovery*, 2018).

PRINCÍP METÓDY:

Ramanova spektroskopia umožňuje detegovať charakteristické vibrácie typické pri lipidickej reťazce približne v oblasti CH_2/CH_3 stretching vibrácií pri ~2850-2950 cm^{-1} , pásy v oblasti ~1440 cm^{-1} (scissoring, deformačné) a pásy v oblasti ~800-1200 cm^{-1} špecifické pre P-O stretching vibrácie fosfátových pufrov spolu s C-O vibráciami väzieb sacharidov (Czamara et al, *J Raman Spectroscopy*, 2015, Gao et al, *Int J Agric & Biol Eng*, 2017). Tým je možné overiť prítomnosť lipidovej nanočasticovej matrice a zložiek vakcín aj po usušení na pevnom substráte.

Verejná diskusia o bezpečnosti mRNA vakcín proti ochoreniu COVID-19 priniesla aj rôzne nepravdivé tvrdenia o prítomnosti nežiadúcich nanomateriálov, predovšetkým grafén oxidu. Grafén oxid má veľmi charakteristické Ramanove pásy: D-pás v oblasti ~1345 cm^{-1} a G-pás okolo ~1580 cm^{-1} , ktoré sú veľmi dobre a jasne detegovateľné (Ferrari a Robertson, *Physical Reviews B*, 2000, Eigler a Hirsch, *Angewandte Chemie Int Edition*, 2014).

Ramanovu spektroskopiu, ktorá bola uskutočnená v Chemickom ústav SAV, v. v. i., sme využili na analýzu mRNA vakcín Comirnaty a Spikevax s cieľom potvrdiť prítomnosť iných látok a overiť, či obsahuje alebo neobsahuje signatúru grafén oxidu.

OPIS POSTUPOV:

Ramanove spektrá boli namerané na prístroji DXR Raman Microscope (Thermo Electron Scientific Instruments LLC, Madison, USA). Merania sa uskutočňovali pri laboratórnej teplote v rozsahu 50-3500 cm^{-1} . Ako excitačný zdroj bol použitý 532 nm laser s maximálnym výkonom 10 mW. Správnosť polohy Ramanových pásov bola pravidelne kalibrovaná pomocou polystyrénového štandardu.

Vzorky boli analyzované v rôznych bodoch vzorky s použitím objektívov so zväčšeniami 10, 20x, 50x–100x v závislosti od požadovaného rozlíšenia a charakteru vzorky. Všetky namerané spektrá boli

upravené korekciou fluorescencie s cieľom odstrániť nežiaduci podiel pozadia. Parametre merania zahŕňali data spacing 4 cm^{-1} FT, trvanie jednotlivých expozícií 2 s a celkový počet akumulácií 30. Spektrá z každej vzorky boli zmerané minimálne z 10 pozícií.

Na prípravu vzoriek bolo použitých 5 μL vakcíny alebo štandardného roztoku; tieto vzorky boli nanosené na pevný substrát (podložné sklíčko), a následne sa nechali vysušiť pri laboratórnej teplote. Analýza Ramanovou spektroskopiou bola vykonaná ihneď po vysušení vzorky, aby sa minimalizovala degradácia alebo kontaminácia.

Štandardy boli zakúpené od spoločnosti Merck KGaA, Darmstadt, Nemecko. Zahŕňali grafén oxid, redukovaný grafén oxid, grafit, trometamol, cholesterol, metoxypolyetylénglykoly(2000)-*N,N*-ditetradecylacetamid (ALC-0159) (**STD1**), 6-((2-hexyldekanoyl)oxy)-*N*-(6-((2-hexyldekanoyl)oxy)hexyl)-*N*-(4-hydroxybutyl)hexán-1-amínium (ALC-0315) (**STD2**), 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-fosfocholín (DSPC, v tomto texte bude látka označovaná aj ako **STD3**) a sacharózu.

Podľa deklarovaného zloženia vakcíny Spikevax obsahujú lipidy štruktúrne nepatrne odlišné od ALC-0159 a ALC-0315 – konkrétne boli použité lipidy s označením PEG₂₀₀₀-DMG a SM102. Kvôli zhode funkčných skupín a typov väzieb v príslušných molekulách sa v tejto práci predpokladá podobnosť Ramanových spektier ALC-0159 so spektrom PEG₂₀₀₀-DMG, a ALC-0315 so spektrom SM-102, s výnimkou prítomnosti esterovej funkčnej skupiny v PEG₂₀₀₀-DMG na rozdiel od amidovej funkčnej skupiny v ALC-0159. V práci sa aj pri vakcínach Moderna Spikevax budú spomínať lipidy ALC-0159 a ALC-0315 kvôli prehľadnosti.

Zo štandardov grafén oxidu a redukovaného grafén oxidu boli pripravené štandardné roztoky – suspenzie. Roztok č.1 obsahoval čistý grafén oxid (GO) a bol pripravený z 10,8 mg práškoveho grafén oxidu a destilovanej vody doplnenej na presný objem 50 ml.

Roztok č.2 obsahoval redukovaný grafén oxid (red-GO); bol pripravený z 11,9 mg práškoveho redukovaného grafén oxidu a destilovanej vody, ktorá bola doplnená na presný objem v 50 ml odmernej banke. Oba takto pripravené štandardné roztoky boli analyzované rovnakým spôsobom ako vzorky vakcín. Merané boli aj štandardy grafén oxidu a redukovaného grafén oxidu v tuhej fáze.

VÝSLEDKY:

Spoločné spektrálne znaky vzoriek

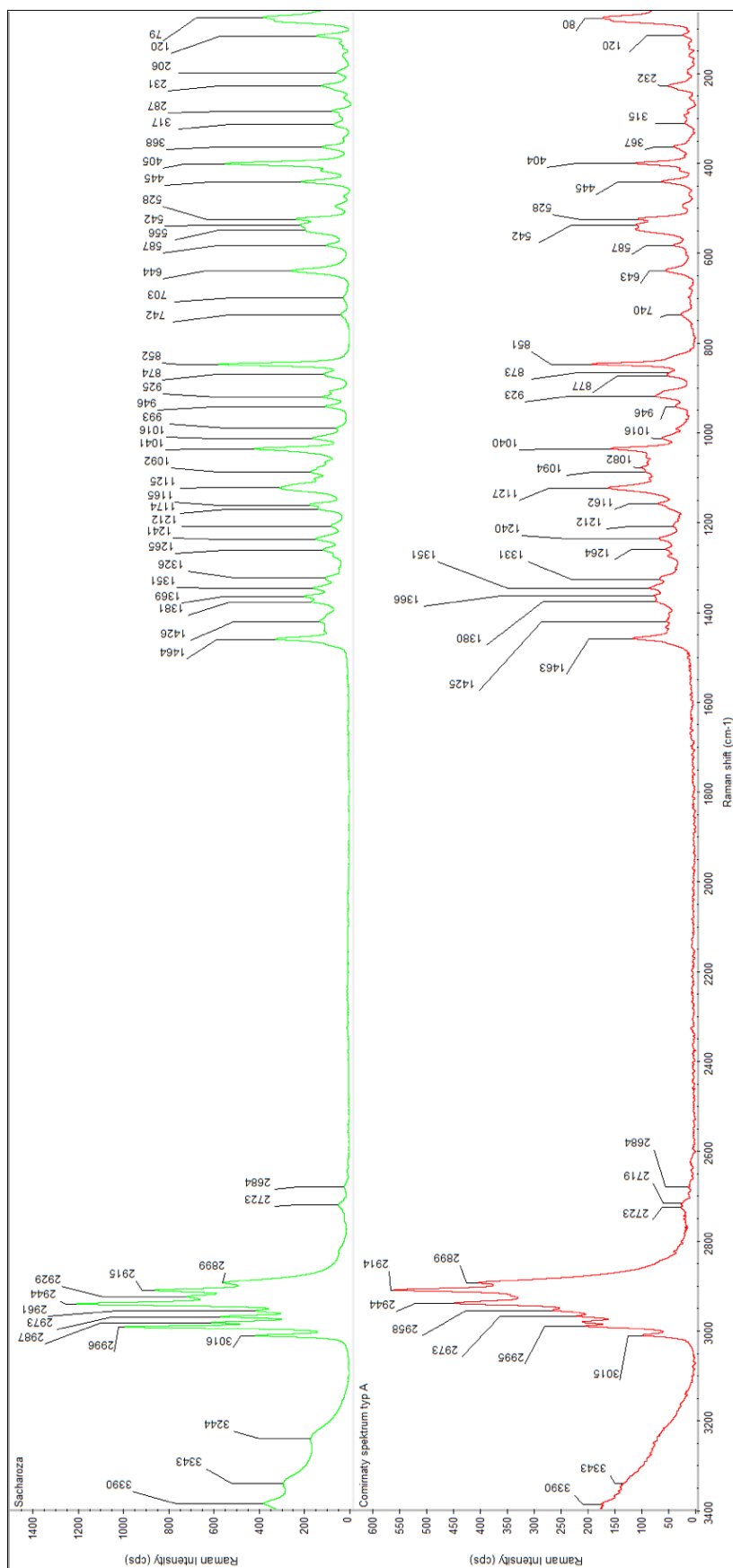
V štandardoch i vo vzorkách boli pozorované nasledujúce spektrálne charakteristiky:

- **Oblasť 2950–2850 cm^{-1}**
 - $\sim 2865\text{--}2855\text{ cm}^{-1}$ (symetrický *stretch*)
 - $\sim 2920\text{--}2905\text{ cm}^{-1}$ (asymetrický *stretch*)
- **Karbonylová oblasť $\sim 1740\text{--}1720\text{ cm}^{-1}$**
- **Fingerprint oblasť 1500–1000 cm^{-1}**
 - $\sim 1460\text{--}1440\text{ cm}^{-1}$ (CH_2 *bending*)
 - $\sim 1390\text{--}1370\text{ cm}^{-1}$ (CH_3 *bending*)
 - $\sim 1110\text{--}1090\text{ cm}^{-1}$ (C–O–C, C–C–O *stretch*)
- **Oblasť 900–500 cm^{-1}** - kruhové al. skeletálne vibrácie
- **Oblasť $\sim 2600\text{--}2400\text{ cm}^{-1}$** - kombinované vibrácie

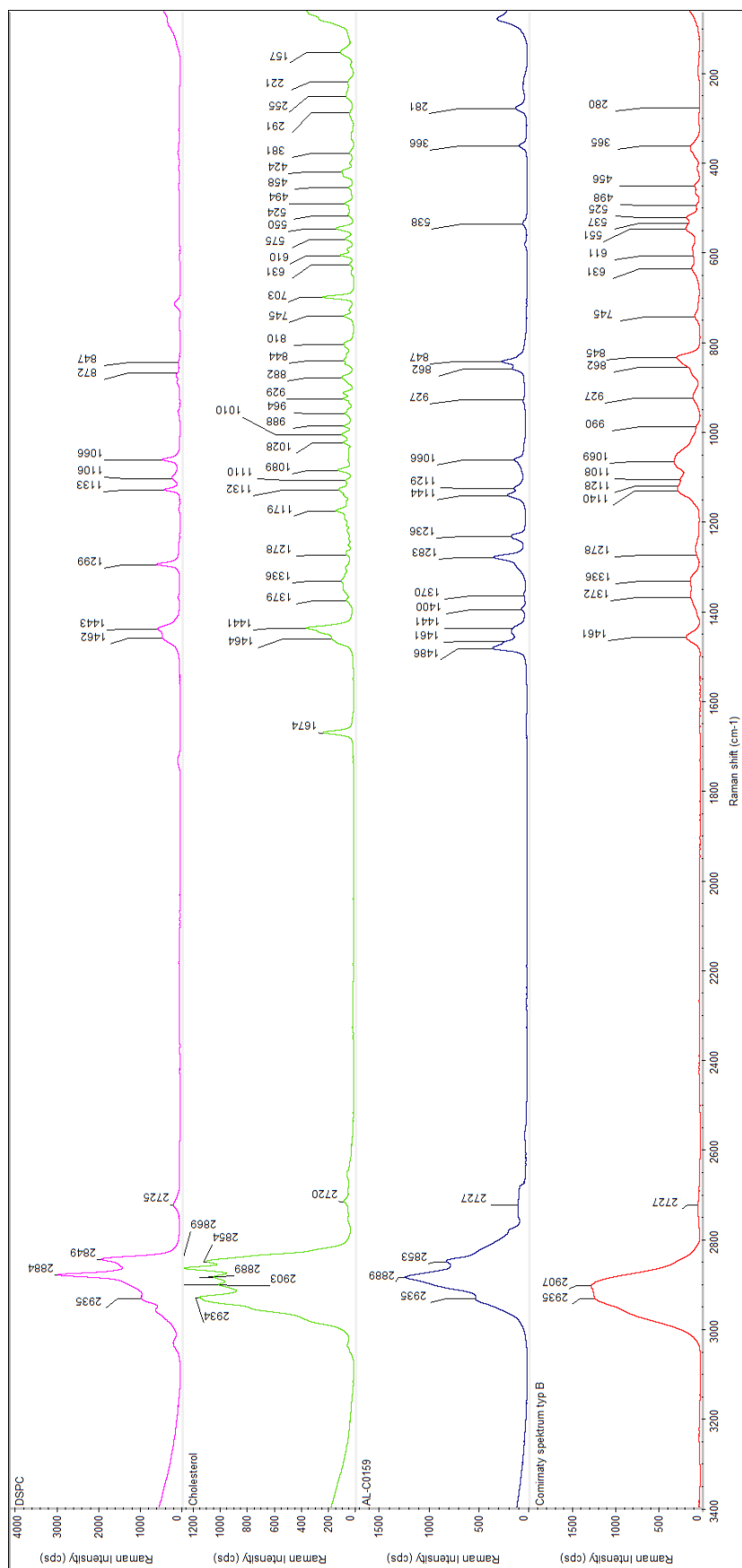
Všetky tieto oblasti naznačujú prítomnosť lipidových a sacharidových štruktúr (Czamara et al, *J Raman Spectroscopy*, 2015, Gao et al, *Int J Agric & Biol Eng*, 2017, Zhou et al, *J Pharm Analysis*, 2025, Pierna et al, *Biotech, Agron, Soc & Environ*, 2011).

Vo vzorkách vakcín Comirnaty a Spikevax sa opakovali tri základné typy spektier, ktoré sa v závislosti od vzorky jemne odlišovali v intenzitách niektorých pásov. Pre oba typy vakcín išlo o tri typy zmesných spektier, v ktorých boli identifikované charakteristické pásy zhodné s pásmi vyskytujúcimi sa v spektrách nameraných štandardov. Na základe porovnania všetkých nameraných spektier štandardov a vakcín (Obr. 3.1 – 3.6) spolu s vizuálnym charakterom vzoriek pod mikroskopom je možné

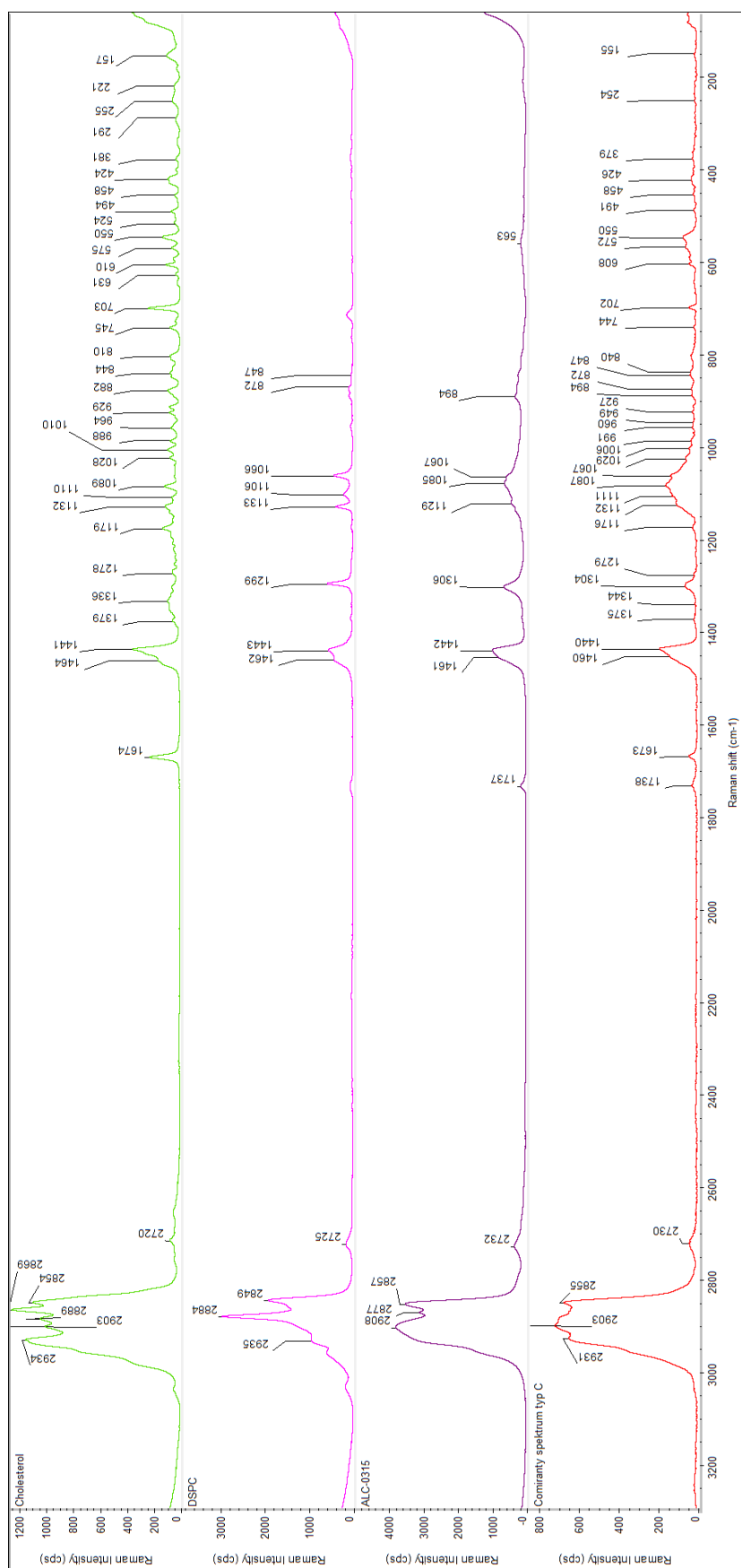
konštatovať, že všetky vzorky vykazovali konzistentný spektrálny profil oblastí charakteristických pre viacložkovú lipidovú nanočasticovú maticu (Hou et al, Nat Rev Materials, 2021, Tenchov et al, ACS Nano, 2021, Wilson a Geetha, J Drug Deliv Sci Technol, 2022, Rodà et al, Nanomaterials, 2023).



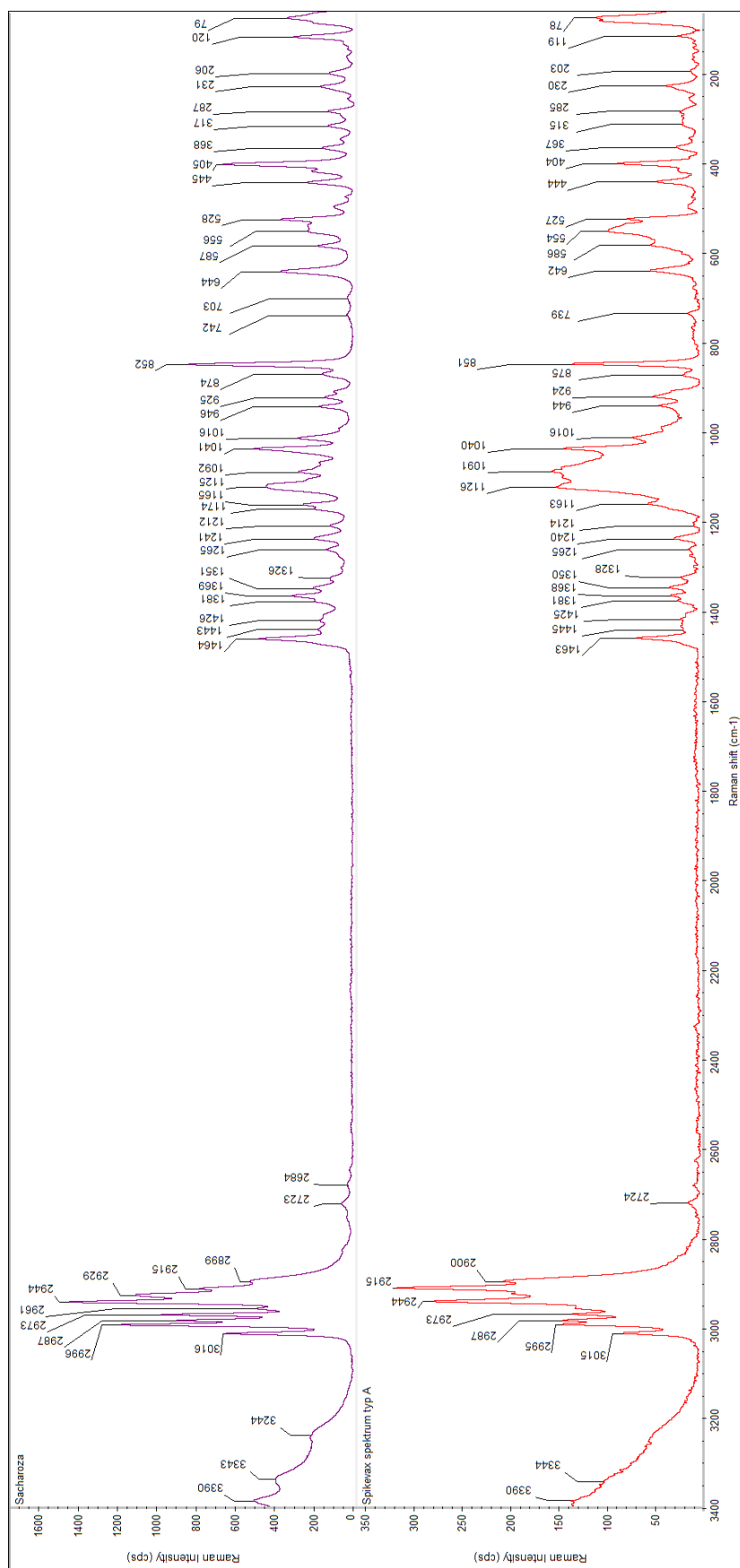
Obr. 3.1
Porovnanie Ramanových spektier Comirnaty typu A s príslušajúcim štandardom (sacharóza).



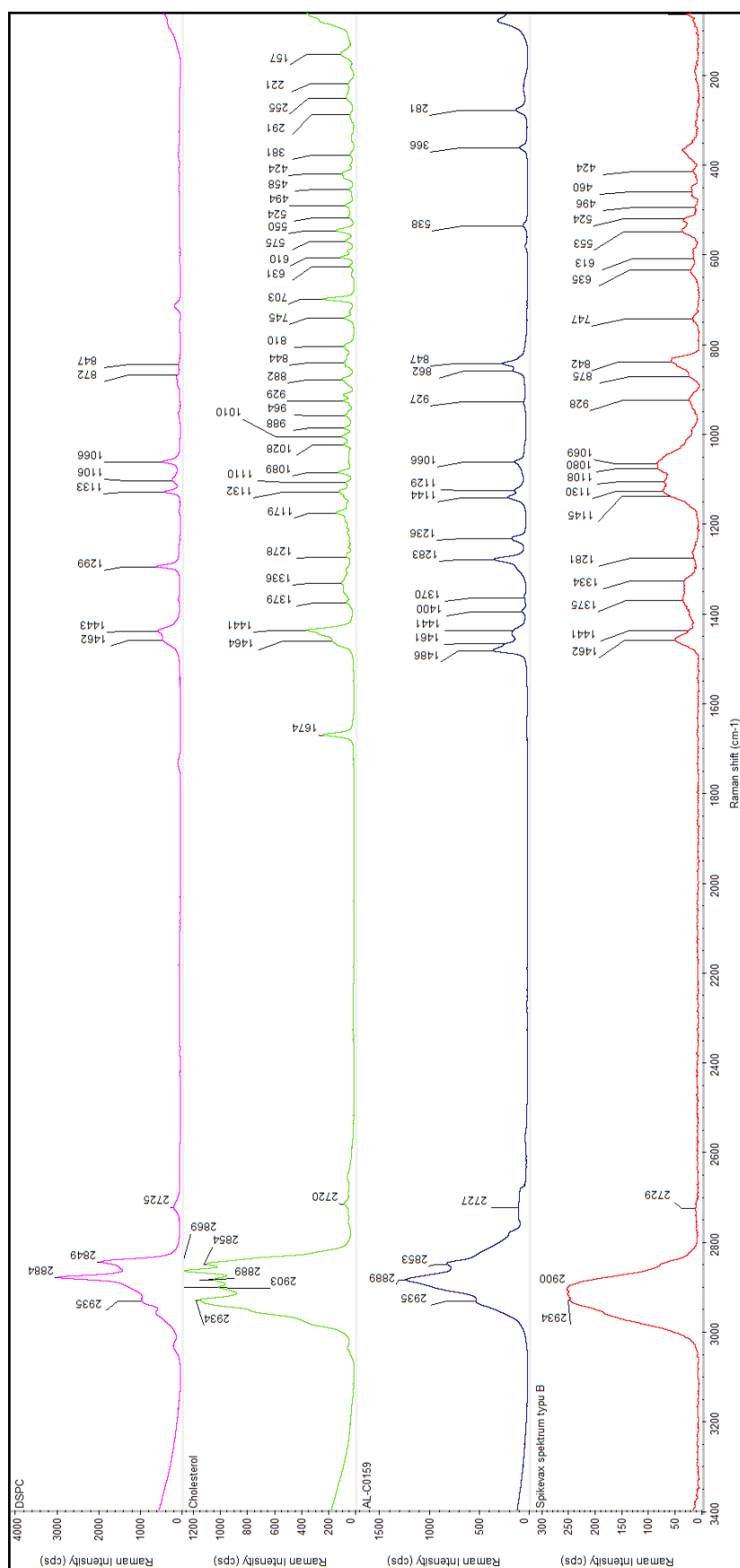
Obr. 3.2
Porovnanie Ramanových spektrier Comirnaty typu B s príslúchajúcimi štandardami (ALC-0159, cholesterol, DSPC).



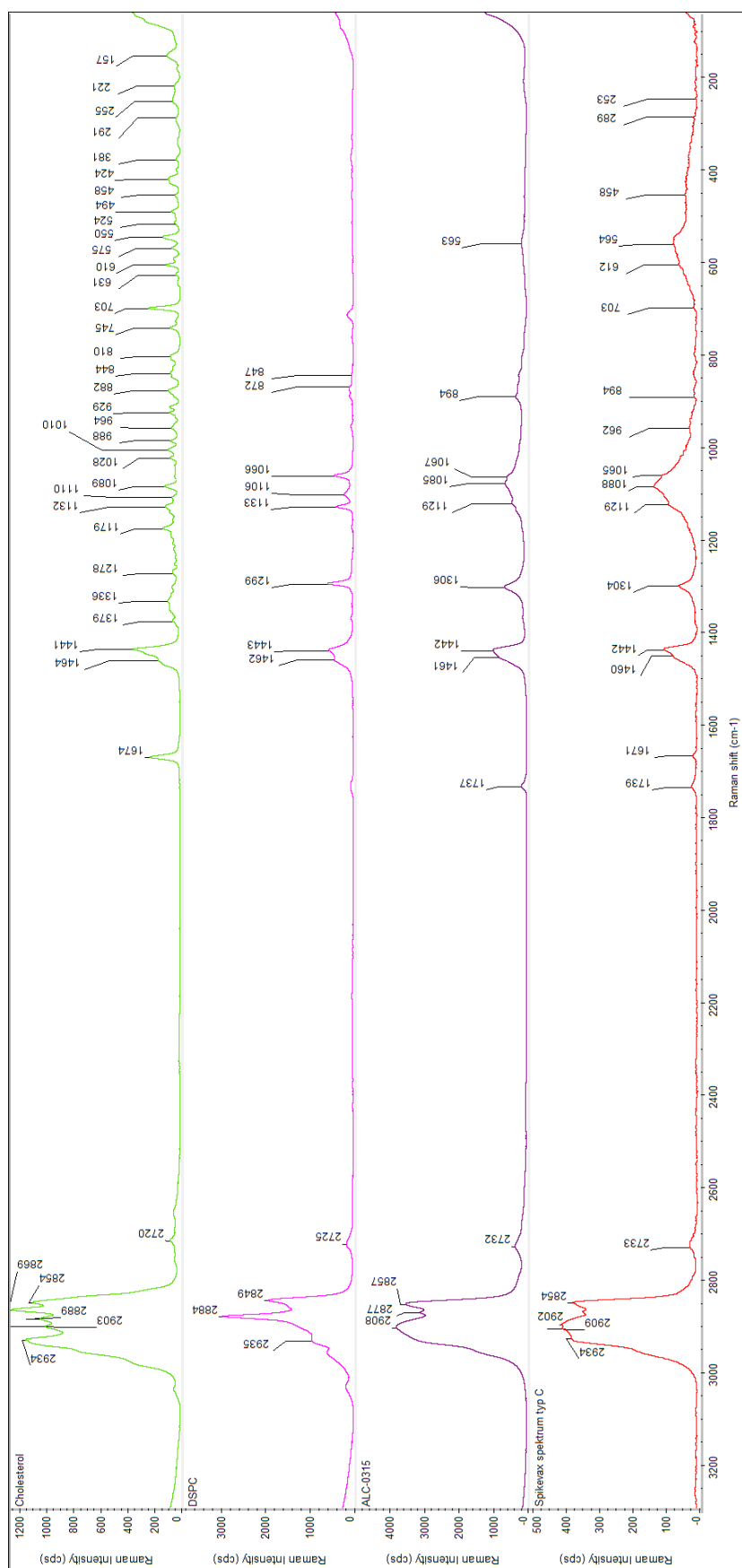
Obr. 3.3
Porovnanie Ramanových spektier Comirnaty typu C s príslúchajúcimi štandardami (ALC-0315, cholesterol, DSPC).



Obr. 3.4
Porovnanie Ramanových spektier Spikevax typu A s príslúchajúcim štandardom (sacharóza.)



Obr. 3.5
Porovnanie Ramanových spektier Spikevax typu B s príslušajúcimi štandardami (ALC-0159, cholesterol, DSPC).



Obr. 3.6
Porovnanie Ramanových spektier Spikevax typu C s príslúchajúcimi štandardami (ALC-0315, cholesterol, DSPC).

Prvým typom získaných spektier boli spektrá (Obr.3.1: spektrum **Comirnaty A**, a na Obr. 3.4: spektrum **Spikevax A**), ktorých pásy mali veľmi vysokú zhodu so štandardom sacharózy (Obr. 3.1). Spektrum typu **Comirnaty A**, rovnako ako spektrum typu **Spikevax A** malo identifikované pásy pri ~3390 typické pre O-H *stretching* vibrácie; ~2995-2899 cm^{-1} pre C-H *stretching* vibrácie v CH_2 , CH_3 skupinách; ~1463, 1425, 1380, 1366, 1351 pre CH_2 *bending*, C-C *stretching* vibrácie a ďalšie vibračné pásy pri ~1264, 1212, 1162, 1094, 1040, 1016 cm^{-1} zastupujúce -C-O, C-C a C-H *stretching/bending* vibrácie. Ďalšou veľkou skupinou sú kruhové vibrácie sacharidového skeletu a vibrácie glykozidovej väzby pri ~923, 873, 740, 703, 643 cm^{-1} (Pierna et al, Biotech, Agron, Soc & Environ, 2011). Spektrá typu A mali so spektrom štandardu sacharózy silnú zhodu nielen v pásoch vo všetkých kľúčových oblastiach, ale aj v relatívnych intenzitách pásov.

Okrem spektier s jasnými znakmi prítomnosti sacharózy bolo u všetkých vzoriek možné pozorovať ďalšie dva typy opakujúcich sa spektier. Tieto spektrá napriek svojmu veľmi komplexnému zmesnému charakteru sú dôkazom prítomnosti zmesi lipidových štruktúr vo všetkých vzorkách vakcín.

V druhom type spektier (viď Obr. 3.2: **Comirnaty spektrum typ B** a Obr. 3.5: **Spikevax spektrum typ B**) boli identifikované PEGylovaný lipid ALC-0159, cholesterol a čiastočne aj fosfolipid DSPC. Pre tento typ spektier bola spoločným znakom prítomnosť veľmi intenzívnych pásov v oblasti ~2940–2900 cm^{-1} – oblasť *stretching* vibrácií väzieb C-H z CH_2 a CH_3 skupín – významný charakteristický poznávací znak prítomnosti lipidových štruktúr a ich dlhých reťazcov s maximom približne pri 2910 cm^{-1} (Czamara et al, J Raman Spectroscopy, 2015). V rámci variability intenzít pásov medzi meraniami sa v niektorých prípadoch v spektrách vyskytol veľmi malý pás pri ~1670 cm^{-1} napovedajúci o väčšom podiele cholesterolu oproti zvyšným dvom identifikovaným zložkám spektra v konkrétnom bode vzorky na podložnom sklíčku (*stretching* vibrácie C=C väzby v skelete) (Rodà et al, Nanomaterials, 2023). Ďalšie silné pásy sa vyskytovali pri ~1460–1440 cm^{-1} (CH_2 *bending*) a ~1390–1370 cm^{-1} (CH_3 *bending*), ktoré sú charakteristické pre dlhé alkylové reťazce (Czamara et al, J Raman Spectroscopy, 2015). Pásy v rozmedzí 1200-1050 cm^{-1} sú typické pre C-C *stretching* vibrácie; pásy v úzkom rozsahu vlnočtov ~1110–1090 cm^{-1} boli priradené vibráciám väzieb C–O–C PEGylovaných lipidov (ALC-0159) (Kuzmin et al, J Mol Structure, 2020). Zvyšné pásy v oblastiach ~950–850 cm^{-1} a ~700–600 cm^{-1} súhlasia s príslušnými pásmi štandardov.

Tretím typom boli spektrá (Obr. 3.3: **Comirnaty spektrum typu C** a Obr. 3.6: **Spikevax spektrum typu C**). Tieto spektrá mali veľmi jasne definované pásy vo vysokej zhode so štandardmi ALC0315 a cholesterolu. Viaceré pásy typické pre ALC-0315 a cholesterol sa vyskytujú pri rovnakých alebo podobných vlnočtoch. V týchto prípadoch nie je možné jasne definovať, z ktorej z týchto dvoch látok tieto pásy pochádzajú. Počas viacerých meraní tieto pásy jemne varírovali v rámci intenzít, čo napovedá o rôznych pomeroch týchto zložiek vo formuláciách od dvoch rôznych firiem.

Spektrá **typu Comirnaty C** a **typu Spikevax C** vykazovali dominantné pásy predovšetkým v oblasti ~2950–2850 cm^{-1} – výrazná oblasť C-H vibrácií z CH_2/CH_3 skupín (Gao et al, Int J Agric & Biol Eng, 2017). V tejto oblasti bolo možné rozlíšiť ~2865–2855 cm^{-1} (symetrický CH_2 *stretching*) a ~2930–2905 cm^{-1} (asymetrický CH_2 *stretching*), čo zodpovedá alifatickým reťazcom v ionizovateľných lipidoch (zhoda s STD2 t. j. ALC-0315) [3,7]. Niektoré merania zaznamenali aj vibrácie v oblasti ~2450–2420 cm^{-1} , ktoré môžu prislúchať kombinovanej vibrácii lipidických reťazcov (Gao et al, Int J Agric & Biol Eng, 2017). V spektrách tohto typu sa vždy objavuje veľmi charakteristický a jasne definovaný pás ~1735–1730 cm^{-1} charakteristický pre esterové karbonylové väzby v lipidových nanočasticách a potvrdzujúci prítomnosť lipidov s esterovou funkčnou skupinou (fosfolipid DSPC a lipid ALC-0315, prípadne lipid PEG₂₀₀₀-DMG vo vakcíne Spikevax) (Hou et al, Nature Rev Materials, 2021, Czamara et al, J Raman Spectroscopy, 2015). Vo väčšine meraných bodov vzorky na podložke bol v týchto typoch spektra (**Typ C**) pozorovaný aj úzky pás pri ~1670 cm^{-1} , ktorý bol priradený *stretching* vibrácii C=C väzby v skelete cholesterolu. Ďalšie silné pásy sa vyskytovali pri ~1440 cm^{-1} (CH_2 *bending*) a ~1375 cm^{-1} (CH_3 *bending*), ktoré sú príznačné pre dlhé alkylové reťazce (Czamara et al, J Raman Spectroscopy, 2015). Okrem toho boli identifikované viaceré pásy v rozsahu 1200-1050 cm^{-1} (väčšinou C-C *stretching* vibrácie) porovnateľné s pásmi v spektrách štandardov DSPC (**STD3**) a ALC-0315 (**STD2**); pásy v úzkom

rozsahu vlnočtov $\sim 1110\text{--}1090\text{ cm}^{-1}$ boli priradené vibráciám väzieb C–O–C a C–C–O (Zhou et al, *J Pharm Analysis*, 2025).

Všetky tri špecifické typy spektier (A,B,C) pre vzorky vakcíny Pfizer Comirnaty ako aj vzorky vakcíny Moderna Spikevax obsahovali očakávané pásy zodpovedajúce príslušným štandardom, čo zároveň *potvrďuje deklarované zloženie vakcíny* (Tenchov et al, *ACS Nano*, 2021, Pardi et al, *Nat Rev Drug Disc*, 2018, Wilson et al, *J Drug Del Sci & Tech*, 2022, Pfizer, 2025, EMA, Spikevax, 2025).

ZÁVER 1:

Výsledky podporujú tvrdenie, že rôzne šarže a varianty vakcín majú konzistentnú chemickú formuláciu založenú na lipidových nanočasticiach určených na efektívnu enkapsuláciu a doručenie mRNA (Hou et al, *Nature Rev Materials*, 2021). Spektrá vykazujú zhodu so štandardmi lipidových štruktúr, fosfolipidov, cholesterolu a sacharózy, ktoré sú používané vo farmaceutických formuláciách (Wilson et al, *J Drug Del Sci & Tech*, 2022).

Komplexná Ramanova analýza ukázala konzistentnosť medzi všetkými šaržami vakcín Comirnaty a Spikevax.

Medzi spektrami vzoriek Comirnaty a Spikevax sa vyskytla variabilita pomerov intenzít pásov predovšetkým v spektrách identifikovaných pre lipidové štruktúry a cholesterol, čo hovorí o rozdielnych pomeroch zastúpenia týchto zložiek vo vakcínach Comirnaty v porovnaní s vakcínami Spikevax. Naše pozorovania sú v tomto smere zhodné s literatúrou (Wilson et al, *J Drug Del Sci & Tech*, 2022). Napriek malým rozdielom v pomeroch intenzít pásov medzi dvoma typmi vakcín preukázali všetky merania konzistentnosť v polohe a tvare pásov, čo svedčí o chemickej uniforme zloženia vakcín. **Žiadne meranie nevykazovalo anomálie ani nekonzistentné spektrálne odpovede, ktoré by naznačovali prítomnosť kontaminácie alebo odlišného zloženia oproti zloženiu deklarovanému výrobcom** (Wilson et al, *J Drug Del Sci & Tech*, 2022, Pfizer, 2025, EMA, Spikevax, 2025).

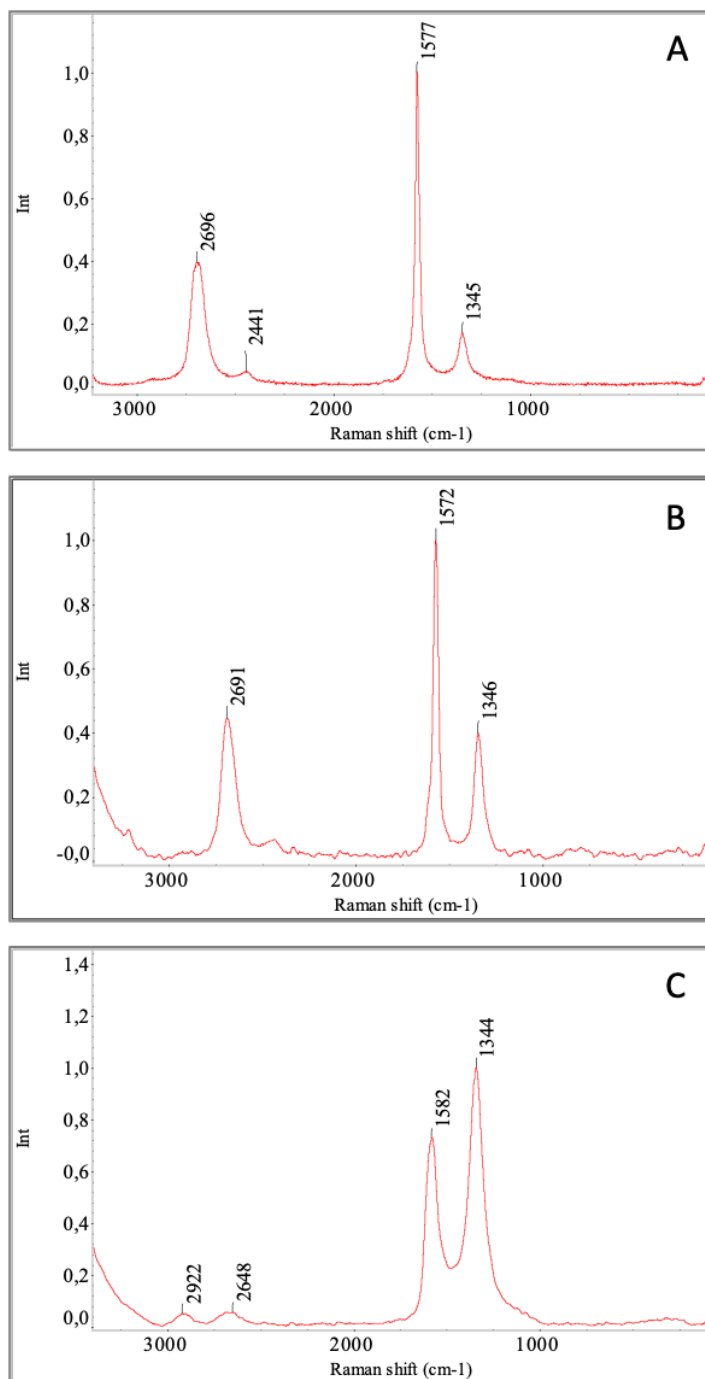
Niektoré pásy v spektrách vakcíny Spikevax boli úzke a tvarovo konzistentné, zatiaľ čo u Comirnaty mali mierne širší tvar. Okrem začínajúcich náznakov degradácie lipidov v týchto vzorkách, môže byť potenciálne ďalším faktorom aj prítomnosť pufru PBS (uvádzaný v zložení vakcín), kedy napr. bežne úzke ostré pásy cholesterolu sa vplyvom prítomnosti tohto pufru môžu prejavovať v spektre ako širšie (Rodà et al, *Nanomaterials*, 2023). Prítomnosť pufru PBS v spektrách však nebolo možné jednoznačne identifikovať. Rovnako nebolo možné pri analýze zmesných Ramanových spektier jasne identifikovať kľúčové pásy charakteristické pre látku trometamol (viď Obr. 3.1). Čiastočne to môže byť spôsobené prekryvom pásov zložiek s vyšším zastúpením v obsahu vakcín, ktoré intenzitne prekryli pásy tejto minoritnej zložky. Preto nie je možné potvrdiť ani vylúčiť prítomnosť pufru PBS a látky trometamol v zložení vakcín Comirnaty a Spikevax.

Spikevax bivalentné formulácie (BA.1, BA.4–5) sa ukázali byť stabilné aj po expirácii, čo je v súlade s optimalizovaným zložením lipidov a PEG-lipidov. V oboch vakcínach bola zaznamenaná variabilita súvisiaca s vekom a expiráciou, so znakmi degradácie v starších vzorkách (Hou et al, *Nat Rev Materials*, 2021, Zhou et al, *J Pharm Analysis*, 2025, Pierna et al, *Biotech, Agron, Soc & Environ*, 2011). Celkovo Ramanova analýza potvrdila, že oba typy mRNA vakcín obsahujú sacharózu, lipidové nanočastice s typickými lipidovými vibráciami charakteristickými pre ALC-0315, ALC-0159, fosfolipid DSPC a sacharózu v súlade s deklarovaným zložením (Pfizer, 2025, EMA, Spikevax, 2025).

GRAFÉN OXID

Následne sme vykonali cielenú analýzu zameranú na detekciu grafénu alebo grafén oxidu v šaržiach vakcín Comirnaty a Spikevax.

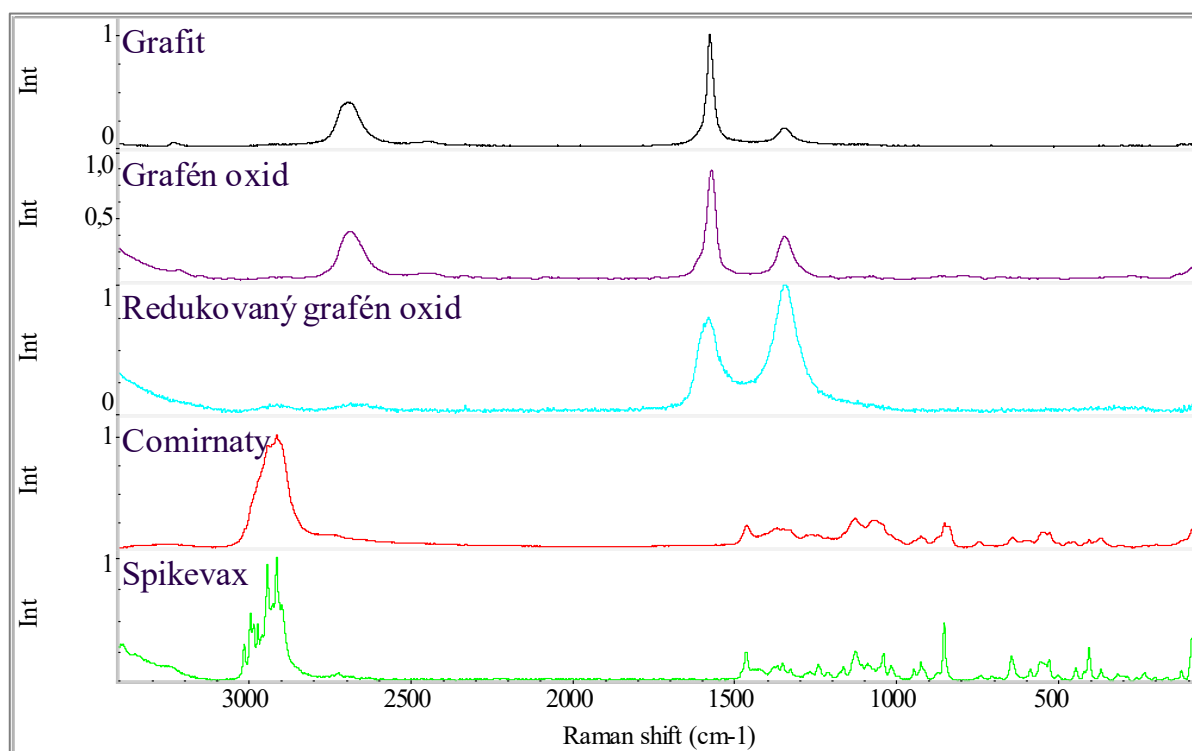
Grafénové materiály majú veľmi dobre popísaný a diagnostikovateľný spektrálny profil vysoko špecifický pre dané látky: D-pás vyskytujúci sa v oblasti $\sim 1360\text{--}1340\text{ cm}^{-1}$, ktorý hovorí hlavne o defektoch v štruktúre ako sú napr. oxidácia alebo neusporiadaná štruktúra. Ďalší veľmi charakteristický pás je tzv. G-pás v oblasti $\sim 1600\text{--}1575\text{ cm}^{-1}$ zodpovedajúci grafitovej sp^2 štruktúre uhlíka a tretím znakom prítomnosti graf-it/-énových štruktúr je tzv. 2D pás $\sim 2700\text{--}2650\text{ cm}^{-1}$ odrážajúci vrstvenie materiálu.



Obr. 3.7
Ramanove spektrá štandardov
(A) grafitu, (B) grafén oxidu,
(C) redukovaného grafén oxidu.

V prípade grafén oxidu (GO) je typický veľmi výrazný pás D s tým, že pomer D/G pásov sa pohybuje v rozmedzí cca 0,9-1,3. G pás je zároveň mierne posunutý a širší, zároveň sa môže vyskytovať veľmi slabý široký 2D pás. U redukovaného grafén oxidu je pomer D/G pásov nižší alebo rovný 1 s tým, že G pás je ostrejší a prítomný je aj slabší 2D pás.

Grafit ako polymorfný materiál má veľmi ostrý G pás pri $\sim 1580\text{ cm}^{-1}$ a 2D pás silný a rozdelený (Ferrari a Robertson, Phys Rev B, 2000, Eigler y Hirsch, Angewandte Chemie, 2014). Tieto pásy sú vždy veľmi výrazné a špecifické a nedajú sa zameniť s lipidovými vibráciami v oblasti $2950\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$.



Obr. 3.8

Porovnanie Ramanových spektier štandardov grafitu, grafén oxidu, redukovaného grafén oxidu a priemerných Ramanových spektier vakcín Comirnaty a Spikevax.

ZÁVER 2:

Ramanova spektroskopia je citlivá metóda na detekciu uhlíkových nanomateriálov už vo veľmi nízkych koncentráciách (Ferrari et al, Phys Rev B, 2000, Eigler et al, Angew Chemie, 2014). Ak by boli prítomné čo i len stopové množstvá GO alebo red-GO, objavili by sa jasné D/G pásy v $1600\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$ oblasti. V tomto kontexte musíme skonštatovať, že analýzy zloženia vakcín **preukázali absolútnu absenciu** diagnostických pásov (D, G, 2D) typických pre akékoľvek grafénové alebo grafitové štruktúry prítomné vo vzorkách.

Ramanova spektroskopická analýza viac než 150 meraní vzoriek vakcín Comirnaty a Spikevax jednoznačne preukázala neprítomnosť grafitu, grafén oxidu a redukovaného grafén oxidu.

Spektrálne profily plne zodpovedajú oficiálnym lipidovým nanočasticovým formuláciám vakcín, ktoré sú plne vysvetliteľné zložkami oficiálne deklarovaného zloženia (sacharóza, PEG lipidy, fosfolipidy, ionizovateľné lipidy) (Pfizer, 2025, EMA, Spikevax, 2025).

4. POSÚDENIE MOŽNÉHO VPLYVU ZVYŠKOVEJ DNA PRÍTOMNEJ V mRNA VAKCÍNACH NA ĽUDSKÝ ORGANIZMUS

Výzvy v oblasti boja proti infekčným ochoreniam nie sú len medicínskeho a biologického charakteru. Od začiatku pandémie COVID-19 svet zažíva takzvanú „infodémiu“, keď sa na digitálnych a sociálnych platformách rýchlo šíria a šíria nepravdivé, zavádzajúce alebo tendenčné správy týkajúce sa mRNA vakcín, ako aj samotnej vakcinácie. Patrí k nim aj šírenie obáv z možného vplyvu zvyškovej DNA prítomnej v mRNA vakcínach na ľudský organizmus, ktoré vychádza z nepochopenia veľmi zložitých molekulárnych, bunkových a patofyziologických mechanizmov v ľudskom organizme a narába s klamstvami a hypotetickými scenármi. V tomto kontexte je mimoriadne dôležité podávať presné a na dôkazoch založené informácie s cieľom podporiť správne pochopenie a prijatie očkovacích programov.

V tejto správe sa preto venujeme nielen výsledkom analýzy zloženia mRNA vakcín získaným viacerými nezávislými metódami, ale aj vysvetleniu rôznych tvrdení a pochybností, ktoré sa objavili v súvislosti s vakcináciou a špecificky s mRNA vakcínami proti ochoreniu COVID-19.

Tieto tvrdenia a pochybnosti sa opierajú o neoverené informácie a individuálne príbehy bez dôkazov o príčinnej súvislosti, pričom **úplne ignorujú výrazne vyššie riziká závažných dôsledkov ochorenia COVID-19 spôsobeného infekciou vírusom SARS-CoV-2, ktoré ohrozujú najmä ľudí s predispozíciami na chronické ochorenia.**

4.1 ZÁKLADNÉ FAKTY O PANDÉMII OCHORENIA COVID-19

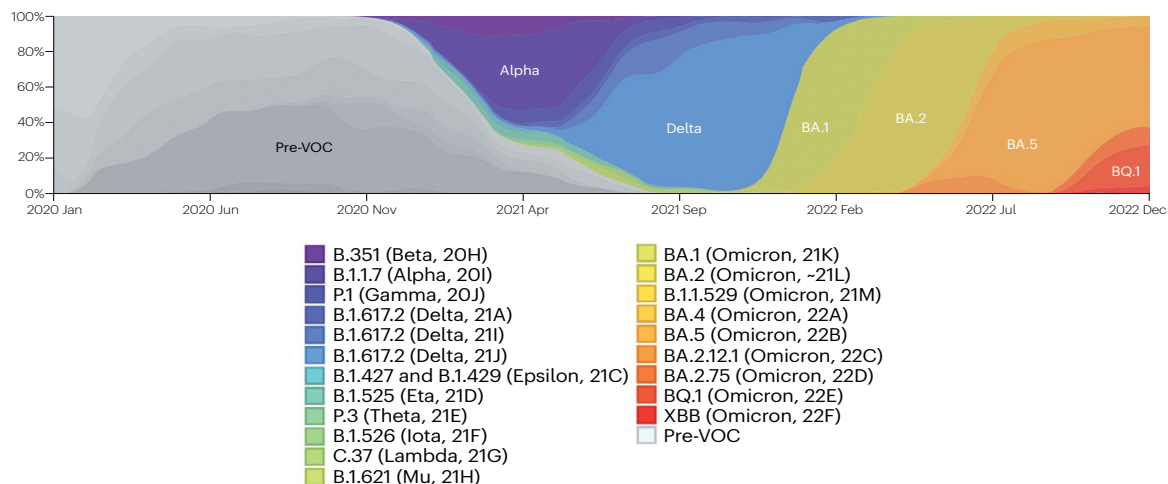
Pandémia COVID-19, vyvolaná koronavírusom SARS-CoV-2, bola jednou z najvýznamnejších globálnych zdravotných kríz modernej histórie. Prvé prípady ochorenia boli zaznamenané v decembri 2019 v čínskom meste Wu-chan a následne sa infekcia rýchlo rozšírila do celého sveta.

Svetová zdravotnícka organizácia (WHO) vyhlásila pandémiu 11. marca 2020, keď sa vírus rozšíril do všetkých kontinentov. K dnešnému dňu bolo celosvetovo potvrdených viac ako 760 miliónov prípadov infekcie a viac ako 7 miliónov úmrtí. Tieto čísla sú však veľmi pravdepodobne podhodnotené vzhľadom na limitované testovanie a reportovanie v mnohých krajinách. Počas nasledujúcich rokov vírus spôsobil stovky vln infekcií v rôznych častiach sveta. Na Slovensku bolo do apríla 2024 zaznamenaných takmer 1,9 milióna prípadov infekcie a vyše 21 tisíc úmrtí. Miera hospitalizácií sa výrazne líšila v závislosti od krajiny a fázy pandémie, no v kritických obdobiach boli zdravotnícke systémy mnohých krajín vrátane Slovenska na pokraji kolapsu. Kľúčovým faktorom bola rýchlosť prijatia a účinnosť protipandemických opatrení, kvalita zdravotného systému, úroveň dôvery verejnosti v inštitúcie a authority.

Významným aspektom pandémie bola evolúcia vírusu SARS-CoV-2 prostredníctvom mutácií, ktoré viedli k vzniku nových variantov (Obr. 4.1.1). Medzi najvýznamnejšie patrili:

- Alfa variant (B.1.1.7) - prvýkrát identifikovaný vo Veľkej Británii, vykazoval približne o 50 % vyššiu prenosnosť.
- Delta variant (B.1.617.2) - objavený v Indii, spôsobil dramatický nárast prípadov v roku 2021 vďaka zvýšenej infekčnosti a čiastočnému úniku pred získanou imunitou.
- Omikron variant (B.1.1.529) - charakteristický vysokou mierou šírenia, ale nižšou patogenitou, čo viedlo k masívnym vlnám infekcií koncom roku 2021 a v roku 2022. Omikron bol schopný rýchlejšie prekonať existujúcu imunitu a mutovať do nových subvariantov, čo si vyžiadalo aktualizáciu vakcinačných stratégií. K najvýznamnejším subvariantom patrili BA.1 a BA.2, ktoré v krátkom čase spôsobili masívny nárast prípadov. V prvej polovici roku 2022 sa objavili subvarianty BA.4 a BA.5, ktoré sa vyznačovali ďalším zvýšením prenosnosti, schopnosťou lepšie sa vyhýbať neutralizujúcim

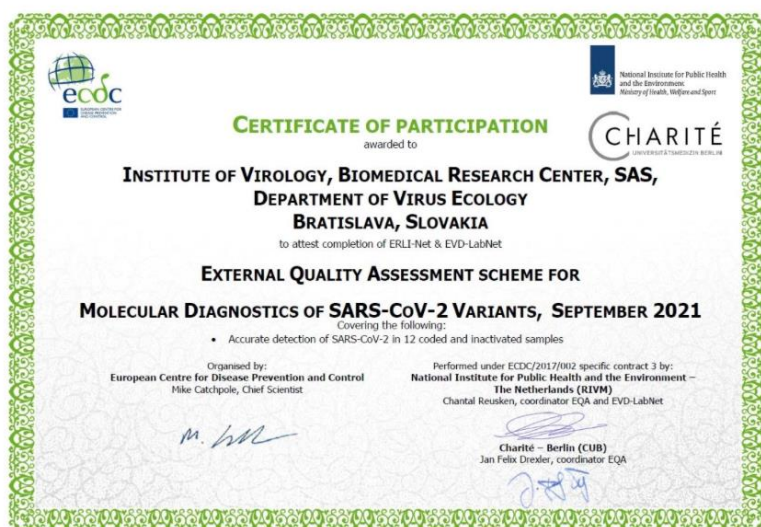
protilátkam produkovaným po očkovaní alebo prekonaní skoršej infekcie. Väčšina prípadov však mala menej závažný klinický obraz v populácii so základnou alebo posilňovacou dávkou vakcinácie. Každý ďalší subvariant ukazoval, že vírus využíva možnosti evolúcie na to, aby sa čo najlepšie udržoval v ľudskej populácii, maximalizoval prenosnosť a zároveň znižoval celkovú virulenciu. Táto evolučná stratégia vedie k tomu, že COVID-19 sa stáva endemickým, podobne ako chrípka, s opakovanými sezónnymi vlnami a meniacimi sa variantami.



Obr.4.1.1

Prevalencia SARS-CoV-2 variantov v priebehu pandémie COVID-19 (december 2019-december 2022). Prevzaté z práce Markov et al, Nat Rev Microbiol, 2023.

Na Slovensku bolo šírenie nových variantov monitorované pomocou priebežného sekvenovania vírusu SARS-CoV-2 zo vzoriek pozitívne testovaných osôb, ktoré zbieral Úrad verejného zdravotníctva SR a zo vzoriek a z izolátov vírusu uložených v Európskom vírusovom archíve (https://www.european-virus-archive.com/evag-portal?portal_search=SARS-CoV-2+Slovakia&advanced_icv_tax_search=), ktorého časť spravuje Biomedicínske centrum SAV. Na týchto aktivitách sa významnou mierou podieľali vedci Vedeckého parku UK a Biomedicínskeho centra SAV, ktorí do svetovej databázy GISAID (<https://www.gisaid.org/>) uložili tisíce sekvencií vírusu SARS-CoV-2. Viac podrobností je uvedených v správe o sekvenovaní (<https://ceur-ws.org/Vol-2962/paper16.pdf>), ktorá pokrýva obdobie Q1 2020 – Q1 2021. Od marca 2021 bolo sekvenovaných viac ako 500 vzoriek týždenne. Vybrané výsledky sekvenovania boli publikované (Borsova et al, Sci Rep, 2021, Brejova et al, Virus genes, 2021, Rusnakova et al, Viruses, 2022). Celkovo je v databáze GISAID zo Slovenska zahrnutých 48 521 sekvencií SARS-CoV-2 a jeho variantov. Prvé boli zaradené už z prvých zachytených prípadov v marci 2020. Posledné sekvencie sú z júna 2025.



Obr.4.1.2

Certifikát kvality vydaný v septembri 2021 Európskym centrom pre prevenciu a kontrolu chorôb na základe externého hodnotenia kvality molekulárnej diagnostiky variantov vírusu SARS-CoV-2 v Biomedicínskom centre SAV. Kontrola kvality bola overovaná v Charité, Berlín a na RIVM v Holandsku.

V boji proti pandémie boli na Slovensku implementované rôzne stratégie:

- Nefarmaceutické intervencie: karanténa, sociálny odstup, nosenie rúšok a respirátorov, lockdowny.
- Testovanie a trasovanie kontaktov: masové testovanie, identifikácia ohnisk nákazy a sérologické monitorovanie.
- Vakcinácia: bezprecedentne rýchly vývoj účinných vakcín a masové očkovacie kampane.
- Farmakologická liečba: vývoj antivirov a terapeutických postupov pre liečbu ťažkých prípadov.

Vedci Slovenskej akadémie vied sa od začiatku pandémie vďaka svojej rozsiahlej expertíze aktívne zapojili do riešenia viacerých kritických výziev pandémie na Slovensku, najmä prostredníctvom priamej účasti na protipandemických opatreniach, na vývoji testov a vakcín a na monitorovaní spoločenských dosahov vrátane prieskumov názorov verejnosti a postojov ku konšpiráciám (Kovacech et al, *EBioMedicine*, 2022, *prieskumy Sociologického ústavu SAV*). Biomedicínske centrum SAV sa od momentu prvého prípadu infekcie vírusom SARS-CoV-2 na Slovensku v marci 2020 významne podieľalo na rutinnom PCR testovaní v spolupráci s Úradom pre verejné zdravotníctvo SR, najmä ako pomoc pre nemocnice, pre aktivity umelcov, športovcov, realizáciu významných podujatí ako napr. GLOBSEC a pre pracoviská SAV. Okrem toho sme v BMC SAV izolovali SARS-CoV-2 vírusy, v rámci EVA poskytovali referenčný materiál na výskumné a vývojové účely (Sett et al, *Lancet Microbe*, 2024), realizovali vírus-neutralizačné testy na dôkaz infekčnosti hospitalizovaných pacientov s dlhodobou pozitívnym PCR testom.



Obr. 4.1.3

Certifikát kvality vydaný v júli 2020 Európskym centrom pre prevenciu a kontrolu chorôb na základe externého hodnotenia molekulárnej diagnostiky vírusu SARS-CoV-2 metódou RT-PCR v Biomedicínskom centre SAV. Kvalita bola overovaná v Charité, Berlín a na RIVM v Holandsku.

V BMC SAV sme tiež uskutočnili niekoľko sérologických testovaní, najmä na monitorovanie epidemiologickej situácie na Slovensku, na pracoviskách SAV a v niektorých mestách na Slovensku (Kajanová et al, *Acta Virol*, 2021, Kajanová et al, *Acta Virol*, 2022, Vanova et al, *Viruses*, 2025).

Pandémia COVID-19 bola bezprecedentnou udalosťou, ktorá priniesla mnoho výziev na globálnej úrovni, mnohé z nich sa výrazne prejavili aj na Slovensku:

- Preťaženie zdravotníckych systémov - nedostatok lôžok na jednotkách intenzívnej starostlivosti, nedostatok personálu a vyčerpanie zdravotníckych pracovníkov.
- Nedostatok zdravotníckeho materiálu - v počiatočných fázach kritický nedostatok osobných ochranných prostriedkov a respirátorov.
- Nedostatok diagnostických testov a ich komponentov.
- Nedostatok odborných kapacít na realizáciu rýchlej a efektívnej diagnostiky.
- Ekonomické následky - rozsiahle ekonomické škody spôsobené lockdownami, obmedzením mobility a práceneschopnosťou.

- Nerovnosti v prístupe k vakcínam - značné rozdiely v dostupnosti vakcín medzi rozvinutými a rozvojovými krajinami.
 - Sociologické a psychologické následky – súvisiace s izoláciou, stratou blízkeho, dlhodobými následkami ochorenia COVID-19, konfliktami kvôli názorovým rozdielom a pod.
 - Dezinformácie - šírenie nepresných a zavádzajúcich informácií o ochorení a vakcínach.
- S viacerými výzvami, ktoré pandémia COVID-19 priniesla, sa vyrovnávame aj v súčasnosti.

4.2 SYMPTÓMY A NÁSLEDKY OCHORENIA COVID-19

COVID-19 má veľmi široké spektrum prejavov, ktoré sa menia podľa veku, zdravotného stavu, aktuálneho variantu vírusu či miery imunity a očkovacieho statusu jednotlivcov aj populácie. V slovenských podmienkach odborníci identifikovali spektrum symptómov od asymptomatických prípadov až po ťažké komplikácie vyžadujúce intenzívnu starostlivosť.

Mierne symptómy a ich výskyt na Slovensku

Podľa údajov Úradu verejného zdravotníctva SR a Národného centra zdravotníckych informácií približne 75 – 80 % infikovaných na Slovensku prekonalo COVID-19 s miernym priebehom, bez nutnosti hospitalizácie. Mierne prejavy väčšinou trvajú 7 – 14 dní, kým dôjde ku spontánnemu zotaveniu.

Typické príznaky sú:

- zvýšená teplota alebo horúčka (70 – 88 % prípadov)
- únava a vyčerpanosť (60 – 85 %)
- bolesti hlavy, svalov a kĺbov (30 – 55 %)
- strata chuti a čuchu (25 – 40 %, častejšie u prvých vln)
- nádcha, dráždivý kašeľ, bolesť hrdla (35 – 50 %)
- tráviace ťažkosti ako hnačka alebo nevoľnosť (až 20 %)

Pacienti s miernym priebehom zvládnu infekciu doma pri symptomatickej liečbe.

Približne 10–15 % všetkých infikovaných v SR bolo bez príznakov (asymptomatický priebeh).

Stredne ťažké symptómy a hospitalizácie

Zhruba 13 – 16 % infikovaných na Slovensku potrebovalo konzultáciu s lekárom alebo krátkodobejšiu hospitalizáciu, predovšetkým v období pred masívnym očkovaním a výskytom novších, menej virulentných variantov vírusu. Symptómy typické pre túto skupinu sú:

- vysoká horúčka pretrvávajúca dlhšie než 5 dní
- výrazná únava, slabosť, neschopnosť vykonávať bežné činnosti
- suchý, dusivý alebo produktívny kašeľ
- bolesti na hrudi, mierna až stredná dýchavičnosť
- poruchy čuchu, chuti, bolesti hlavy a svalov intenzívnejšieho charakteru

Dĺžka trvania symptómov bola obvykle 2 – 4 týždne, s častejším výskytom pretrvávajúcich ťažkostí (nárazová únava, pokles výkonu).

Ťažký a kritický priebeh ochorenia

V slovenských podmienkach tvorili závažné prípady 4 – 5 % všetkých infikovaných, pričom riziko rástlo najmä u osôb nad 65 rokov (tu až 30 – 35 % prípadov vyžadovalo hospitalizáciu a 10 – 12 % sa skončilo smrťou, podľa veku a komorbidít, t.j. sprievodných ochorení). Medzi vážne symptómy patria:

- rýchlo sa zhoršujúca dýchavičnosť, nutnosť podávania kyslíka/ventilácie
- zápal pľúc, ARDS (akútny respiračný distress syndróm)
- pokles saturácie kyslíka pod 94 %
- narušenie vedomia, dezorientácia
- prejavy systémovej trombózy (napr. cievna mozgová príhoda, pľúcna embólia)

V prípade závažného priebehu bola dĺžka hospitalizácií v priemere 2 – 6 týždňov, v prípadoch komplikovaného zotavovania alebo postcovidových syndrémov dlhšie.

Long COVID (dlhodobé následky)

Na Slovensku približne 18 – 28 % ľudí po prekonanej infekcii uvádzalo perzistujúce príznaky (únava, dušnosť, úzkosť, narušená koncentrácia, únava svalov) dlhšie než 4 – 8 týždňov po prekonaní akútnej infekcie. Väčšina ľudí sa vyliečila do 6 mesiacov, u niektorých však ťažkosti pretrvávali aj viac ako rok. Vírusová RNA môže pretrvať až niekoľko mesiacov v rôznych tkanivách vrátane mozgu. Long COVID sa častejšie objavoval po ťažkých akútnych priebehoch, u žien a starších pacientov. Zo zahraničných štúdií vyplýva, že pacienti diagnostikovaní na long COVID mali predispozíciu (napr. obezitu, kardiovaskulárne ochorenia, hypertenziu, diabetes, astmu, úzkosť etc.) a častejšie potrebovali zdravotnú starostlivosť už pred pandémiou (*Lak et al, J Intern Med, 2025, Stein, Nature, 2022, El-Baky et al, J Cell Biochem, 2024*).

Rizikové faktory závažného priebehu

Analýzy z Centrálného registra hospitalizácií (2020 – 2024) ukazujú, že najčastejšími rizikovými faktormi boli:

- vek nad 60 rokov (relatívne riziko závažného priebehu 5× vyššie)
- chronické ochorenia (diabetes, vysoký tlak, obezita, kardiovaskulárne ochorenia)
- onkologickí a imunokompromitovaní pacienti (relatívne riziko až 7 – 12×)

Ochorenie COVID-19 v porovnaní s očkovaním

V priebehu rokov 2021 – 2024 slovenské aj celosvetové údaje preukázali, že plne očkované osoby mali:

- o 70 – 90 % nižšiu šancu hospitalizácie v prípade infekcie
- viacnásobne nižšie riziko úmrtia na COVID-19
- významne znížené riziko dlhého COVIDu u osôb vakcinovaných pred infekciou (*Rudolph et al, Human Vaccines & Immunotherapy, 2025, Hedberg, J Infect Dis, 2025, Park & Nanda, Infect Dis Rep, 2025*)

Riziko vážnych komplikácií (myokarditída, trombózy) po prekonaní COVID-19 je podľa slovenských aj zahraničných údajov 10 až 30-krát vyššie než po očkovaní a očkovanie chráni pred týmito komplikáciami po následnej infekcii:

- trombózy po COVID-19: 95 – 180 prípadov/100 000
- trombózy po vakcínach: 1 – 2 prípady/100 000
- myokarditída po infekcii COVID-19: 10 – 20 prípadov/100 000 mužov (mladí muži do 30 r.)
- myokarditída po vakcíne: 1 – 2 prípady/100 000 dávok

(*Patone et al, Nature Medicine 2022, Satyam et al, Cardiovasc Toxicol, 2025, Ip et al, Nature Commun, 2024, Cezard et al, Nat Commun, 2024, Lin et al, Lancet Reg Health Am, 2025, Mercadé-Besora, Heart, 2024, Tran et al, NPJ Vaccines, 2024*).

Pravdepodobnosť vážnych následkov je mnohonásobne nižšia po očkovaní než po prekonaní ochorenia, čo potvrdzujú štatistiky vychádzajúce z globálnych dát, ako aj z dát slovenských zdravotníckych inštitúcií.

Úloha zápalu a vírusových komponentov v patogenéze ochorenia COVID-19

Základným mechanizmom patogenézy ochorenia COVID-19 a jeho ťažkého klinického priebehu je zápal vyvolaný vírusovou infekciou. Po vstupe vírusu SARS-CoV-2 do ľudského organizmu nastáva aktivácia vrodeneho aj získaného imunitného systému. Táto obranná reakcia síce bráni nekontrolovanému šíreniu vírusu, no pri nadmernej intenzite môže zároveň zásadne prispieť k rozvoju závažných symptómov.

Mechanizmus zápalu pri infekcii SARS-CoV-2

Vírus napadá predovšetkým bunky dýchacích ciest. V infikovaných bunkách sa uvoľní vírusová RNA a vírusové proteíny, ktoré spustia komplexnú kaskádu imunitných procesov. Vrodená imunita rozpoznáva cudzie nukleové kyseliny (RNA) a vírusové proteíny a odpovedá produkciou cytokínov,

chemokínov a aktiváciou zápalových dráh (napr. interferónovej odpovede). Ak je táto aktivácia neprimerane silná, vzniká tzv. cytokínová búrka, ktorá môže viesť k poškodeniu tkanív a orgánov, napr. myokardu (Rodríguez et al, *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2021, Rossouw et al, *Front Immunol.* 2022).

Významnú rolu zohrávajú zápalové bunky (monocyty, makrofágy, neutrofilý), ktoré produkujú ďalšie mediátory a podnecujú ďalšiu infiltráciu tkanív zápalovými elementmi. Zápalový proces spôsobuje opuch, bolesť, zvýšenú tvorbu hlienu, zhoršenú výmenu plynov v pľúcach a celkové systémové príznaky (horúčka, únava, bolesti svalov či hlavy). Pri ťažkých formách infekcie môže zápal zasiahnuť celý organizmus a vyústiť do klinického obrazu systémového zlyhávania (Tay et al, *Nature Rev Immunol.* 2020).

Patologická úloha S proteínu vírusu SARS-CoV-2

S proteín je hlavný povrchový proteín SARS-CoV-2, ktorý zodpovedá za prichytenie vírusu na bunkové receptory ACE2 a následnú fúziu membrán, čo umožňuje vstup vírusu do hostiteľskej bunky. Samotný S proteín však aktivuje aj imunitné dráhy nezávisle od vírusovej replikácie. Jeho interakcia s bunkovými receptormi môže spúšťať zápalové procesy vrátane produkcie prozápalových cytokínov a šírenia zápalu do cievneho endotelu či ďalších tkanív (Liang et al, *Signal Transduct Target Ther.* 2023).

Patologická úloha vírusovej RNA

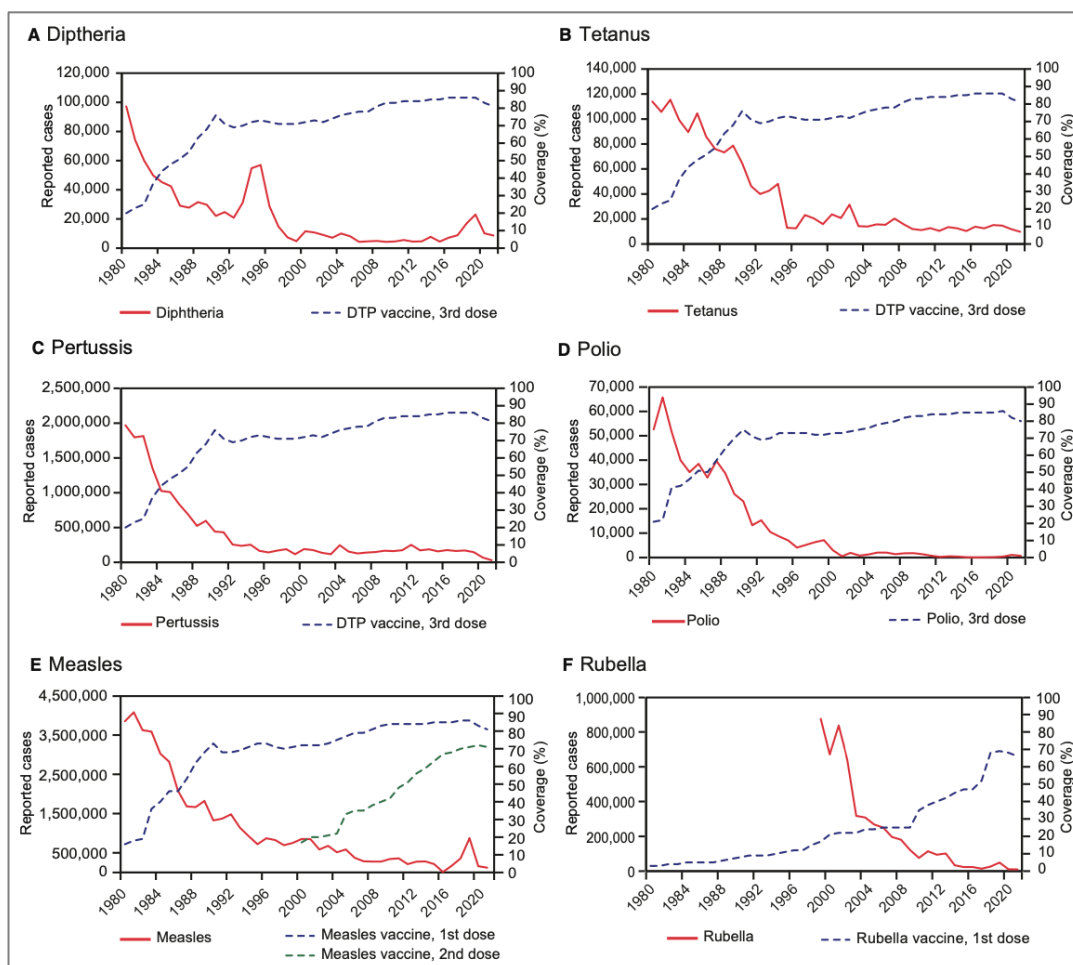
Vírusová RNA je rozpoznávaná ako cudzia látka, čo vedie k aktivácii receptorov vrodenej imunity (najmä Toll-like receptors TLR3, TLR7) a následne k spusteniu produkcie interferónov a ďalších zápalových látok. Nadmerná či dlhodobo pretrvávajúca imunitná odpoveď môže narušiť integritu tkanív a prispieť k syndrómu dlhého COVIDu (Wallach T et al, *Front Immunol.* 2023).

Zápal indukovaný infekciou SARS-CoV-2 je kľúčovým mechanizmom vzniku a závažnosti symptómov COVID-19. S-proteín a RNA vírusu zohrávajú patologickú úlohu nielen v šírení infekcie, ale predovšetkým v rozvoji zápalu, ktorý môže pretrvávať a spôsobovať nielen akútnu, ale aj dlhodobú chorobu.

4.3 VÝZNAM VAKCINÁCIE V BOJI PROTI INFEKČNÝM OCHORENIAM

Vďaka vedeckému a technickému pokroku sa zásadne zmenil spôsob boja proti infekčným chorobám a vakcíny sa stali pilierom modernej medicíny. Na začiatku dvadsiateho storočia boli infekčné choroby hlavnou príčinou úmrtí na celom svete. Tí, ktorí prežili infekcie, často trpeli trvalými následkami, ako sú ochrnutie, svalová atrofia alebo neurologické poškodenia. Počas ďalších desaťročí však došlo k výraznému poklesu úmrtnosti, keď priemerná dĺžka života narástla takmer o 30 rokov a hlavnými príčinami smrti sa stali chronické neinfekčné choroby ako kardiovaskulárne a metabolické ochorenia a rakovina (Montero et al, *Frontiers in Public Health.* 2024).

Nárast očakávanej dĺžky života a pokles úmrtnosti na infekčné choroby možno pripísať viacerým faktorom. Zníženie prenosu chorôb a vnímanosti hostiteľa súvisí so zlepšením životných podmienok (najmä vo vyspelých krajinách) a s vývojom antimikrobiálnych a antivírusových liečiv. Kľúčovú úlohu však zohralo široké používanie bezpečných, účinných a cenovo dostupných vakcín. Súhrnne tieto opatrenia umožnili eradikáciu niektorých patogénov vrátane vírusu pravých kiahní a určitých kmeňov poliovírusu. Choroby, ktoré kedysi ničili celé komunity, ako záškrt, osýpky či ružienka, sú dnes prevažne pod kontrolou, hoci na zachovanie tohto stavu je naďalej nutné realizovať komplexné vakcinačné programy (Obr. 4.3.1). Nádejné pokroky sa objavujú aj v oblasti vývoja vakcín proti malárii alebo respiračnému syncytiálnemu vírusu, pričom nedávna pandémia ochorenia COVID-19 stimulovala vývoj nových vakcín na báze najmodernejších technológií genetického inžinierstva a molekulárnej biológie.



Obr. 4.3.1

Globálny dosah vakcinácie na vybrané infekčné ochorenia (1980 – 2021). Grafy znázorňujú počty prípadov ochorení (A) záškrt, (B) tetanus, (C) čierny kašeľ, (D) obrna, (E) osýpky, (F) ružienka. Dáta sú dostupné na <https://immunizationdata.who.int/>. Zvýšené pokrytie očkovaním preukázateľne viedlo k výraznému zníženiu počtu prípadov každého ochorenia. Obr. prevzatý z publikácie Montero et al, *Frontiers in Public Health*, 2024.

Benefity vakcinácie sú veľmi komplexné – nejde len o prevenciu ochorenia a súvisiace zníženie hospitalizácií a úmrtnosti, ale aj ekonomické a sociálne prínosy pre spoločnosť aj jednotlivca:

- Vakcinácia proti vírusovým ochoreniam znižuje aj výskyt sprievodných sekundárnych bakteriálnych ochorení (napr. bakteriálnych pneumónií, ktoré sa môžu v organizme rozvinúť do závažnej formy kvôli vírusom oslabenej imunity).
- Vďaka kolektívnej imunity môžu vakcíny ochrániť aj jedincov, ktorí zo zdravotných dôvodov nemôžu byť očkovaní.
- Ekonometrické štúdie poukazujú na hospodársky benefit vakcinácie, keď prevencia ochorení znižuje náklady štátu na zdravotnú starostlivosť.
- Prevencia infekčných ochorení vakcináciou zohráva dôležitú úlohu v zmiernení hospodárskych škôd spôsobených stratou kvalifikovaných pracovných síl, práceneschopnosťou, alebo suboptimálnym pracovným výkonom z dôvodu práce počas choroby.
- Prevencia infekčných ochorení vakcináciou zároveň zlepšuje ekonomický status jednotlivcov a ich rodín.
- Prevencia detských infekčných chorôb alebo chorôb seniorov znižuje hospodárske straty spôsobené práceneschopnosťou rodičov alebo rodinných príslušníkov.
- Očkovanie detí a ich ochrana pred závažnými infekčnými chorobami zlepšuje ich fyzický aj kognitívny vývoj, umožňuje absolvovať školskú dochádzku a rôzne aktivity bez prerušenia.
- Prevencia infekčných ochorení tiež umožňuje bezpečné cestovanie a stretávanie sa ľudí, ako aj výmenu tovarov, čo podporuje obchod a turizmus a tým aj ekonomický rast.

→ Kladný vzťah autorít k očkovaníu prehlbuje aj dôveru ľudí k inštitúciám, k vedeckému poznaniu, aj k opatreniam na zabezpečenie verejného zdravia, vrátane vakcinácie.
(Nandi & Shet, *Hum Vaccin Immunother*, 2020, Montero et al, *Frontiers in Public Health*, 2024).

4.4 TYPY VAKCÍN

Vakcinácia je univerzálnym, vedecky dokázaným mechanizmom „tréningu“ imunitného systému na rozoznanie infekcie a zabránenie, alebo zmiernenie priebehu ochorenia. Je založená na schopnosti organizmu rozoznať element (antigén), ktorý je telu cudzorodý a vyvinúť voči nemu obrannú imunitnú reakciu. Vakcína (jej zložky) tento cudzorodý element napodobňuje a „natrénuje“ organizmus, aby bol pripravený na skutočnú infekciu a reagoval rýchlo a efektívne, aby zamedzil množeniu patogénu v organizme.

Prevencia vzniku ochorenia alebo zmiernenie jeho priebehu sú zabezpečené jednak pomocou vakcínou vyvolaných protilátok, ktoré sa na vírusové častice naviažu a zabráni vstupu vírusu do buniek a jednak pomocou aktivácie imunitných buniek, ktoré sú potrebné pre deštrukciu vírusom infikovaných buniek a pre vznik imunitnej pamäte.

V súčasnosti poznáme viacero typov vakcín:

- Živé atenuované (oslabené) vakcíny. Obsahujú živý vírus a sú historicky najstaršie. Vírusová DNA/RNA je v nich prítomná a dostáva sa do buniek organizmu, kde sa môže množiť, pričom nespôsobuje ochorenie, ale v organizme vyvoláva imunitnú reakciu, ktorá ho chráni pred následkami prirodzenej infekcie. Z pohľadu bezpečnosti patria k najviac rizikovým, pretože spontánne môže dôjsť k ich konverzii na „divý“ typ vírusu a k vyvolaniu samotného ochorenia.
- Inaktivované (usmrtené) vakcíny. Patogén je usmrtený chemickou alebo fyzikálnou cestou, takže sa v bunkách príjemcu nemôže množiť. To zaručuje ich zvýšenú bezpečnosť. DNA/RNA je vo vakcíne prítomná.
- Subjednotkové vakcíny. Neobsahujú vírus, ale iba jeho malú časť. Spravidla to býva jeden imunodominantný proteín, proti ktorému sa následne tvoria protilátky. Tieto vakcíny môžu byť pripravené z pôvodného patogénu alebo pripravené rekombinantnou technológiou (na báze plazmidovej DNA, ktorej malé množstvá vo vakcíne sú možné ako dôsledok výrobného procesu).
- Toxoidové vakcíny. Využívajú inaktivované toxíny. Sú podobné subjednotkovým vakcínám, ale imunitnú odpoveď nevyvolávajú na patogén, ale na toxíny produkované patogénom.
- Vírusové vektorové vakcíny. Využívajú rôzne vírusy ako nosiče génov pre antigény, na ktoré má byť imunita zacielená (typickým príkladom sú adenovírusy). Používajú sa proti ochoreniu COVID-19, ale aj proti iným vírusovým ochoreniam. Vírusová DNA je priamo súčasťou vakcíny.
- mRNA vakcíny. mRNA sa využíva na produkciu antigénu priamo v cieľovom organizme. DNA nie je súčasťou vakcíny, ale môže sa nachádzať v zvyškových množstvách ako pozostatok výrobného procesu. Nie sú známe žiadne relevantné vedecké dôkazy o jej biologickej aktivite.

Súčasný trendy a technológie sa sústreďujú najmä na vakcíny založené na báze mRNA, ktorá obsahuje modifikácie na zvýšenie stability a účinnosti produkcie antigénu. Vývoj tohto typu vakcín sa začal už viac ako pred štvrtstoročím. Kvôli efektívnemu procesu prípravy a výroby sa v súčasnej dobe tieto vakcíny považujú za najperspektívnejšie pri prevencii infekčných nákaz, ale veľký potenciál majú aj pri liečbe nádorových ochorení.

Aj pri pandémie COVID-19 sa potvrdilo, že očkovanie je účinný spôsob na zmiernenie dosahu pandémie. Pre tento účel bolo vyvinutých viacero typov vakcín, pričom vírusové vektorové, subjednotkové a mRNA vakcíny zohrali kľúčovú úlohu pri potlačení pandémie. Viaceré metaanalýzy zistili, že vakcíny založené na mRNA (91,99 %) boli najúčinnnejšie proti COVID-19, nasledovali vakcíny založené na proteínovej podjednotke (89,7 %), inaktivované vakcíny (80,95 %) a vakcíny založené na nereplikujúcom sa vírusovom vektore (67,41 %), (Beladiya et al, *Rev Ned Virol*, 2024, Zhou et al, *Eur Respir Rev*, 2025).

4.5 VÝVOJ mRNA TECHNOLOGIE

História vývoja mRNA technológie sa začala objavom mediátorovej RNA (mRNA) viacerými vedeckými skupinami súbežne v prvej polovici 60-tych rokov minulého storočia. V úvodnom období sa vedci sústredili hlavne na pochopenie funkcie a základných vlastností mRNA, ale veľmi rýchlo sa vynorila myšlienka jej využitia ako nosiča genetickej informácie pri syntéze proteínov a modulácii imunitnej odpovede v bunke a organizme. Za priekopnícku možno považovať prácu Lane *et al* (*J Mol Biol*, 1971) ktorí injekčne vstrekli globínovú mRNA do žabích oocytov. Z hľadiska rozpracovania konceptu využitia nukleových kyselín vrátane mRNA ako liečiv bola prelomovou práca autorov Wolff *et al* (*Science*, 1990) ktorí preukázali, že priama injekcia *in vitro* transkribovanej mRNA alebo plazmidovej DNA do kostrového svalu myši viedla k expresii kódovaného proteínu vo svale. V tých časoch sa mRNA ešte nevenovala pozornosť, pretože je menej stabilná ako DNA, a vedci sa zamerali na technológie prípravy vakcín založených na plazmidovej alebo vírusovej DNA. Avšak vďaka intenzívnemu výskumu a technologickému pokroku bolo možné nedostatky RNA technológie postupne eliminovať. Podarilo sa zlepšiť stabilizáciu mRNA, čo spolu so zásadným objavom využitia modifikovaných nukleozidov spojeným so znížením zápalových reakcií viedlo k významnému pokroku vo vývoji mRNA vakcín a terapeutík (Karikó *et al*, *Immunity*, 2005).

Posledným dôležitým poznatkom pre úspešné zavedenie mRNA technológie do praxe bolo vyriešenie jej dopravy do bunky. To sa úspešne podarilo hlavne vďaka zavedeniu technológie lipidových nanočastíc (Midoux *et al*, *Expert Rev Vaccines*, 2015). Tieto technologické vylepšenia prispeli k tomu, že platforma mRNA sa dostala do popredia technológie prípravy vakcín.



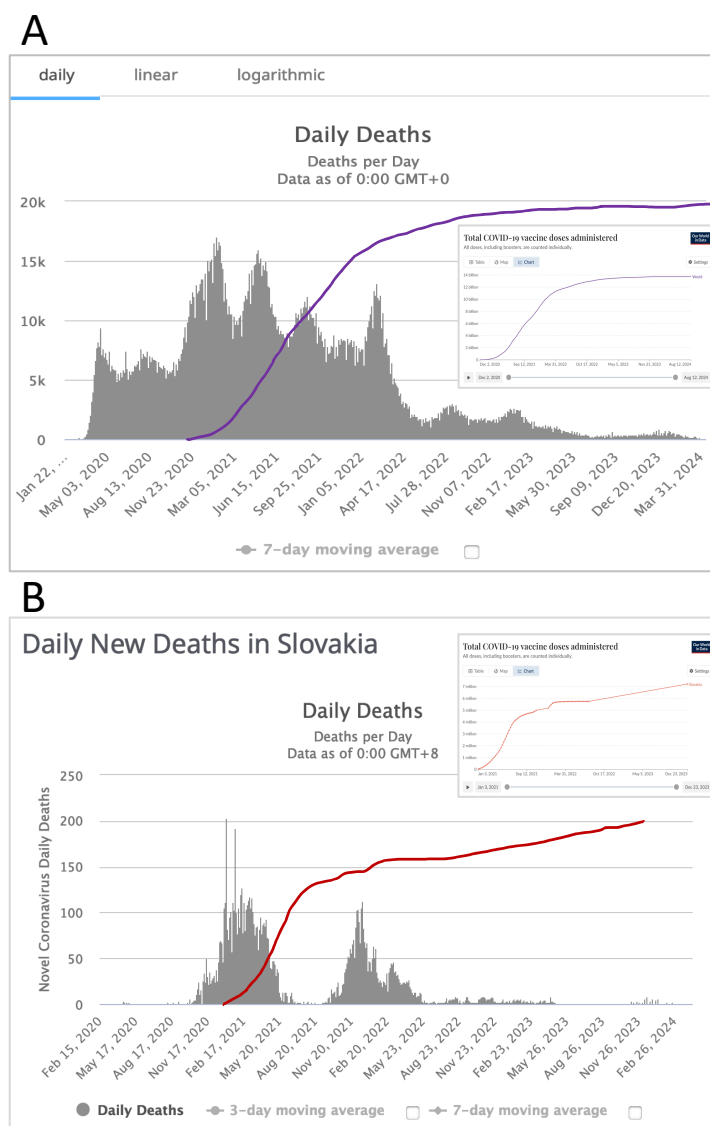
Obr. 4.5.1
Časová os vývoja mRNA technológie.

Súčasný technologický pokrok vo výrobe umožnil, že mRNA vakcíny sa dajú konštruovať a vyrábať veľmi efektívne v porovnaní s klasickým spôsobom prípravy vakcín, s využitím techník prípravy rekombinantných molekúl. To spôsobilo doslova revolúciu v možnostiach vývoja vakcín proti novým patogénom s pandemickým potenciálom ako sú napríklad niektoré kmene vírusu chrípky, vírus Ebola či v nedávnej minulosti SARS-CoV-2.

4.6 VPLYV VAKCINÁCIE NA NÁSLEDKY PANDÉMIE COVID-19

Pandémia COVID-19 zásadne ovplyvnila zdravotné systémy a verejné zdravie na Slovensku aj vo svete. Zavedenie očkovania znamenalo kľúčový obrat v boji proti ochoreniu, čo sa odrazilo na znížení úmrtnosti, nižších počtoch hospitalizácií aj lepšej dostupnosti starostlivosti pre iné diagnózy. Okrem toho vakcinácia priniesla ekonomické efekty v podobe úspor na nákladoch spojených s liečbou a preťažením nemocníc.

Od zavedenia očkovania v roku 2021 poklesla úmrtnosť na COVID-19 vo vyspelých krajinách o 60–90 % v porovnaní s rokom 2020. Na Slovensku bola ešte v zime 2021 úmrtnosť na COVID-19 jedna z najvyšších v EÚ, po rozšírení očkovania a imunizácii v roku 2022 klesla o viac než polovicu.



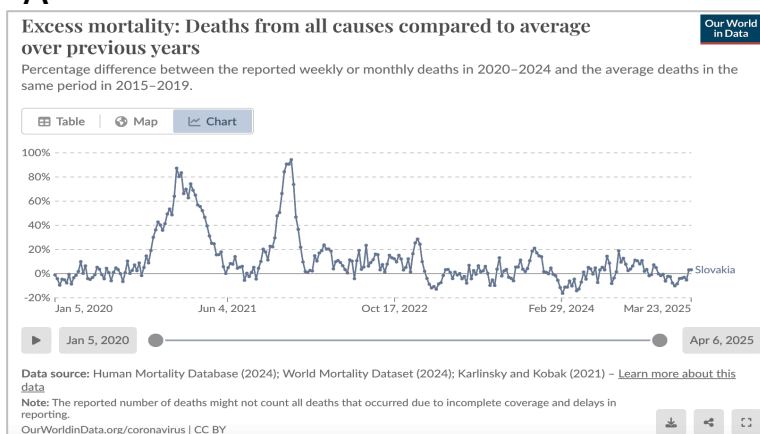
Obr. 4.6.1
Vplyv vakcinácie proti ochoreniu COVID-19 na dennú úmrtnosť počas pandémie.
(A) Denná úmrtnosť v globálnom meradle, vo vzťahu k počtu podaných dávok vakcín.
(B) Denná úmrtnosť na Slovensku, vo vzťahu k počtu podaných dávok vakcín.
(prevzaté z platforiem Worldometer a Our World of Data).

Počas úvodných vln COVID-19 bol zdravotnícky systém extrémne preťažený. Odložili sa preventívne vyšetrenia, skriningy a plánované operácie, čo najviac pocítili pacienti s chronickými ochoreniami a rakovinou. V rokoch 2020 – 2021 klesol počet novodiagnostikovaných onkologických prípadov v niektorých krajinách o 30 % a viac pacientov začínalo liečbu v neskoršom štádiu. Na Slovensku bol dopad mierne nižší ako v niektorých západných krajinách, no diagnostika aj začiatok liečby mnohých ochorení boli oneskorené. Po rozšírení očkovania sa situácia postupne stabilizovala.

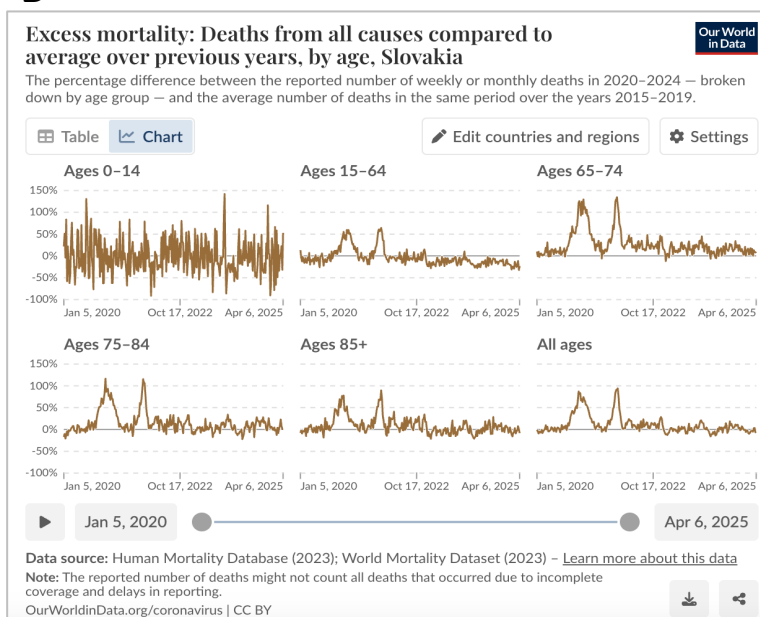
Pred pandémiou (2015 – 2019) sa priemerná odvrátiteľná úmrtnosť na Slovensku pohybovala okolo 200 – 210 na 100-tisíc obyvateľov (veková skupina 0–74 rokov). V skupine 15 – 65 rokov to bolo približne 120 – 140 na 100-tisíc, u seniorov nad 65 rokov (predovšetkým 65 – 74) okolo 400 – 500 na 100-tisíc obyvateľov. Hlavné príčiny tvorili kardiovaskulárne ochorenia, následne nádory a úrazy.

Počas pandémie v roku 2021 vzrástla celková odvrátiteľná úmrtnosť na Slovensku na približne 250 na 100-tisíc; u seniorov 65+ vystúpila dočasne aj nad 500 na 100-tisíc, kým v skupine 15 – 65 rokov išlo o 10 – 15 % nárast oproti predchádzajúcim rokom. Od roku 2022 sa situácia opäť zlepšuje, v skupine 15 – 65 rokov úmrtnosť klesá späť k hodnotám okolo 130 na 100-tisíc, u seniorov zatiaľ mierne prevyšuje predpandemické hodnoty, ale trend je priaznivý. V globálnom porovnaní dosahovala pred pandémiou odvrátiteľná úmrtnosť v západnej Európe 80 – 120 a vo východnej Európe cez 180 na 100-tisíc obyvateľov.

A



B



Obr. 4.6.2

Odvrátiteľná úmrtnosť na Slovensku počas pandémie COVID-19 a po nej (2020 - 2025) v porovnaní s obdobím pred pandémiou (2015-2019). Grafy udávajú % zmeny v porovnaní s priemernou hodnotou pred pandémiou.

(A) Celková odvrátiteľná úmrtnosť (B) Odvrátiteľná úmrtnosť podľa vekových skupín. Počet detských úmrtí je na Slovensku v porovnaní s inými vekovými kategóriami veľmi nízky, preto sú priebežné výkyvy v % výraznejšie.

V prvej vlne očkovania (rok 2021) dosiahla Slovenská republika úroveň plne zaočkovaných dospelých približne 43 %. To bol významne nižší podiel než priemer Európskej únie, ktorý v jeseni 2021 presiahol 70 %. Očkovanie medzi seniormi a rizikovými skupinami sa na Slovensku rozbiehalo pomalšie; v skupine 65+ bola v najviac exponovanom období dosiahnutá zaočkovanosť približne 65 %, kým v západných krajinách alebo v susednom Rakúsku a Česku často presahovala 80 – 90 %.

V rokoch 2022 a 2023 sa tempo očkovania spomalilo, avšak vďaka dostupným booster dávkam sa percento ľudí s aspoň tromi dávkami v SR zvýšilo na približne 54 % (v EÚ cca 75 %). Rok 2023 bol už poznamenaný „pandemickou únavou“ a nárastom váhania obyvateľov. Od začiatku vakcinácie proti COVID-19 do decembra 2023 bolo v SR podaných celkovo 7,22 milióna dávok (Our World in Data). Do leta 2024 sa celková zaočkovanosť (aspoň jedna dávka) zastavila okolo 55 %, pričom v hlavnom meste a väčších mestách bola nižšia o 10 – 15 percentuálnych bodov v porovnaní so západoeurópskymi krajinami. Najnižšie pokrytie zostávalo v niektorých regiónoch východného Slovenska.

Na rozdiel od prvých vln pandémie boli novšie varianty vírusu (do roku 2024) menej nebezpečné, no stále znamenali vážne riziko pre zraniteľné skupiny, ak sa neočkovali alebo neboli preočkovaní booster dávkami.

Nízka ochota očkovať sa ovplyvnila aj ekonomické a zdravotné dopady pandémie na Slovensku v porovnaní so západnou Európou. Slovensko patrilo medzi krajiny EÚ s najnižšou zaočkovanosťou počas viacerých vln, čo predlžovalo mieru hospitalizácií aj zotavenie ekonomiky v prvej polovici roka 2022.

Zdroje OECD aj slovenské štatistiky potvrdzujú vysokú ekonomickú návratnosť investícií do vakcinácie. Na logistiku, distribúciu očkovacích látok a informačné kampane išlo rádovo menej prostriedkov než na hospitalizácie, predĺžené práceneschopnosti a výpadky HDP počas lockdownov. Napríklad podľa OECD každé euro investované do vakcinácie prinieslo Slovensku úsporu na úrovni 4 – 6 eur. Údaje NCZI uvádzali za obdobie najmasívnejšieho očkovania pokles nákladov na hospitalizácie COVID-19 o 50 % (ročne v desiatkach miliónov eur).

Očkovanie predstavovalo kľúčový bod v manažovaní pandémie nielen z pohľadu zdravia, ale aj ekonomiky na Slovensku. Výrazne prispelo k poklesu počtu úmrtí, uvoľneniu nemocníc aj rýchlejšiemu zotaveniu hospodárstva. Štatistiky ukazujú, že vyššia zaočkovanosť by umožnila ešte efektívnejšie zvládnuť dôsledky pandémie.

Investície do prevencie a verejného zdravia sú najlepšou cestou ako predchádzať ekonomickým stratám a zachovať kvalitu života obyvateľov.

4.7 VEDĽAJŠIE ÚČINKY mRNA VAKCÍN: FAKTY A FIKCIE

Medicínske a vedecké dôkazy získané monitorovaním výsledkov podania miliárd dávok vakcín objektívne demonštrujú, že mRNA vakcíny proti COVID-19 majú **dobré charakterizovaný bezpečnostný profil s prevažne miernymi, prechodnými nežiaducimi účinkami a veľmi zriedkavými závažnými nežiaducimi účinkami**, ktoré sú predmetom dôkladného monitorovania a skúmania (Ferreira-da-Silva et al, *Front Med*, 2025). Na základe toho je možné konštatovať, že prínosy mRNA vakcín ďaleko prevyšujú riziká pre drvivú väčšinu ľudí, čo je podrobnejšie vysvetlené nižšie.

Jednostranné tvrdenia o nebezpečných účinkoch mRNA vakcín sú preukázateľne nepravdivé a sú v rozpore so základnými princípmi biológie, imunológie a epidemiológie.

Potvrdené nežiaduce účinky s vedeckým konsenzom

1. Bežne sa vyskytujúce nežiaduce účinky

Najčastejšie nežiaduce účinky sú vo všeobecnosti prechodné, miernej až strednej intenzity:

- Reakcie v mieste vpichu: Bolesť, začervenanie, opuch (hlásené u 70 – 90 % očkovaných osôb).
 - Systémové účinky: Únava (40 – 70 %), bolesť hlavy (30 – 60 %), bolesť svalov (20 – 50 %), zimnica (30 – 45 %), horúčka (10 – 15 %), bolesť kĺbov (10 – 30 %).
 - Trvanie: Zvyčajne odznejú do 1 – 3 dní.
 - Závislé od dávky: Často výraznejšie po druhej dávke alebo posilňovacej dávke.
 - Závislé od veku: Vo všeobecnosti častejšie u mladších dospelých ako u starších dospelých
- Tieto účinky predstavujú normálnu imunitnú odpoveď a nepovažujú sa za bezpečnostné riziká.

2. Myokarditída a perikarditída

Ide o najvýznamnejšiu potvrdenú zriedkavú nežiaducu reakciu:

- Výskyt: Približne 1 – 10 prípadov na 100 000 dávok vakcíny.
- Rizikové faktory: prevažne postihuje mužov mladších ako 30 rokov (najvyššie riziko je v rozmedzí 16 – 24 rokov), častejšie po druhej dávke, vyššie riziko pri vakcíne Moderna ako Pfizer (pravdepodobne kvôli vyššiemu obsahu mRNA), pričom dlhšie intervaly medzi dávkami riziko znižujú.
- Klinický priebeh: väčšina prípadov je mierna až stredne závažná, 95 % pacientov sa úplne zotaví pri konzervatívnej liečbe, hospitalizácia je bežná, ale krátka (medián 2 – 4 dni)

Riziko myokarditídy z infekcie COVID-19 je rádovo vyššie ako z očkovania, pomer rizika a benefitu je silne v prospech očkovania, a to aj v skupinách s najvyšším rizikom, pre ktoré sa však odporúča pokračovanie v dôkladnom post-vakcinačnom monitorovaní (*Patone et al, Circulation, 2022, Banerjee et al, Cureus, 2025, Stove et al, PLoS Med, 2023*).

Alergické reakcie

- Výskyt: Približne 2 – 5 prípadov na milión dávok
- Časovanie: Zvyčajne sa vyskytujú do 15 – 30 minút po očkovaní
- Rizikové faktory: Anamnéza závažných alergických reakcií, najmä na polyetylén glykol
- Manažment: Takmer všetky prípady odznejú úplne pri správnej liečbe
- Prevencia: Účinné je 15 – 30 minútové pozorovanie po očkovaní

Iné nežiaduce reakcie s preukázanou príčinnou súvislosťou

- Lymfadenopatia (dočasne opuchnuté lymfatické uzliny): 0,3 – 1 % príjemcov
- Oneskorené lokálne reakcie („COVID rameno“): vyrážka alebo opuch objavujúci sa ~7 dní po podaní vakcíny.
- Funkčná neurologická porucha: Veľmi zriedkavé neurologické príznaky súvisiace so stresom.

Oblasti prebiehajúceho výskumu s obmedzenými dôkazmi

1. Zmeny menštruačného cyklu

- Dôkazy: Viaceré štúdie ukazujú dočasné nepravidelnosti menštruačného cyklu u niektorých žien
- Povaha: Zvyčajne oneskorenie alebo silnejšie krvácanie počas 1 – 2 cyklov
- Kauzalita: Dočasné účinky imunitnej odpovede ako možný biologický mechanizmus
- Riešenie: Zvyčajne sa vráti do normálu v priebehu 1 – 2 menštruačných cyklov
- Klinický význam: Žiadne dôkazy o vplyve na plodnosť alebo dlhodobé reprodukčné zdravie (*Dorjee et al, PLoS One, 2025, Male, Brit Med J, 2022*).

2. Potenciálne dlhodobé imunitné účinky

- Súčasné dôkazy: Žiadny potvrdený signál pre významnú dlhodobú imunitnú dereguláciu
- Teoretické obavy: Niektorí hypotetizujú potenciálne účinky na vrodennú imunitu
- Stav sledovania: Sleduje sa prostredníctvom viacerých systémov dohľadu po uvedení na trh
- Vedecká zhoda: Žiadne dôkazy nepodporujú obavy z dlhodobého poškodenia imunity

Bežné mylné predstavy a nepravdivé tvrdenia

NEPRAVDIVÉ TVRDENIE: Hlásenia VAERS (Vaccine Adverse Event Reporting System) dokazujú tisíce úmrtí a vážnych ochorení spôsobených vakcínami proti COVID-19.

Realita:

- VAERS je pasívny systém hlásenia nežiaducich udalostí určený na včasnú detekciu signálov.
- Ktokoľvek môže nahlásiť akúkoľvek udalosť bez overenia príčinnej súvislosti.
- VAERS konkrétne uvádza: „Hlásenia môžu obsahovať neúplné, nepresné, náhodné a neoverené informácie“.
- Systém výslovne uvádza: „Samotný počet hlásení nemožno interpretovať ako dôkaz príčinnej súvislosti“.
- Časový prekryv udalostí s očkovaním sa bez dôkazov zamieňa s príčinnou súvislosťou.
- Potvrdenie príčinnej súvislosti si vyžaduje vyšetrovanie a kontrolované štúdie.

Prečo toto tvrdenie pretrváva: Viera v konšpirácie, nepochopenie účelu VAERS, zaujatosť pri hlásení udalostí, neobjektívny výber dát, nesprávna interpretácia a/alebo zámerné skresľovanie údajov niektorými autormi (*Seneff et al, Food Chem Toxicol, 2022*), viď tiež následnú kritickú reakciu (*Barrière et al, Food Chem Toxicol, 2023*).

NEPRAVDIVÉ TVRDENIE: mRNA vakcíny spôsobujú rýchly rozvoj rakoviny („turbo rakovina“).

Realita:

- Žiadne epidemiologické dôkazy neukazujú zvýšenú mieru rakoviny u očkovaných populácií.
- Vývoj rakoviny zvyčajne trvá roky alebo desaťročia, nie mesiace.
- Epidemiologické dáta sledujúce mieru rakoviny neukazujú žiadny signál pre zvýšené riziko v spojitosti s vakcináciou (National Cancer Institute, NIH, Cancer Stat facts) <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/all.html>).
- Tvrdenie je v rozpore so základnými princípmi biológie rakoviny.
- Tvrdenie je často založené na neoficiálnych správach o malom počte jednotlivých prípadov, bez štatistickej významnosti.

Prečo toto tvrdenie pretrváva: Viera v konšpirácie, nesprávne zamieňanie časovej súvislosti za kauzalitu: načasovanie vyšetrení a diagnóz rakoviny po rozsiahlych očkovacích kampaniach, keď pandémia ustúpila a riziko vážneho ochorenia COVID-19 sa znížilo. Nie je známe, či novo-diagnostikovaní pacienti absolvovali preventívne prehliadky alebo lekárske vyšetrenia pred očkovaním. Počas pandémie COVID-19 boli zdravotnícke zariadenia zahľtené starostlivosťou o pacientov s vážnym ochorením COVID-19, čo spôsobilo oneskorenie diagnostiky a starostlivosti o onkologických pacientov,

https://globalvaccinatedatanetwork.org/news/turbo_cancer_and_mrna_myth_that_defies_biology_and_physics.

Príčiny viery v konšpirácie

Psychologické štúdie ukazujú, že príčiny viery v konšpirácie možno zaradiť do šiestich kategórií: kognitívne (napr. štýl myslenia), motivačné (napr. vyhýbanie sa neistote), osobnostné (narcizmus), psychopatologické (tzv. Dark Triad traits: narcizmus, manipulativnosť a nedostatok empatie), politické (ideologická orientácia, autoritatívnosť, populizmus, politický cynizmus) a sociokultúrne (nedôvera v inštitúcie a vedu) (*Pilch et al, Front Psychol, 2023, Cosgrove et al, Front Psychol, 2023*).

K viere v konšpirácie zároveň prispieva nerealistický optimizmus vo vzťahu k vlastnému riziku infekcie, ktorý tiež ovplyvňuje vzťah k očkovaniu. Konšpiračné teórie sa zdravotným následkom infekcie vyhýbajú, alebo ich zľahčujú (*Salvador Casara et al, Soc Psychol Bull, 2022, Fleury-Bahi et al, Front Psychol, 2023*).

Dlhodobé monitorovanie bezpečnosti

Na celom svete bolo do konca roka 2024 podaných 13,5 miliárd dávok vakcín proti COVID-19:

- Viaceré systémy dlhodobého monitorovania bezpečnosti vykazujú konzistentné bezpečnostné profily.

- Nevyskytli sa žiadne neočakávané bezpečnostné signály okrem tých, ktoré boli identifikované v prvom roku.
- Dlhodobý dohľad nad potenciálnymi zriedkavými účinkami pokračuje prostredníctvom zavedených systémov.
- Miliardy dávok podaných globálne (13,64 miliárd k januáru 2025) poskytujú bezprecedentné údaje o bezpečnosti.
- Na základe dlhodobého monitorovania bezpečnosti boli mRNA vakcíny proti ochoreniu COVID-19 výrobcov Moderna a Pfizer-BioNTech štandardne registrované na používanie v humánnej medicíne.

Hodnotenie rizika

Riziko a prínos na úrovni populácie:

- Pre všetky vekové skupiny prínosy očkovania výrazne prevažujú nad rizikami, najmä počas obdobia vysokej vírusovej prenosnosti.

Individuálne zváženie rizika:

- U mladých mužov (16 – 24 rokov) je riziko myokarditídy zvýšené, ale stále výrazne prevažujú prínosy vakcinácie.
- Osoby s anamnézou závažných alergických reakcií vyžadujú lekársku konzultáciu.
- O väčšine ostatných rizík chýbajú vedecké dôkazy.

Transparentnosť o neistote:

- Ako pri každom medicínskom zákroku, časom sa môžu objaviť mimoriadne zriedkavé nežiaduce reakcie.
- Neustále monitorovanie a výskum prebiehajú.
- Súčasné dôkazy poskytujú silné uistenie o dlhodobej bezpečnosti mRNA vakcín.

4.8 HYPOTETICKÉ PÔSOBNIE ZVÝŠKOVEJ PLAZMIDOVEJ DNA NA ĽUDSKÝ ORGANIZMUS

Vplyv cudzorodej DNA na ľudský organizmus je dlhodobo predmetom pozornosti, najmä v kontexte bezpečnosti vakcín. Technológie mRNA vakcín priniesli revolúciu v profylaxii proti novým patogénom vrátane vírusu SARS-CoV-2. Vakcinácia proti ochoreniu COVID-19, ktoré tento vírus spôsobuje, zachránila množstvo ľudských životov a výrazne znížila počet hospitalizácií z dôvodu závažných symptómov (Obr. 4.5.1, *Our World of Data, 2025, Worldometer, 2025*). Napriek tomu sa od začiatku očkovania proti COVID-19 vo verejnom priestore šíria správy o zdravotných rizikách spojených so zvyškovou plazmidovou DNA v mRNA vakcínach. Tieto obavy sa dávajú do súvislosti predovšetkým so zápalovými procesmi a s integráciou DNA do ľudského genómu.

Ako je uvedené vyššie, plazmidová DNA sa využíva výlučne počas výroby ako templát pre aktívnu zložku mRNA vakcíny, preto sa jej zvyškové množstvo overuje už v priebehu výrobného procesu predtým, než sa mRNA zabalí do lipidových častíc. Toto je jediný spôsob, akým sa dá vylúčiť vplyv ďalších zložiek vakcíny a presne určiť množstvo zvyškovej DNA. V ďalších krokoch výroby sa DNA do mRNA vakcíny už nemá ako dostať. Výrobca o výsledkoch testov podáva dôkladnú správu a autorizačnú dokumentáciu. Certifikačná autorita, ktorou je oficiálne medicínske kontrolné laboratórium (OMCL), prísne overuje tieto výsledky predtým, než šarže vakcíny prepustí na používanie. Táto kontrola je označená ako OCABR (t.j. šarža uvoľnená oficiálnym kontrolným laboratóriom) a je zárukou toho, že množstvo DNA vo vakcíne je pod stanovenou limitnou hodnotou (*Milne et al, NPJ Vaccines, 2023*).

Je dôležité uviesť, že v produkcii mRNA vakcín proti ochoreniu COVID-19 sa používa iba plazmidová DNA bakteriálneho pôvodu. **Vakcína v procese výroby neprichádza do kontaktu so žiadnou DNA živočíšneho pôvodu, s ktorou by mohli byť spojené niektoré riziká prenosu proto-onkogénov alebo funkčných vírusových génov.** Tieto riziká v DNA bakteriálneho pôvodu nie sú prítomné. V tomto kontexte usmernenia WHO a FDA o živočíšnych bunkových substrátoch na produkciu biologických liekov určených pre ľudí nie sú relevantné (*Paul Ehrlich Institut, 2023*). Napriek tomu, regulačné

autority stanovili veľmi prísne limity na množstvo zvyškovej DNA v mRNA vakcínach proti COVID-19, pričom fragmentácia bakteriálnej a plazmidovej DNA počas výrobného procesu poskytuje ďalšiu záruku bezpečnosti, pretože DNA fragmenty nekódujú funkčné proteíny. To bol dôvod, pre ktorý expertné skupiny WHO a FDA prehodnotili pôvodné limity zvyškovej bunkovej DNA stanovené na 100 pg/dávkou biologického produktu pre humánnu medicínu (WHO, 2007, FDA, 2010). Z hľadiska výrazne nižšieho zdravotného rizika zvyškovej bakteriálnej alebo plazmidovej DNA v porovnaní s bunkovou DNA určili limit na 10 ng/dávkou lieku, ktorý sa aktuálne uplatňuje aj pri regulácii kvality mRNA vakcín.

Doposiaľ nie je k dispozícii žiadny spoľahlivý vedecký dôkaz, že množstvo reziduálnej DNA prekračuje bezpečnú hodnotu stanovenú pre mRNA vakcíny. Tvrdenia, že množstvo reziduálnej DNA v mRNA vakcínach proti COVID-19 vysoko prekračuje limit, sa zakladajú na výsledkoch testov, ktoré neprešli overením spoľahlivosti a boli technicky nesprávne uskutočnené a/alebo interpretované. K viacerým takýmto štúdiám boli publikované kritické články, v ktorých sú tieto nepravdivé tvrdenia vyvrátené na základe vedeckých a medicínskych poznatkov a epidemiologických dát (Barrière et al, Food Chem Toxicol, 2023, Mueed et al, J Clin Neurosci, 2025, Kaiser et al, Vaccine, 2025).

Objektívne zhodnotenie rizika zápalových reakcií vyvolaných zvyškovou DNA v mRNA vakcíne

DNA je určená primárne na uchovávanie genetickej informácie. Je uložená v jadre a v mitochondriách, a membránami oddelená od ostatných kompartmentov buniek. Bunky si na ochranu jej funkcií, replikácie a reparácie vyvinuli mechanizmy detekcie a eliminácie prítomnosti cudzorodej DNA, ktoré môžu byť aktivované ako tzv. alarm signál vrodenej imunity, napr. vírusovými a bakteriálnymi infekciami. V cytoplazme buniek sa môžu nachádzať aj fragmenty vlastnej jadrovej alebo mitochondriálnej DNA, ktoré sú znakom bunkového starnutia (tzv. senescencie) alebo poškodenia. Tieto fragmenty môžu byť eliminované pomocou autofágie v lyzozómoch alebo cytoplazmatickými nukleázami (Miller et al, Cell, 2021, Ivanov et al, J Cell Biol, 2013). V senescentných bunkách je množstvo cytoplazmatickej DNA zvýšené v dôsledku narušenia jadrovej membrány a redukcie cytoplazmatických DNáz (Takahashi et al, Nature Comm, 2018).

V ľudských bunkách sú fragmenty cytoplazmatickej DNA rozpoznávané ako nebezpečné molekuly, tzv. danger-associated recognition patterns, (DAMPs) prostredníctvom špecifických receptorov a cytoplazmatických senzorov. Spúšťajú odpoveď prirodzenej imunity zložitým molekulárnym mechanizmom (Hu and Shu, Annu Rev Immunol, 2020) a môžu byť príčinou zápalov, ktoré sú spojené s mnohými chronickými ochoreniami súvisiacimi s infekciou alebo starnutím organizmu, najmä s nádorovými, kardiovaskulárnymi a neurodegeneratívnymi ochoreniami (Brubaker et al., Annu Rev Immunol, 2015, Lan et al, 2019).

Napriek tomu, že SARS-CoV-2 je vírus s genómom RNA, pri infekcii vyvoláva poškodenie bunkovej DNA, spôsobuje nestabilitu genómu, tvorbu mikrojadier a aktivuje odpoveď bunky na DNA poškodenie. Tým aktivuje DAMP-závislé mechanizmy a prispieva k bunkovej senescencii, akumulácii vlastnej cytoplazmatickej DNA a stimulácii zápalových procesov, ktoré pri hyperaktivácii môžu u infikovaných osôb viesť k závažným prejavom ochorenia COVID-19 (Grand, J Gen Virol, 2023, Parthasaraty et al, Biochem Pharmacol, 2022).

Na základe týchto poznatkov sa zvyšková DNA začala spájať z rizikom zápalov. **Experimentálne bolo preukázané, že na vyvolanie detegovateľnej zápalovej odpovede v tele sú potrebné dávky dsDNA mnohonásobne vyššie než tie, ktoré sú reálne prítomné v očkovacích dávkach mRNA vakcín.** Napríklad, laboratórne modely dokazujú, že imunitná aktivácia sa prejavuje v prípade, ak je DNA podaná vo vysokých koncentráciách, ktoré ďaleko presahujú regulačné limity pre biologické prípravky, napr. dávka 10 µg (t.j. 10 000 ng) DNA podaných do svalu myši s hmotnosťou 25 g by zodpovedala dávke 20 g (t.j. 20 000 000 ng) DNA na 50 kg človeka (Gaitzsch et al, Sci Rep, 2017).

Údaje z post-marketingového monitoringu mRNA vakcín potvrdzujú, že výskyt autoimunitných a zápalových ochorení po očkovaní nie je vyšší, než je tomu v bežnej populácii.

Objektívne zhodnotenie rizika integrácie zvyškovej DNA z mRNA vakcíny do ľudského genómu

Neexistuje žiadny vedecký ani medicínsky dôkaz o integrácii zvyškovej DNA z mRNA vakcín do ľudského genómu, pričom na svete už bolo podaných viac než 13,5 miliárd dávok vakcín proti ochoreniu COVID-19. Tento fakt je veľmi silným argumentom proti tvrdeniu, že zvyšková DNA v mRNA vakcíne predstavuje riziko pre ľudský organizmus vo forme integrácie a genetickej modifikácie.

Dôkaz o integrácii neexistuje dokonca ani pre vakcíny na báze DNA, ako sú napr. adenovírusové vakcíny, alebo oslabené DNA vírusy, ktoré sa používali už dávnejšie profylakticky na celom svete proti rôznym infekčným ochoreniam a prispeli k ich eradikácii alebo potlačeniu (kiahne, osýpky, detská obrna a mnohé iné).

Navyše, 80 – 90 % ľudskej populácie je dlhodobo (väčšinou bezpríznakovo) infikovaných rôznymi DNA vírusmi (napr. adenovírusy, herpesvírusy, papilómavírusy, parvovírusy), pričom ich DNA pretrváva najmä v tzv. epizomálnom stave mimo genómu. Niektoré DNA vírusy však majú molekulárnu výbavu na to, aby sa ich DNA mohla integrovať do genómu našich somatických buniek. Napriek tomu neexistujú žiadne dôkazy o tom, že by z nás robili geneticky modifikované organizmy. **Šírenie takejto predstavy v spojitosti so zvyškovou DNA v mRNA vakcínach je nebezpečné a podkopáva dôveru v najúčinnjší a historicky mnohonásobne overený spôsob obrany proti závažným vírusovým ochoreniam.**

Riziko integrácie do genómu a riziko inzerčnej mutagenézy je pre zvyškovú DNA v mRNA vakcíne podanej injekčne do svalových buniek extrémne nízke a hypotetické (Ledwith et al, Intervirology, 2000, Temin, J Med Virol, 1990, Manam et al, Intervirology 2000, Hassett et al, Mol Ther, 2024, Kustanovich et al, Cancer Biol Ther, 2019).

- Integrácia je najúčinnnejšia počas delenia buniek, keď sa odstráni bariéra jadrovej membrány a DNA sa replikuje. Svalové bunky (a iné diferencované bunky ľudského organizmu, ktoré môžu prísť do kontaktu s vakcínou) sa delia veľmi zriedkavo, a majú intaktnú jadrovú membránu, čím sa pravdepodobnosť integrácie výrazne znižuje. Tieto somatické bunky sa líšia od experimentálnych bunkových línií, ktoré sa delia často a pritom replikujú svoju DNA.
- Vo zvyškovej DNA (odvodenej z bakteriálneho plazmidu) sa nenachádzajú sekvencie homológne s bunkovou DNA, ktoré sú predpokladom homológnej rekombinácie pri integrácii.
- Dvojvláknové zlomy v chromozomálnej DNA, ktoré by umožnili integráciu počas reparačných procesov sa v diferencovaných svalových bunkách vyskytujú len ojedinele a reparácia DNA je veľmi zriedkavá.
- V svalových a iných somatických bunkách nie sú prítomné špecifické enzýmy, ktoré sa pri experimentálnych postupoch pridávajú, aby sa zvýšila pravdepodobnosť integrácie (napr. transpozázy alebo integrázy z baktérií alebo fágov).
- Malé fragmenty DNA (~200 bp) sa integrujú veľmi neefektívne aj v experimentálnych podmienkach a pri mnohonásobne väčších vstupných množstvách DNA.
- Vakcína Comirnaty neobsahuje SV40 vírus ani onkogénny tohto vírusu, len jeho regulačný element (tzv. enhancer). Prítomnosť SV40 enhancera síce zvyšuje transkripciu RNA, ale nepodporuje integráciu plazmidovej DNA do hostiteľskej bunkovej DNA. Tento enhancer sa dlhodobo a bezpečne používa pri výrobe terapeutických protilátok, hormónov a vakcín.
- Aj v laboratóriu, pri optimalizovanej cielenej transfekcii DNA do buniek (v celistvej forme plazmidu a/alebo v mnohonásobne vyššej koncentrácii, ako je stanovené pre zvyškovú DNA vo vakcínach), plazmidová DNA dlhodobo ostáva mimo chromozomálnej DNA a pravdepodobnosť jej integrácie je veľmi nízka.
- Lipidové nanočastice (LNP) síce uľahčujú popri mRNA aj dopravenie zvyškovej DNA do buniek a znižujú jej degradáciu v endozómoch, ale nezvyšujú pravdepodobnosť vstupu DNA do bunkového jadra a integrácie do bunkového genómu.
- Integrácia je neúčinná aj v experimentálnych systémoch, ak sa nenavodí selekčný tlak.
- Spontánne mutácie sa v genóme buniek odohrávajú s oveľa vyššou frekvenciou, ako je teoretická pravdepodobnosť integrácie cudzorodej zvyškovej DNA .

- Z kvantitatívneho hľadiska 10 ng DNA vo forme ~200 bp fragmentov zodpovedá množstvu cca 3×10^{10} molekúl. Ak sa toto množstvo distribuuje do desiatok tisícov svalových buniek v mieste vpichu, tak na jednu bunku pripadá množstvo zvyškovej DNA, ktoré je o mnoho rádov menšie než množstvo DNA v laboratórnych experimentoch, na základe ktorých boli vyslovené obavy o riziku integrácie. Navyše, do svalových buniek sa dostane iba časť vakcíny, zvyšok je z medzibunkového priestoru vychytaný imunitnými bunkami, ktoré cudzorodú DNA efektívne degradujú, čím sa ešte viac znižuje teoretické riziko integrácie.
- Formou a dĺžkou okolo 150 bp sa fragmentovaná zvyšková DNA podobá voľnej DNA prirodzene cirkulujúcej v krvi. Táto DNA je rýchlo odstraňovaná pôsobením enzýmov nukleáz prítomných v krvi, fagocytózou bielymi krvinkami, ale aj metabolizmom v pečeni a uvoľňovaním v obličkách. Rýchlosť odstraňovania krátkej fragmentovanej DNA je značná, s polčasom rozpadu v rozmedzí od 4 min do 1-2h.

Komparatívny kontext rizika integrácie cudzorodej DNA do ľudského genómu:

- Mnohé biologické liečivá na báze rekombinantných produktov obsahujú zvyškovú DNA (inzulín, rastový hormón, protilátky na liečbu rakoviny, napr. herceptín, cetuximab, bevacizumab a pod.). Tieto lieky sa pacientom podávajú intradermálne, intramuskulárne alebo intravenózne v pravidelnom režime a v pomerne vysokých dávkach v priebehu dlhodobej liečby, alebo dokonca celoživotne. Neexistuje však žiadny dôkaz o tom, že by sa zvyšková DNA z týchto biologických liekov integrovala do ľudského genómu.
- Zvyšková DNA sa nachádza v mnohých vakcínach, ktoré sa už roky používajú v ľudskej populácii, napriek tomu nie sú známe žiadne prípady jej integrácie do genómu (napr. vakcíny proti chrípke, žltacke typu A, besnote, ovčím kiahňam a i.). V niektorých vektorových vakcínach (napr. adenovírusových) je DNA hlavnou zložkou a napriek tomu nie sú dôkazy o jej integrácii do genómu človeka.
- Ak by aj hypoteticky došlo k integrácii, týkalo by sa to iba mizivého počtu somatických buniek a náhodných pozícií v genóme bez funkčných dôsledkov.

Na základe súčasných vedeckých dôkazov, regulačných hodnotení a výsledkov dlhodobých praktických aplikácií je riziko genomickej integrácie reziduálnej DNA z vakcín extrémne nízke a má minimálny biologický význam.

5. REFERENCIE

Agilent. Trusted Answers. Nucleic Acid Analysis for Sample Quality Assessment Using the Agilent Fragment Analyzer Systems, 2022. <https://www.agilent.com/cs/library/applications/application-nucleic-acid-qc-fragment-analyzer-5994-2813en-agilent.pdf>

Agilent. Benefits of Quality Control in the IVT RNA Workflow Using the Agilent 5200 Fragment Analyzer System, 2023. <https://www.agilent.com/cs/library/applications/application-quality-ivt-rna-workflow-fragment-analyzer-5994-0512en-agilent.pdf>

Agilent. Technical Overview. CQA Assessment of LNP- Encapsulated IVT mRNA Using Agilent Fragment Analyzer Systems, 2025. <https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/te-cqa-analysis-lnp-ivtmrna-5994-8171en-agilent.pdf>

Agilent. Agilent DNF-464 HS Large Fragment 50 kb Kit. Quick Guide. 2025. <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/quick-guide-dnf-464-HS-Large-Fragment-kit-SD-AT000127.pdf>

Andrews S. (2010). *FastQC: A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data*. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>

Asplund M, Kjartansdóttir KR, Møllerup S, Vinner L, Fridholm H, Herrera JAR, Friis-Nielsen J, Hansen TA, Jensen RH, Nielsen IB, Richter SR, Rey-Iglesia A, Matey-Hernandez ML, Alquezar-Planas DE, Olsen PVS, Sicheritz-Pontén T, Willerslev E, Lund O, Brunak S, Hansen, AJ (2019). Contaminating viral sequences in high-throughput sequencing viromics: A linkage study of 700 sequencing libraries. *Clinical Microbiology and Infection*, 25(10), 1277–1285. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.04.028>

Banerjee I, Robinson J, Banerjee I. Cardiac Complications Associated With COVID-19 Vaccination: A Systematic Review of Cohort Studies. *Cureus*. 2025 Feb 5;17(2):e78535. doi: 10.7759/cureus.78535.

Bao H, Yang S, Chen X, Zhou Q. (2025). Early detection of multiple cancer types using multidimensional cell-free DNA fragmentomics. *Nature Medicine*. Advance online publication. <https://doi.org/10.1038/s41591-025-03735-2>

Barrière J, Frank F, Besancon L, Samuel A, Saada V, Billy E, Al-Ahmad A, Florens N, Seitz-Polski B, Robert J. Letter to Editor „Innate immune suppression by SARS-CoV-2 mRNA vaccinations: The role of G-quadruplexes, exosomes, and MicroRNAs”: Important concerns on the validity of this article. *Food Chem Toxicol*. 2023 Aug;178:113897. doi: 10.1016/j.fct.2023.113897.

Beladiya J, Kumar A, Vasava Y, Parmar K, Patel D, Patel S, Dholakia S, Sheth D, Boddu SHS, Patel C. Safety and efficacy of COVID-19 vaccines: A systematic review and meta-analysis of controlled and randomized clinical trials. *Rev Med Virol*. 2024 Jan;34(1):e2507. doi: 10.1002/rmv.2507.

BIO-RAD, qPCR Assay Design and Optimization, <https://www.bio-rad.com/en-sk/applications-technologies/qpcr-assay-design-optimization?ID=LUSO7RIVK#>

BIO-RAD, The Ultimate qPCR Design Guide, https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6894.pdf

Boršová K, Paul ED, Kováčová V, Radvánszka M, Hajdu R, Čabanová V, Sláviková M, Ličková M, Lukáčiková Ľ, Belák A, Roussier L, Kostičová M, Líšková A, Maďarová L, Štefkovičová M, Reizigová L, Nováková E, Sabaka P, Koščálová A, Brejová B, Staroňová E, Mišík M, Vinař T, Nosek J, Čekan P, Klempa B. Surveillance of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in Slovakia using a novel, multiplexed RT-qPCR assay. *Sci Rep*. 2021 Oct 14;11(1):20494. doi: 10.1038/s41598-021-99661-7.

Brejová B, Boršová K, Hodorová V, Čabanová V, Reizigová L, Paul ED, Čekan P, Klempa B, Nosek J, Vinař T. A SARS-CoV-2 mutant from B.1.258 lineage with Δ H69/ Δ V70 deletion in the Spike protein circulating in Central Europe in the fall 2020. *Virus Genes*. 2021 Dec;57(6):556-560. doi: 10.1007/s11262-021-01866-5.

Brejová B, Hodorová V, Boršová K, Cabanová V, Szemes T, Mišík M, Klempa B, Nosek J, Vinař T. Sequencing SARS-CoV-2 in Slovakia: An Unofficial Genomic Surveillance Report. <https://ceur-ws.org/Vol-2962/paper16.pdf>

Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, Kagan JC. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu Rev Immunol*. 2015;33:257-90. doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112240.

Bustin SA, Ruijter JM, van den Hoff MJB, Kubista M, Pfaffl MW, Shipley GL, Tran N, Rödiger S, Untergasser A, Mueller R, Nolan T, Milavec M, Burns MJ, Huggett JF, Vandesompele J, Wittwer CT. MIQE 2.0: Revision of the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments Guidelines. *Clin Chem*. 2025 Apr 24:hvaf043. doi: 10.1093/clinchem/hvaf043.

Cezard GI, Denholm RE, Knight R, Wei Y, Teece L, Toms R, Forbes HJ, Walker AJ, Fisher L, Massey J, Hopcroft LEM, Horne EMF, Taylor K, Palmer T, Arab MA, Cuitun Coronado JI, Ip SHY, Davy S, Dillingham I, Bacon S, Mehrkar A, Morton CE, Greaves F, Hyams C, Davey Smith G, Macleod J, Chaturvedi N, Goldacre B, Whiteley WN, Wood AM, Sterne JAC, Walker V; Longitudinal Health and Wellbeing and Data and Connectivity UK COVID-19 National Core Studies, CONVALESCENCE study and the OpenSAFELY collaborative. Impact of vaccination on the association of COVID-19 with cardiovascular diseases: An OpenSAFELY cohort study. *Nat Commun*. 2024 Mar 11;15(1):2173. doi: 10.1038/s41467-024-46497-0

Chaudhary N, Weissman D, Whitehead KA. mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation. *Nat Rev Drug Discov*. 2021 Nov;20(11):817-838. doi: 10.1038/s41573-021-00283-5. Epub 2021 Aug 25. Erratum in: *Nat Rev Drug Discov*. 2021 Nov;20(11):880. doi: 10.1038/s41573-021-00321-2.

Cosgrove TJ, Murphy CP. Narcissistic susceptibility to conspiracy beliefs exaggerated by education, reduced by cognitive reflection. *Front Psychol*. 2023 Jul 6;14:1164725. doi: 10.3389/fpsyg.2023.1164725.

COVID-19 vaccinations have saved more than 1.4 million lives in the WHO European Region, a new study finds. <https://www.who.int/europe/news/item/16-01-2024-covid-19-vaccinations-have-saved-more-than-1.4-million-lives-in-the-who-european-region--a-new-study-finds>

Crommelin DJA, Anchordoquy TJ, Volkin DB, Jiskoot W, Mastrobattista E. Addressing the Cold Reality of mRNA Vaccine Stability. *J Pharm Sci*. 2021 Mar;110(3):997-1001. doi: 10.1016/j.xphs.2020.12.006.

Czamara, K., Majzer, K., Pacia, M. Z., Kochan, K., Kaczor, A., Baranska, M. (2015). Raman spectroscopy of lipids: A review. *Journal of Raman Spectroscopy*, 46, 4–20. doi.org/10.1002/jrs.622

Dorjee K, Sadoff RC, Mansour FR, Dorjee S, Binder EM, Stetson M, Yuen R, Kim H. Menstrual disturbance associated with COVID-19 vaccines: A comprehensive systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2025 May 16;20(5):e0320162. doi: 10.1371/journal.pone.0320162.

Eigler, S., Hirsch, A. (2014). Chemistry with graphene and graphene oxide—Challenges for synthetic chemists. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(30), 7720–7738. doi.org/10.1002/anie.201402780

El-Baky NA, Amara AA, Uversky VN, Redwan EM. Intrinsic factors behind long COVID: III. Persistence of SARS-CoV-2 and its components. *J Cell Biochem*. 2024 Jan;125(1):22-44. doi: 10.1002/jcb.30514.

European Commission, Directorate-General for Health and Food Safety: ADVANCE PURCHASE AGREEMENT („APA”) for the development, production, priority-purchasing options and supply of a successful COVID-19 vaccine for EU Member States. SANTE/2020/C3/043 -S112.838335. <https://individuelle-impfentscheidung.de/fileadmin/PDF/Contract-EU-Pfizer.pdf>

European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use, Assessment report. Comirnaty. 19 February 2021. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/comirnaty-epar-public-assessment-report_en.pdf

European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use, Guideline on the quality aspects of mRNA vaccines. Draft, 27 March 2025, EMA/CHMP/BWP/82416/2025, https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-guideline-quality-aspects-mrna-vaccines_en.pdf

European Medicines Agency 2025: Claims about levels of DNA residues in mRNA COVID-19 vaccines. Unvalidated tests may produce inaccurate results. <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory-overview/public-health-threats/coronavirus-disease-covid-19/covid-19-medicines/covid-19-vaccines-key-facts>

European Medicines Agency. (n.d.). Spikevax (elasomeran): Product information. Dátum prístupu: 20. 7. 2025. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/Spikevax-epar-product-information_en.pdf

European Virus Archive (https://www.european-virus-archive.com/eva-portal?portal_search=SARS-CoV-2+Slovakia&advanced_icv_tax_search=)

FDA Guidance for Industry: Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Materials Used in the Production of Viral Vaccines for Infectious Disease Indications. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration Center for Biologics Evaluation and Research, February, 2010. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/characterization-and-qualification-cell-substrates-and-other-biological-materials-used-production>

Ferrari, A. C., Robertson, J. (2000). Interpretation of Raman spectra of disordered and amorphous carbon. *Physical Review B*, 61(20), 14095–14107. doi.org/10.1103/PhysRevB.61.14095

Fleming RM, Kotlar P, Pekova S. Quantitative Analysis of Nucleic Acid Content in Spikevax (Moderna) and BNT162b2 (Pfizer) COVID-19 Vaccine Lots. *HSOA Journal of Angiology & Vascular Surgery* 2025, 10, 124, DOI:[10.24966/AVS-7397/100124](https://doi.org/10.24966/AVS-7397/100124)

Gaitzsch E, Czermak T, Ribeiro A, Heun Y, Bohmer M, Merkle M, Mannell H, Schulz C, Wörnle M, Pircher J. Double-stranded DNA induces a prothrombotic phenotype in the vascular endothelium. *Sci Rep*. 2017 Apr 25;7(1):1112. doi: 10.1038/s41598-017-01148-x.

Gao, F., Han, L. J., & Liu, X. (2017). Vibration spectroscopic technique for species identification based on lipid characteristics. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 10(3), 255–268. doi.org/10.3965/j.ijabe.20171003.3144

García-Alcalde F, Okonechnikov K, Carbonell J, Cruz LM, Götz S, Tarazona S, Dopazo J, Meyer TF, Conesa A. (2012). Qualimap: Evaluating next-generation sequencing alignment data. *Bioinformatics*, 28(20), 2678–2679. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts503>

Grand RJ. SARS-CoV-2 and the DNA damage response. *J Gen Virol*. 2023 Nov;104(11):001918. doi: 10.1099/jgv.0.001918.

Hassett KJ, Rajlic IL, Bahl K, White R, Cowens K, Jacquinet E, Burke KE. mRNA vaccine trafficking and resulting protein expression after intramuscular administration. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2023 Nov 24;35(1):102083. doi: 10.1016/j.omtn.2023.102083.

Hedberg P, van der Werff SD, Naclér P. The Effect of COVID-19 Vaccination on the Risk of Persistent Post-COVID-19 Condition: Cohort Study. *J Infect Dis*. 2025 Jun 2;231(5):e941-e944. doi: 10.1093/infdis/jiaf133.

Holesova Z, Pös O, Gazdarica J, Kucharik M, Budis J, Hyblova M, Minarik G, Szemes T. (2024). Understanding genetic variability: Exploring large-scale copy number variants through non-invasive prenatal testing in European populations. *BMC Genomics*, 25(1), 366. <https://doi.org/10.1186/s12864-024-10267-5>

Hou, X., Zaks, T., Langer, R., Dong, Y. (2021). Lipid nanoparticles for mRNA delivery. *Nature Reviews Materials*, 6, 1078–1094. doi.org/10.1038/s41578-021-00358-0

Hu MM, Shu HB. Innate Immune Response to Cytoplasmic DNA: Mechanisms and Diseases. *Annu Rev Immunol*. 2020 Apr 26;38:79-98. doi: 10.1146/annurev-immunol-070119-115052.

Human Mortality Database; World Mortality Dataset (2024); Karlinsky and Kobak (2021); Human Mortality Database (2025); World Mortality Database (2024) – processed by Our World in Data. „Excess mortality: Deaths from all causes compared to average over previous years” [dataset]. Human Mortality Database, „Human Mortality Database”; World Mortality Database, „World Mortality Database” [original data]. Retrieved July 15, 2025 from <https://archive.ourworldindata.org/20250715-063948/grapher/excess-mortality-p-scores-average-baseline.html> (archived on July 15, 2025).

Ip S, North TL, Torabi F, Li Y, Abbasizanjani H, Akbari A, Horne E, Denholm R, Keene S, Denaxas S, Banerjee A, Khunti K, Sudlow C, Whiteley WN, Sterne JAC, Wood AM, Walker V; CVD-COVID-UK/COVID-IMPACT Consortium; Longitudinal Health and Wellbeing COVID-19 National Core Study. Cohort study of cardiovascular safety of different COVID-19 vaccination doses among 46 million adults in England. *Nat Commun*. 2024 Jul 31;15(1):6085. doi: 10.1038/s41467-024-49634-x.

Ivanov A, Pawlikowski J, Manoharan I, van Tuyn J, Nelson DM, Rai TS, Shah PP, Hewitt G, Korolchuk VI, Passos JF, Wu H, Berger SL, Adams PD. Lysosome-mediated processing of chromatin in senescence. *J Cell Biol*. 2013 Jul 8;202(1):129-43. doi: 10.1083/jcb.201212110.

Ju J, Kim DH, Bi L, Meng Q, Bai X, Li Z, Li X, Marma MS, Shi S, Wu J, Edwards JR, Romu A, Turro NJ (2006). Four-color DNA sequencing by synthesis using cleavable fluorescent nucleotide reversible terminators. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(52), 19635–19640. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609513103>

Kajanová I, Lukaciková L, Jelenská L, Grossmannová K, Radiková Z, Vlček M, Klempa B, Kollar R, Bodová K, Kopáček J, Pastoreková S. Seroprevalence of SARS-CoV-2 IgG antibodies in the staff of the Slovak Academy of Sciences in response to COVID-19 and/or vaccination: situation in August 2021. *Acta Virol*. 2021;65(4):420-432. doi: 10.4149/av_2021_407.

Kajanová I, Grossmannová K, Jelenská L, Lukaciková L, Radiková Z, Knutová N, Nahliková J, Belisová M, Pastoreková S, Kopáček J. Seroprevalence of SARS-CoV-2 antibodies in the county town of Slovakia - a pilot study from the Trenčín city. *Acta Virol*. 2022;66(3):228-237. doi: 10.4149/av_2022_301.

Kaiser S, Kaiser S, Reis J, Marschalek R. Quantification of objective concentrations of DNA impurities in mRNA vaccines. *Vaccine*. 2025 Mar 21;55:127022. doi: 10.1016/j.vaccine.2025.127022.

Karikó K, Buckstein M, Ni H, Weissman D. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity*. 2005 Aug;23(2):165-75. doi: 10.1016/j.immuni.2005.06.008.

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* Volume: v5.2019-2024 December 2024

Kovacech B, Fialová L, Filipčík P, Skrabana R, Zilková M, Paulenka-Ivanovová N, Kováč A, Palová D, Rolková GP, Tomková K, Csoková NT, Marková K, Skrabanová M, Sinská K, Basheer N, Majerová P, Hanes J, Parrak V, Prcina M, Cehlar O, Cente M, Piestanský J, Fresser M, Novák M, Slaviková M, Borsova K, Cabanova V, Brejova B, Vinař T, Nosek J, Klempa B, Eyer L, Hönig V, Palus M, Ruzek D, Vyhlídalová T, Straková P, Mrazková B, Zudová D, Koubková G, Novosádová V, Procházka J, Sedláček R, Zilka N, Kontsekova E. Monoclonal antibodies targeting two immunodominant epitopes on the Spike protein neutralize emerging SARS-CoV-2 variants of concern. *EBioMedicine*. 2022 Feb;76:103818. doi: 10.1016/j.ebiom.2022.103818.

König B, Kirchner JO. Methodological Considerations Regarding the Quantification Regarding the Quantification of DNA Impurities in the COVID-19 mRNA Vaccine Comirnaty®. *Methods Protoc*. 2024, 7,41, <https://doi.org/10.3390/mps7030041>

König B, Kirchner JO. Communication on Methodological Considerations Regarding the Quantification of DNA Impurities in the COVID-19 mRNA Vaccine Comirnaty®. *Methods Protoc.* 2024, 7, 41, Not peer reviewed, <https://www.preprints.org/manuscript/202411.1912/v3>

+ reakcia redakcie

Expression of concern, *Methods and Protocols Editorial Office, Methods Protoc.* 2025, 8, 68.

<https://doi.org/10.3390/mps8040068>

Kucharik M, Gnip A, Hyblova M, Budis J, Strieskova L, Harsanyova M, Pös O, Kubiritova Z, Radvanszky J, Minarik G, Szemes T. (2020). Non-invasive prenatal testing (NIPT) by low coverage genomic sequencing: Detection limits of screened chromosomal microdeletions. *PLoS ONE*, 15(8), e0238245.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238245>

Kustanovich A, Schwartz R, Peretz T, Grinshpun A. Life and death of circulating cell-free DNA. *Cancer Biol Ther.* 2019;20(8):1057-1067. doi: 10.1080/15384047.2019.1

Kuzmin, V. V., Novikov, V. S., Ustynyuk, L. Yu., Prokhorov, K. A., Sagitova, E. A. (2020). Raman spectra of polyethylene glycols: Comparative experimental and DFT study. *Journal of Molecular Structure*, 1217, 128331. doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.128331

Lak V, Sjöland H, Adiels M, Lundberg CE, Robertson J, Åberg M, Alex C, Lindgren M, Rosengren A. Preexisting symptoms increase the risk of developing long COVID during the SARS-CoV-2 pandemic. *J Intern Med.* 2025 Aug;298(2):107-122. doi: 10.1111/joim.20102.

Lan YY, Heather JM, Eisenhaure T, Garriss CS, Lieb D, Raychowdhury R, Hacohen N. Extranuclear DNA accumulates in aged cells and contributes to senescence and inflammation. *Aging Cell.* 2019 Apr;18(2):e12901. doi: 10.1111/ace1.12901.

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, International Human Genome Sequencing Consortium (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822), 860–921.

<https://doi.org/10.1038/35057062>

Lane CD, Marbaix G, Gurdon JB. Rabbit haemoglobin synthesis in frog cells: the translation of reticulocyte 9 s RNA in frog oocytes. *J Mol Biol.* 1971 Oct 14;61(1):73-91. doi: 10.1016/0022-2836(71)90207-5.

Langmead B, Salzberg SL. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4), 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>

Leban M, Vodopivec Seravalli T, Hauer M, Böhm E, Mencin N, Potušek S, Thompson A, Trontelj J, Štrancar A, Sekirnik R. Determination of linearized pDNA template in mRNA production process using HPLC. *Anal Bioanal Chem.* 2024 Apr;416(10):2389-2398. doi: 10.1007/s00216-024-05204-0.

Ledwith BJ, Manam S, Troilo PJ, Barnum AB, Pauley CJ, Griffiths TG 2nd, Harper LB, Beare CM, Bagdon WJ, Nichols WW. Plasmid DNA vaccines: investigation of integration into host cellular DNA following intramuscular injection in mice. *Intervirology.* 2000;43(4-6):258-72. doi: 10.1159/000053993.

Liang S, Bao C, Yang Z, Liu S, Sun Y, Cao W, Wang T, Schwantes-An TH, Choy JS, Naidu S, Luo A, Yin W, Black SM, Wang J, Ran P, Desai AA, Tang H. SARS-CoV-2 spike protein induces IL-18-mediated cardiopulmonary inflammation via reduced mitophagy. *Signal Transduct Target Ther.* 2023 Mar 9;8(1):108. doi: 10.1038/s41392-023-01368-w.

Life Technologies: Real-time PCR handbook, <https://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>

Male V. Menstruation and covid-19 vaccination. *BMJ.* 2022 Jan 26;376:o142. doi: 10.1136/bmj.o142.

Manam S, Ledwith BJ, Barnum AB, Troilo PJ, Pauley CJ, Harper LB, Griffiths TG 2nd, Niu Z, Denisova L, Follmer TT, Pacchione SJ, Wang Z, Beare CM, Bagdon WJ, Nichols WW. Plasmid DNA vaccines: tissue distribution and

effects of DNA sequence, adjuvants and delivery method on integration into host DNA. *Intervirology*. 2000;43(4-6):273-81. doi: 10.1159/000053994.

Markov, P.V., Ghafari, M., Beer, M. *et al.* The evolution of SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol* **21**, 361–379 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00878-2>

Mayorga, C., Athalye, S.M., Boodaghidizaji, M., Sarathy, N., Hosseini, M., Ardekani, A. and Verma, M.S., (2025). Raman spectroscopic characterization of mRNA COVID-19 vaccines. *bioRxiv*. doi: 10.1101/2025.01.17.632088

McKernan K, Helbert Y, Kane LT, McLaughlin S. Sequencing of bivalent Moderna and Pfizer mRNA vaccines reveals nanogram to microgram quantities of expression vector dsDNA per dose. Publication date 2023-04-10, Preprint, not reviewed <https://doi.org/10.31219/osf.io/b9t7m>

Mercadé-Besora N, Li X, Kolde R, Trinh NT, Sanchez-Santos MT, Man WY, Roel E, Reyes C, Delmestri A, Nordeng HME, Uusküla A, Duarte-Salles T, Prats C, Prieto-Alhambra D, Jödicke AM, Català M. The role of COVID-19 vaccines in preventing post-COVID-19 thromboembolic and cardiovascular complications. *Heart*. 2024 Apr 15;110(9):635-643. doi: 10.1136/heartjnl-2023-323483.

Midoux P, Pichon C. Lipid-based mRNA vaccine delivery systems. *Expert Rev Vaccines*. 2015 Feb;14(2):221-34. doi: 10.1586/14760584.2015.986104.

Milne C, Wagner R, Cano F, Bruysters M, Waeterloos G, Pullirsch D, Wierer M, Mallet L. Independent control of COVID-19 vaccines by EU Official Control Authority Batch Release: challenges, strengths and successes. *NPJ Vaccines*. 2023 Feb 23;8(1):22. doi: 10.1038/s41541-023-00617-x.

Miller KN, Victorelli SG, Salmonowicz H, Dasgupta N, Liu T, Passos JF, Adams PD. Cytoplasmic DNA: sources, sensing, and role in aging and disease. *Cell*. 2021 Oct 28;184(22):5506-5526. doi: 10.1016/j.cell.2021.09.034.

Minarik G, Repiska G, Hyblova M, Nagyova E, Soltys K, Budis J, Duris F, Sysak R, Gerykova Bujalkova M, Vlkova-Izrael B, Biro O, Nagy B, Szemes T (2015). Utilization of Benchtop Next Generation Sequencing Platforms Ion Torrent PGM and MiSeq in Noninvasive Prenatal Testing for Chromosome 21 Trisomy and Testing of Impact of In Silico and Physical Size Selection on Its Analytical Performance. *PLoS ONE*, 10(12), e0144811. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144811>

Montero DA, Vidal RM, Velasco J, Carreño LJ, Torres JP, Benachi O MA, Tovar-Rosero YY, Oñate AA, O’Ryan M. Two centuries of vaccination: historical and conceptual approach and future perspectives. *Front Public Health*. 2024 Jan 9;11:1326154. doi: 10.3389/fpubh.2023.1326154.

Movasaghi, Z., Rehman, S., ur Rehman, D. I. (2007). Raman spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 42(5), 493–541. doi.org/10.1080/05704920701551530

Nandi A, Shet A. Why vaccines matter: understanding the broader health, economic, and child development benefits of routine vaccination. *Hum Vaccin Immunother*. 2020 Aug 2;16(8):1900-1904. doi: 10.1080/21645515.2019.1708669.

National Cancer Institute, NIH, Cancer Stat facts: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/all.html>)

Our World in Data collated official data (2024); World Health Organisation (2025) – with major processing by Our World in Data. „Total COVID-19 vaccine doses administered” [dataset]. Official data collated by Our World in Data, „COVID-19, vaccinations”; World Health Organisation, „COVID-19, vaccinations (WHO)” [original data]. Retrieved May 8, 2025 from <https://ourworldindata.org/grapher/cumulative-covid-vaccinations>

Pardi, N., Hogan, M. J., Porter, F. W., Weissman, D. (2018). mRNA vaccines—A new era in vaccinology. *Nature Reviews Drug Discovery*, 17(4), 261–279. doi.org/10.1038/nrd.2017.243

Park SO, Nanda N. Long COVID: A Systematic Review of Preventive Strategies. *Infect Dis Rep*. 2025 May 21;17(3):56. doi: 10.3390/idr17030056.

Parthasarathy U, Martinelli R, Vollmann EH, Best K, Therien AG. The impact of DAMP-mediated inflammation in severe COVID-19 and related disorders. *Biochem Pharmacol.* 2022 Jan;195:114847. doi: 10.1016/j.bcp.2021.114847.

Patone M, Mei XW, Handunnetthi L, Dixon S, Zaccardi F, Shankar-Hari M, Watkinson P, Khunti K, Harnden A, Coupland CAC, Channon KM, Mills NL, Sheikh A, Hippisley-Cox J. Risks of myocarditis, pericarditis, and cardiac arrhythmias associated with COVID-19 vaccination or SARS-CoV-2 infection. *Nat Med.* 2022 Feb;28(2):410-422. doi: 10.1038/s41591-021-01630-0.

Paul-Ehrlich-Institut 2023. Information for Healthcare professionals. Testing of COVID-19 mRNA vaccines. https://www.pei.de/SharedDocs/Downloads/EN/newsroom-en/notification/231222-testing-mrna-vaccinas-dna-contamination.pdf?__blob=publicationFile&v=3

Pfizer Inc. (n.d.). Comirnaty: Highlights of Prescribing Information. Dátum prístupu: 20. 7. 2025. <https://labeling.pfizer.com/ShowLabeling.aspx?id=15502&utm>

Pierna, J. A. F., Abbas, O., Dardenne, P., Baeten, V. (2011). Discrimination of Corsican honey by FT-Raman spectroscopy and chemometrics. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment.* <https://popups.uliege.be/1780-4507/index.php?id=6895Honey>

Pilch I, Turska-Kawa A, Wardawy P, Olszanecka-Marmola A, Smółkowska-Jędo W. Contemporary trends in psychological research on conspiracy beliefs. A systematic review. *Front Psychol.* 2023 Feb 8;14:1075779. doi: 10.3389/fpsyg.2023.1075779.

Rodríguez C, Luque N, Blanco I, Sebastian L, Barberà JA, Peinado VI, Tura-Ceide O. Pulmonary Endothelial Dysfunction and Thrombotic Complications in Patients with COVID-19. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2021 Apr;64(4):407-415. doi: 10.1165/rcmb.2020-0359PS.

Rossouw TM, Anderson R, Manga P, Feldman C. Emerging Role of Platelet-Endothelium Interactions in the Pathogenesis of Severe SARS-CoV-2 Infection-Associated Myocardial Injury. *Front Immunol.* 2022 Feb 4;13:776861. doi: 10.3389/fimmu.2022.776861.

Rusňáková D, Sedláčková T, Radvák P, Böhmer M, Mišenko P, Budiš J, Bokorová S, Lipková N, Forgáčová-Jakúbková M, Sládeček T, Sitarčík J, Krampfl W, Gažiová M, Kaliňáková A, Staroňová E, Tichá E, Vrábľová T, Ševčíková L, Kotvasová B, Maďarová L, Feiková S, Beňová K, Reizigová L, Onderková Z, Ondrušková D, Loderer D, Škereňová M, Danková Z, Janíková K, Halašová E, Nováková E, Turňa J, Szemes T. Systematic Genomic Surveillance of SARS-CoV-2 Virus on Illumina Sequencing Platforms in the Slovak Republic-One Year Experience. *Viruses.* 2022 Nov 2;14(11):2432. doi: 10.3390/v14112432.

Qubit™ dsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kit, Qubit https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/Qubit_dsDNA_HS_Assay_UG.pdf

Rodà, F., Picciolini, S., Mangolini, V., Gualerzi, A., Seneci, P., Renda, A., Sesana, S., Re, F., Bedoni, M. (2023). Raman spectroscopy characterization of multi-functionalized liposomes as drug-delivery systems for neurological disorders. *Nanomaterials*, 13(4), 699. doi.org/10.3390/nano13040699

Rudolph AE, Al Akoury N, Bogdanenko N, Markus K, Whittle I, Wright O, Haridy H, Spinardi JR, McLaughlin JM, Kyaw MH. Factors affecting the impact of COVID-19 vaccination on post COVID-19 conditions among adults: A systematic literature review. *Hum Vaccin Immunother.* 2025 Dec;21(1):2474772. doi: 10.1080/21645515.2025.2474772.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>

Satyam SM, El-Tanani M, Bairy LK, Rehman A, Srivastava A, Kenneth JM, Prem SM. Unraveling Cardiovascular Risks and Benefits of COVID-19 Vaccines: A Systematic Review. *Cardiovasc Toxicol.* 2025 Feb;25(2):306-323. doi: 10.1007/s12012-024-09954-2.

Schoenmaker L, Witzigmann D, Kulkarni JA, Verbeke R, Kersten G, Jiskoot W, Crommelin DJA. mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines: Structure and stability. *Int J Pharm*. 2021 May 15;601:120586. doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120586.

Seneff S, Nigh G, Kyriakopoulos AM, McCullough PA. Innate immune suppression by SARS-CoV-2 mRNA vaccinations: The role of G-quadruplexes, exosomes, and MicroRNAs. *Food Chem Toxicol*. 2022 Jun;164:113008. doi: 10.1016/j.fct.2022.113008.

Sett S, Dos Santos Ribeiro C, Prat C, Haringhuizen G; European Virus Archive principal investigators incl. Klempa B; Scholz AH. Access and benefit-sharing by the European Virus Archive in response to COVID-19. *Lancet Microbe*. 2022 Apr;3(4):e316-e323. doi: 10.1016/S2666-5247(21)00211-1.

Sharma, V. K., Agrawal, M. K. (2021). A historical perspective of liposomes – a bio nanomaterial. *Materials Today: Proceedings*, 45(Part 2), 2963–2966.

Shi, Y., Shi, M., Wang, Y. *et al*. Progress and prospects of mRNA-based drugs in pre-clinical and clinical applications. *Sig Transduct Target Ther* 9, 322 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41392-024-02002-z>

Sociologický ústav SAV. Aký je pomer priaznivcov a odporcov konšpirácií v slovenskej spoločnosti? 6.2.2024. https://www.sav.sk/?lang=sk&doc=services-news&source_no=20&news_no=11725

Speicher DJ et al, DNA fragments detected in COVID-19 vaccines in Canada. 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. Preprint 2023, DOI: 10.31219/osf.io/mjc97

Stein SR, Ramelli SC, Grazioli A, Chung JY, Singh M, Yinda CK, Winkler CW, Sun J, Dickey JM, Ylaya K, Ko SH, Platt AP, Burbelo PD, Quezado M, Pittaluga S, Purcell M, Munster VJ, Belinky F, Ramos-Benitez MJ, Boritz EA, Lach IA, Herr DL, Rabin J, Saharia KK, Madathil RJ, Tabatabai A, Soherwardi S, McCurdy MT; NIH COVID-19 Autopsy Consortium; Peterson KE, Cohen JI, de Wit E, Vannella KM, Hewitt SM, Kleiner DE, Chertow DS. SARS-CoV-2 infection and persistence in the human body and brain at autopsy. *Nature*. 2022 Dec;612(7941):758-763. doi: 10.1038/s41586-022-05542-y.

Stowe J, Miller E, Andrews N, Whitaker HJ. Risk of myocarditis and pericarditis after a COVID-19 mRNA vaccine booster and after COVID-19 in those with and without prior SARS-CoV-2 infection: A self-controlled case series analysis in England. *PLoS Med*. 2023 Jun 7;20(6):e1004245. doi: 10.1371/journal.pmed.1004245.

Szemes T, Lukyová L, Styk J, Pös O. (2024). Vysokoparalelné technológie sekvenovania s krátkymi a dlhými čítaniami ako nástroje genomickej medicíny. *Lekárska genetika a genomika*, 2.

Takahashi A, Loo TM, Okada R, Kamachi F, Watanabe Y, Wakita M, Watanabe S, Kawamoto S, Miyata K, Barber GN, Ohtani N, Hara E. Downregulation of cytoplasmic DNases is implicated in cytoplasmic DNA accumulation and SASP in senescent cells. *Nat Commun*. 2018 Mar 28;9(1):1249. doi: 10.1038/s41467-018-03555-8.

Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol*. 2020 Jun;20(6):363-374. doi: 10.1038/s41577-020-0311-8.

Temin HM. Overview of biological effects of addition of DNA molecules to cells. *J Med Virol*. 1990 May;31(1):13-7. doi: 10.1002/jmv.1890310105. PMID: 2142957.

Tenchov, R., Bird, R., Curtze, A. E., Zhou, Q. (2021). Lipid nanoparticles—From liposomes to mRNA vaccine delivery: A landscape of research diversity and advancement. *ACS Nano*, 15(11), 16982–17015. doi.org/10.1021/acsnano.1c04996

Therapeutic Goods Administration (TGA), Australian Government, Department of Health and Aged Care. Summary report of residual DNA and endotoxin on COVID-19 mRNA vaccines conducted by TGA Laboratories. 07-11-2024. <https://www.tga.gov.au/resources/publication/tga-laboratory-testing-reports/summary-report-residual-dna-and-endotoxin-covid-19-mrna-vaccines-conducted-tga-laboratories>

Therapeutic Goods Administration (TGA), Australian Government, Department of Health and Aged Care. Batch release assessment of COVID-19 vaccines. Last updated 7 July, 2025.

<https://www.tga.gov.au/products/covid-19/covid-19-vaccines/batch-release-assessment-covid-19-vaccines>

Tran HNQ, Risk M, Nair GB, Zhao L. Risk benefit analysis to evaluate risk of thromboembolic events after mRNA COVID-19 vaccination and COVID-19. *NPJ Vaccines*. 2024 Sep 13;9(1):166. doi: 10.1038/s41541-024-00960-7.

Vaňová V, Náhlíková J, Ličková M, Sláviková M, Kajanová I, Lukáčiková Ľ, Sabo M, Rádiková Ž, Pastoreková S, Klempa B. Long-Term Dynamics of SARS-CoV-2 Variant-Specific Neutralizing Antibodies Following mRNA Vaccination and Infection. *Viruses*. 2025 May 6;17(5):675. doi: 10.3390/v17050675.

Vieths S, Waibler Z, Schumann GG. Opting for the appropriate methodology for quantification of residual DNA impurities in mRNA vaccines. *Vaccine*. 2025 May 22;56:127186. doi: 10.1016/j.vaccine.2025.127186.

Wallach T, Raden M, Hinkelmann L, Brehm M, Rabsch D, Weidling H, Krüger C, Kettenmann H, Backofen R, Lehnardt S. Distinct SARS-CoV-2 RNA fragments activate Toll-like receptors 7 and 8 and induce cytokine release from human macrophages and microglia. *Front Immunol*. 2023 Jan 13;13:1066456. doi: 10.3389/fimmu.2022.1066456.

Wang MM, Wappelhorst CN, Jensen EL, Chi YT, Rouse JC, Zou Q. Elucidation of lipid nanoparticle surface structure in mRNA vaccines. *Sci Rep*. 2023 Oct 5;13(1):16744. doi: 10.1038/s41598-023-43898-x.

Wang Y, Zhao Y, Bollas A, Wang Y, Au KF (2021). Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. *Nature Biotechnology*, 39, 1348–1365. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01108-x>

WHO (World Health Organization) Meeting Report Study group on cell substrates for production of biologicals. June 11 and 12, 2007; 1–30. https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/cell-substrates/cells.final.mtgrep.ik.26_sep_07.pdf?sfvrsn=3db7d37a_3&download=true

Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE (2017). Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Computational Biology*, 13(6), e1005595. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>

Wilson, B., Geetha, K. M. (2022). Lipid nanoparticles in the development of mRNA vaccines for COVID-19. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 74, 103553. doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103553

Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*. 1990 Mar 23;247(4949 Pt 1):1465-8. doi: 10.1126/science.1690918.

Worldometer, <https://www.worldometers.info/coronavirus/>

Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, Graham BS, McLellan JS. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*. 2020 Mar 13;367(6483):1260-1263. doi: 10.1126/science.abb2507.

Zhou G, Dael N, Verweij S, Balafas S, Mubarik S, Oude Rengerink K, Pasmooij AMG, van Baarle D, Mol PGM, de Bock GH, Hak E. Effectiveness of COVID-19 vaccines against SARS-CoV-2 infection and severe outcomes in adults: a systematic review and meta-analysis of European studies published up to 22 January 2024. *Eur Respir Rev*. 2025 Feb 19;34(175):240222. doi: 10.1183/16000617.0222-2024.

Zhou, Y., Xu, Y., Hou, X., Xia, D. (2025). Raman analysis of lipids in cells: Current applications and future prospects. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 15(4), 101136. doi.org/10.1016/j.jpha.2024.101136

6. ZOZNAM OBRÁZKOV A TABULIEK

Obr.	Názov	Strana
1.1	Modely povrchovej štruktúry a zloženia lipidových nanočastíc mRNA vakcín.	7
1.2	Schematické znázornenie procesu výroby mRNA vakcín.	8
1.3	Schematické znázornenie metód použitých na analýzu zvyškovej DNA a iných látok v mRNA vakcínach.	10
2.2.1	Schematické znázornenie DNA templátu použitého na produkciu mRNA pre vakcíny Comirnaty a Spikevax.	16
2.2.2	Kalibračné grafy a amplifikačné krivky generované s primermi pre SPIKE, ORI a KAN oblasti.	17 – 19
2.2.3	Porovnanie sekvencií primerov so sekvenciami korešpondujúcich cieľových oblastí v sekvenovaných šaržiach vakcín Comirnaty a Spikevax	20 – 21
2.2.4	Porovnanie výsledkov qPCR amplifikácie štandardnej DNA s primermi SPIKE 1 (A) a ORI 1 (B) na vylúčenie interferencie s mRNA, ktorá je prítomná vo vakcíne.	22
2.2.5	Amplifikačné krivky oblasti kódujúcej časť Spike proteínu všetkých šarží vakcín, výsledky s použitím primerov SPIKE 1. Grafické znázornenie výsledného počtu amplifikovaných molekúl a prepočet na množstvo plazmidovej DNA v ng/dávku.	24
2.2.6	Amplifikačné krivky oblasti ORI všetkých šarží vakcín, výsledky s použitím primerov ORI 1A. Grafické znázornenie výsledného počtu amplifikovaných molekúl a prepočet na množstvo plazmidovej DNA v ng/dávku.	25
2.2.7	Amplifikačné krivky oblasti ORI všetkých šarží vakcín, výsledky s použitím primerov ORI 1B. Grafické znázornenie výsledného počtu amplifikovaných molekúl a prepočet na množstvo plazmidovej DNA v ng/dávku.	26
2.2.8	Amplifikačné krivky oblasti KAN všetkých šarží vakcín Comirnaty, výsledky s použitím primerov KAN 1. Grafické znázornenie výsledného počtu amplifikovaných molekúl a prepočet na množstvo plazmidovej DNA v ng/dávku.	27
2.2.9	Amplifikačné krivky oblasti kódujúcej časť Spike proteínu všetkých šarží vakcín, výsledky s použitím primerov SPIKE 2. Grafické znázornenie výsledného počtu amplifikovaných molekúl a prepočet na množstvo plazmidovej DNA v ng/dávku.	28
2.2.10	Amplifikačné krivky oblasti ORI všetkých šarží vakcín, výsledky s použitím primerov ORI 2. Grafické znázornenie výsledného počtu amplifikovaných molekúl a prepočet na množstvo plazmidovej DNA v ng/dávku.	29
2.2.11	Súhrnný graf porovnávajúci výsledky všetkých simplexných qPCR v tejto analýze s výsledkom multiplexnej qPCR uvedenej v publikácii Fleming et al (2025).	30
2.3.1	Dôkaz nešpecifického signálu emitovaného prítomnosťou mRNA vo vzorke extrahovanej DNA.	36
2.3.2	Súhrn výsledkov DNA kvantifikácie vo všetkých analyzovaných šaržiach vakcín pomocou Qubit fluorometrie podľa metód izolácie.	36
2.3.3	Kvantifikácia množstva mRNA v dávke pre všetky analyzované šarže vakcín pomocou Qubit fluorometrie.	37
2.4.1	Kvantifikácia markerovej DNA metódou kapilárnej elektroforézy na zariadení FA5200.	41
2.4.2	Denzitogramy fragmentačnej analýzy externe pridanej DNA ku kontrolnej vzorke.	42
2.4.3	Porovnanie prípravy vzoriek analyzovaných na prítomnosť zvyškovej DNA pomocou kapilárnej elektroforézy.	43
2.4.4	Denzitogramy z kapilárnej elektroforézy zvyškovej DNA v jednotlivých šaržiach vakcín.	44-47
2.4.5	Analýza integrity mRNA vo vakcíne Comirnaty, šarža LK8456.	48
2.4.6	Porovnanie dvoch šarží vakcín Comirnaty s vyhovujúcou a nevyhovujúcou integritou mRNA.	48
2.4.7	Súhrnný graf znázorňujúci percentuálne vyjadrenie integrity mRNA vo všetkých analyzovaných šaržiach vakcín.	49
2.4.8	Fotografie ampuliek obsahujúcich analyzované šarže vakcín.	49
2.5.1	Zjednodušené schematické porovnanie troch generácií metód sekvenovania.	52
2.5.2	Dĺžkové profily jednotlivých knižníc pripravených použitím TruSeq DNA Nano kitu podľa upraveného protokolu.	57 – 58
2.5.3	Ukážka výstupu kontroly kvality pre čítania pomocou FastQC.	59
2.5.4	Ukážka dĺžkového profilu sekvenovaných fragmentov (Comirnaty šarža PCB0020).	61

2.5.5	Ukážka pokrytia referenčnej sekvencie plazmidu mapovanými čítaniami (Comirnaty šarža PCB0020.)	61
3.1	Porovnanie Ramanových spektier Comirnaty typu A s prislúchajúcim štandardom (sacharóza).	69
3.2	Porovnanie Ramanových spektier Comirnaty typu B s prislúchajúcimi štandardami (ALC-0159, cholesterol, DSPC).	70
3.3	Porovnanie Ramanových spektier Comirnaty typu C s prislúchajúcimi štandardami (ALC-0315, cholesterol, DSPC).	71
3.4	Porovnanie Ramanových spektier Spikevax typu A s prislúchajúcim štandardom (sacharóza).	72
3.5	Porovnanie Ramanových spektier Spikevax typu B s prislúchajúcimi štandardami (ALC-0159, cholesterol, DSPC).	73
3.6	Porovnanie Ramanových spektier Spikevax typu C s prislúchajúcimi štandardami (ALC-0315, cholesterol, DSPC).	74
3.7	Ramanove spektrá štandardov grafitu, grafén oxidu, redukovaného grafén oxidu.	77
3.8	Porovnanie Ramanových spektier štandardov grafitu, grafén oxidu, redukovaného grafén oxidu a priemerných Ramanových spektier vakcín Comirnaty a Spikevax.	78
4.1.1	Prevalencia SARS-CoV-2 variantov v priebehu pandémie COVID-19 (december 2019-december 2022)	80
4.1.2	Certifikát kvality vydaný v septembri 2021 Európskym centrom pre prevenciu a kontrolu chorôb na základe externého hodnotenia kvality molekulárnej diagnostiky variantov vírusu SARS-CoV-2 v Biomedicínskom centre SAV	80
4.1.3	Certifikát kvality vydaný v júli 2020 Európskym centrom pre prevenciu a kontrolu chorôb na základe externého hodnotenia molekulárnej diagnostiky vírusu SARS-CoV-2 metódou RT-PCR v Biomedicínskom centre SAV.	81
4.3.1	Globálny dosah vakcinácie na vybrané infekčné ochorenia (1980 – 2021).	85
4.5.1	Časová os vývoja mRNA technológie.	87
4.6.1	Vplyv vakcinácie proti ochoreniu COVID-19 na dennú úmrtnosť počas pandémie.	88
4.6.2	Odvratiteľná úmrtnosť na Slovensku počas pandémie COVID-19 a po nej (2020-2025) v porovnaní s obdobím pred pandemiou (2015-2019).	89

Tab.	Názov	Strana
1	Zoznam analyzovaných šarží vakcín	11
2	Zoznam primerov a prób použitých na qPCR analýzu	15
3	Koncentrácie zvyškovej DNA izolovanej z analyzovaných šarží vakcín.	54
4	Hodnoty a parametre z kontroly kvality finálnych sekvenačných knižníc.	58
5	Parametre čítaní sekvencií zvyškovej DNA v analyzovaných vakcínach	60

7. ZOZNAM SKRATIEK

ARDS	–	akútny respiračný distress syndróm
BHQ	–	Black Hole Quencher (značka pre PCR)
BMC	–	Biomedicínske centrum
bp	–	bázové páry molekuly DNA
cfDNA	–	DNA mimo buniek („cell-free DNA“)
CMV	–	cytomegalovírus
COVID	–	koronavírusová choroba („coronavirus disease“)
Cy5	–	Fluorescenčná farbička Cyanine 5
DAMP	–	vzory spojené s rozpoznávaním nebezpečenstva („danger-associated recognition patterns“)
DNA	–	deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	–	dvojvláknová DNA
EMA	–	Európska lieková agentúra („European Medicines Agency“)
FAM	–	značka na PCR
FDA	–	Úrad na kontrolu liečiv a potravín („Food and Drug Administration“)
GO	–	grafén oxid
HEX	–	derivát fluoresceínu – značka pre PCR
KAN	–	kanamycín
LM	–	dolný marker v kapilárnej elektroforéze
LNP	–	Lipidové nanočastice
mRNA	–	mediátorová ribonukleová kyselina
NCZI	–	Národné centrum zdravotníckych informácií
OCABR	–	oficiálna kontrolná autorita pre uvoľňovanie šarží ľudských biologík („Official Control Authority Batch Release for Human Biologicals“)
OECD	–	Organizácia pre ekonomickú spoluprácu a rozvoj
OMCL	–	oficiálne medicínske kontrolné laboratórium („Official Medicines Control Laboratory“)
ORI	–	počiatok replikácie plazmidu („origin of replication“)
PCI	–	fenol-chloroform-izoamylalkohol
qPCR	–	kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia („quantitative PCR“)
RNA	–	ribonukleová kyselina
RNáza	–	ribonukleáza (enzým, ktorý degraduje RNA)
RSV	–	Respiračný syncytiálny vírus
SARS	–	ťažký akútny respiračný syndróm („severe acute respiratory syndrome“)
SARS-CoV-2	–	Koronavírus typu 2 spôsobujúci SARS
SAV	–	Slovenská akadémia vied
SV40	–	opičí vírus 40 („Simian virus 40“)
TAMRA	–	rodamínová značka pre PCR
TGA	–	Austrálska autorita pre kontrolu liečiv („Therapeutic Goods Administration“)
TLR	–	Toll-like receptor
UM	–	Horný marker v kapilárnej elektroforéze
VAERS	–	Systém na hlásenie vedľajších účinkov vakcín („Vaccine Adverse Event Reporting System“)
WHO	–	Svetová zdravotnícka organizácia („World Health Organisation“)

Analýza bola uskutočnená a správa bola vypracovaná s finančnou podporou Vlády Slovenskej republiky a Slovenskej akadémie vied, v gescii Ministerstva zdravotníctva SR.

Odborný dohľad a koordinácia:

Prof. RNDr. Silvia Pastoreková, DrSc. (Biomedicínske centrum SAV, v. v. i.)

MVDr. Juraj Kopáček, DrSc. (Virologický ústav BMC SAV v. v. i.)

Mgr. Roman Dorčík (Štátny ústav pre kontrolu liečiv)

Vedecký tím:

Mgr. Adam Achs, PhD. (Virologický ústav BMC SAV, v. v. i.)

RNDr. Mária Bartošová, PhD. (Virologický ústav BMC SAV, v. v. i.)

Mgr. Jaroslav Budiš, PhD. (Vedecký park UK v Bratislave)

RNDr. Barbora Černáková, PhD. (Biotechnologické laboratóriá BMC SAV, v. v. i.)

Ing. Veronika Genčúrová (Biotechnologické laboratóriá BMC SAV, v. v. i.)

RNDr. Boris Klempa, DrSc. (Virologický ústav BMC SAV, v. v. i.)

Mgr. Martina Melicherčíková (Virologický ústav BMC SAV, v. v. i.)

RNDr. Marta Miklošová (Biotechnologické laboratóriá BMC SAV, v. v. i.)

Mgr. Lukáš Predajňa, PhD. (Virologický ústav BMC SAV, v. v. i.)

Mgr. Diana Rusňáková, PhD. (Vedecký park UK v Bratislave)

Mgr. Tatiana Sedlačková, PhD. (Vedecký park UK v Bratislave)

doc. RNDr. Tomáš Szemes, PhD. (Vedecký park UK v Bratislave)

RNDr. Vladimír Zelník, PhD. (Biotechnologické laboratóriá BMC SAV, v. v. i.)

Za Predsedníctvo Slovenskej akadémie vied:

MUDr. Mgr. Tomáš Hromádka, PhD., Podpredseda SAV pre vedu, výskum a inovácie

Bratislava, 30. 7. 2025

prof. RNDr. Silvia Pastoreková, DrSc.
generálna riaditeľka
Biomedicínske centrum SAV, v. v. i.

Mgr. Roman Dorčík
riaditeľ
Štátny ústav pre kontrolu liečiv