

  
CORVELVA

# Vaccinegate

Priorix Tetra

Raport z analizy metagenomicznej

Źródło i autor: <https://www.corvelva.it/it/speciali-corvelva/analisi/vaccinegate-metagenomic-analysis-report-on-priorix-tetra.html>

Tłumaczenie: Zespół tłumaczy STOP NOP

  
CORVELVA  
insieme dal 1993

  
stopnop

## Krótką prezentacja wyników

W lipcu 2018 r. opublikowane zostały analizy: „Szczepionka: 5 z 7 analizowanych szczepionek nie jest zgodnych” (<https://goo.gl/ANHozN> i <https://goo.gl/n6tQDn>), ale nie skończyliśmy. W skrócie podsumowując poprzednie analizy, mutacje w genomie wirusów i absurdalne ilości DNA to tylko niektóre z problemów, które wykryliśmy. Jak zawsze, ograniczyliśmy się do ujawnienia danych, bez spekulacji na temat rzeczywistych implikacji, każdy dokument został wysłany do EMA, AIFA, ISS i grup politycznych, aby poprosić o jasność.

Kontynuowaliśmy badania, zarówno chemiczne, jak i biologiczne, na Priorix Tetra, czterowalentnym przeciwko odrze, różyczce, śwince i ospie wietrznej. Rozszerzenie analiz chemicznych / białkowych jest dostępne tutaj: „Szczepionka: pierwsze wyniki dotyczące profilu składu chemicznego PriorixTetra”, w których potwierdzono obecność wielu sygnałów, śladów związków (zanieczyszczeń nie będących pozostałościami), które w przybliżeniu zostały dopasowane przez laboratoria. Mówimy o śladach, które prawdopodobnie były związane z wigabatryną przeciwpadaczkową, eksperymentalnym lekiem przeciw HIV, antybiotykami, herbicydami, akarycydami, metabolitami morfiny, słynnym Sildenafilem (Viagra), Gabapentyną przeciwpadaczkową i przeciwmalarycznym Atovaquone i innymi. Było oczywiste, że istniały znaczne różnice między dwiema analizowanymi partiami.

W celu uzupełnienia, donosimy również, że poprzednie ustalenia z badań biologicznych / metagenomicznych z lipca (pierwszy krok) wykazały, że analizowane próbki szczepionki „Priorix Tetra” przedstawiają zmutowaną populację wirusa dla każdego atenuowanego wirusa zwanego quasispecies. warianty antygenów szczepionkowych mogą znacząco zmienić zarówno bezpieczeństwo szczepionki, jak i jej skuteczność.

Dzisiaj publikujemy raport drugiej analizy biologicznej / metagenomicznej na Priorix Tetra; jak zobaczysz, wyniki stanowią poważny dylemat nie tylko medyczny i naukowy, ale także etyczny. Poniżej znajduje się lista punktów, które są dla nas najbardziej istotne:

Potwierdzono (jak ujawniono w poprzedniej fazie) obecność płodowego DNA w dużych ilościach, 1,7 µg w pierwszej partii i 3,7 µg w drugiej partii, około 325 razy więcej niż maksymalna granica 10 nanogramów i 325 000 razy wyższa niż minimalny limit 10 pikogramów, ograniczenia, które jak poinformowała Nas Ema odnoszą się tylko do komórek, które są znane ze swojej aktywności rakotwórczej. Zgodnie z tym, co napisali, komórki płodowe z lat 60, używane do produkcji tych szczepionek, nie byłyby rakotwórcze, ponieważ „używane przez dziesięciolecia”. Uważamy, że w tej kwestii potrzebne są dalsze badania, rzeczywiście istnieją badania, które poważnie kwestionują brak rakotwórczości tych linii.

Następnie dokładniej ustaliliśmy wymiary molekularne wykrytego DNA w porównaniu z poprzednimi analizami. Stwierdzono, że zawarty DNA ma masę cząsteczkową 20 000/60 000 pz. Oznacza to zasadniczo, że w tym leku nie ma fragmentów DNA, ale całe łańcuchy z całym genomem.

Potwierdziliśmy również, że nie ma obecności genomu wirusa różyczki w pierwszej partii i w drugiej partii; używając znacznie bardziej czułego wykrywania, znaleźliśmy go w 3 odczytach, równych 0,00008% wirusów całkowitego RNA.

*Uwaga: odczyty są kopiami wirusów. Na przykład wirusy w tej szczepionce stanowią około 5% całkowitego DNA, co odpowiada około 500 000 odczytów. Wirus odry około 850 odczytów wynosi 0,008%. Im bardziej schodzisz z odczytami i procentami, tym bardziej zmniejszają się ilości*

**Pamiętaj o tym, ponieważ jest to niezbędne.**

**Czy 3 odczyty, równe 0,00008% wirusów całkowitego RNA, tworzą immunizację? Jeśli tak, to bardzo poważny problem pojawia się po tym, co czytasz poniżej.**

W tej samej szczepionce wykryto również ślady w jeszcze większym, ale wciąż bardzo małym stopniu, licznych przypadkowych wirusów. Ale także coś innego.

**W szczepionce GlaxoSmithKline Priorix Tetra, Proteobacteria, robaki Platyhelminthes i Nematoda, 10 kolejnych wirusów ssRNA, Microviridae (wirusy bakteryjne lub fagi) i liczne retrowirusy, w tym endogenne ludzkie i ptasie retrowirusy, wirusy ptasie, ludzki wirus niedoboru odporności i wirus niedoboru odporności małp (fragmenty, które okazało się, że są to fragmenty HIV i SIV), wirus myszy, wirus niedokrwiistości zakaźnej koni, wirus choroby limfoproliferacyjnej, wirus mięsaka Rousa. Inne wirusy, takie jak alfaendornavirus i wirus zapalenia wątroby typu b, wirus drożdży.**

Powtarzamy, aby lepiej wyrazić tę koncepcję i błagamy was wszystkich, abyście bardzo ostrożnie korzystali z naszych wyników: w szczepionce Priorix Tetra nie wykryto obecności wirusa różyczki, z wyjątkiem jednej partii, ale ilość była tak mała, że budziła wątpliwości może uodpornić. Zamiast tego, jeśli weźmiemy pod uwagę, że ta szczepionka jest skuteczna przeciwko różyczce, ponieważ 3 odczytane kolejno do 0,00008% całkowitej Rny są wystarczające do określenia reakcji w organizmie, to dotyczy to również długiej serii wirusów nowotworowych, HIV, robaków i bakterie obecne w ilościach równych lub większych niż wirus różyczki.

Zasadniczo musieliśmy dogłębnie prześledzić wirus różyczki (w celu udowodnienia obecności), stosując metodę wysokiej czułości. Doprowadziło to nas na dziesiątki wirusów i retrowirusów, niektóre potencjalnie rakotwórcze, grzyby, drożdże, bakterie. Niezależnie od odpowiedzi na temat ilości, jest pewne, że nie powinno być żadnych; to znowu pokazuje, że nie ma odpowiedniej kontroli nad szczepionkami, w przeciwnym razie elementy te zostałyby wykryte.

Poniżej znajdują się wytyczne EMA, które stwierdzają, że „obcy” odczyt wirusa musi być NIEOBECNY, co oznacza, że nie jest dozwolona nawet pojedyncza jednostka.

- [https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/ich-q-5-r1-viral-safety-evaluation-biotechnology-products-derived-cell-lines-human-animal-origin\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/ich-q-5-r1-viral-safety-evaluation-biotechnology-products-derived-cell-lines-human-animal-origin_en.pdf)
- [https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guideline-virus-safety-evaluation-biotechnological-investigational-medicinalproducts\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guideline-virus-safety-evaluation-biotechnological-investigational-medicinalproducts_en.pdf)
- [https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/ich-q-6-b-test-procedures-acceptance-criteria-biotechnological/biological-pr oducts-step-5\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/ich-q-6-b-test-procedures-acceptance-criteria-biotechnological/biological-pr oducts-step-5_en.pdf)

# Raport z analizy metagenomicznej na Priorix Tetra

## Wprowadzenie

Jak wiadomo, szczepionki są lekami biologicznymi stosowanymi w celu zapobiegania niektórym chorobom zakaźnym. Składają się z kilku składników: antygenów (wirusy, bakterie inaktywowane lub atenuowane, toksyny inaktywowane, białka lub złożone cząsteczki pochodzące z wirusów i bakterii, zdolnych do stymulowania odpowiedzi immunologicznej), adiuwanty (substancje, które zwiększają zdolność antygenów szczepionkowych do wywoływania odpowiedzi immunologicznej przeciwciał), substancje pomocnicze (substancje potrzebne do sformułowania szczepionki lub w celu ochrony przed zanieczyszczeniem bakteryjnym) i zanieczyszczenia (ślady substancji pochodzących z surowców, np. linii komórkowych na rozwój bakterii i wirusów lub z procesu produkcyjnego, np. formaldehyd, antybiotyki). Podczas fazy rejestracji leku biologicznego szczepionka podlega kontroli przewidzianej w wytycznych EMA i uzgodnionej z odpowiednią instytucją zgodnie z konkretnym rodzajem szczepionki. Kontrole te są następnie przeprowadzane na reprezentatywnej liczbie próbek w każdej partii przed wprowadzeniem do obrotu.

*Odpowiedzialni za zgodność sprzedawanego produktu są zatem producent i agencje odpowiedzialne za kontrolę.*

Ponieważ bezpieczeństwo szczepionki zależy od jej zgodności z kryteriami jakości, zwłaszcza tymi dotyczącymi braku toksycznych lub potencjalnie toksycznych zanieczyszczeń (tj. Dla których nie są znane skutki u ludzi), bardzo ważne jest, aby taka zgodność była ściśle przestrzegana. Kilka badań w literaturze stawia kwestię obecności różnego rodzaju zanieczyszczeń, zarówno chemicznych, jak i mikrobiologicznych, otwierając w ten sposób pytanie, czy szczepionki rzeczywiście odpowiadają dyrektywom narzuconym przez organy regulacyjne, jeśli z kolei agencje regulacyjne zastosują kontrolę za przestrzeganie tych dyrektyw i jeśli agencje regulacyjne zdefiniowały przy pomocy skutecznych wytycznych kryteria kontroli i ograniczania takich zanieczyszczeń. Aby odpowiedzieć na te pytania, Corvelva zleciła analizę zanieczyszczeń biologicznych - które nigdy nie powinny być obecne w szczepionkach - w wysoko wykwalifikowanym centrum usług specjalizującym się w sekwencjonowaniu genomowym DNA i RNA.

Badanie przeprowadzone przez Corvelva oparte było o 2 typy analizy:

1. Testowanie obecności kwasów nukleinowych (DNA / RNA) pochodzenia ludzkiego i zwierzęcego oraz mikroorganizmów (wirusów, bakterii) przy użyciu metody sekwencjonowania następnej generacji, która umożliwiła ilościowe określenie w wysoce specyficznej i dokładnej sekwencji materiału genetycznego zawartego w szczepionkach badany
2. Weryfikacja zgodności sekwencji genomu żywych atenuowanych lub inaktywowanych bakterii i wirusów obecnych w szczepionkach (obecność wariantów genetycznych)

## Opis metody użytej do analizy

Seqwecjonowanie następnej generacji, znane również jako głębokie sekwencjonowanie, generuje pojedynczą sekwencję z każdego fragmentu DNA lub cDNA obecnego w próbce. Analiza bioinformatyczna downstream pozwala następnie na rozróżnienie między pochodzeniem fragmentów sekwencji, na przykład człowieka, gatunku bakterii lub konkretnego wirusa. Oznacza to, że mieszane próbki biologiczne można łatwo rozwiązać za pomocą tej technologii, która weszła obecnie w rutynę badań genomicznych i diagnostyki. Ponadto z danych NGS można zrekonstruować całą sekwencję wirusowych genomów DNA i RNA oraz genomów bakteryjnych obecnych w próbce i porównać je z genomami referencyjnymi obecnymi w publicznych bazach danych. Badane próbki przedstawiono poniżej wraz z uzyskanymi wynikami pogrupowanymi według klas podobnych szczepionek:

\*ssRNA: jednoniciowy RNA, jednoniciowy RNA; dsDNA: dwuniciowy DNA, dwuniciowy DNA. Podkreślone terminy składają się lub zawierają materiał genetyczny (DNA i / lub RNA)

## Analizowane próbki

Batch #1 - A71CB205A and Batch #2 - A71CB256A

**Nazwa produktu:** Priorix Tetra  
**Typ produktu:** Szczepionka czterowartościowa odra, świnka, różyczka, ospa wietrzna

**Producent:** GlaxoSmithKline, Belgia  
**Skład:**<sup>1</sup> żywe atenuowane wirusy: Odra (ssRNA) Szczep kwarcowy, hodowany w hodowlach komórek kurzych zarodków; Szczep świnki (ssRNA) RIT 4385, pochodzący ze szczepu Jeryl Linn, hodowany w hodowlach komórek kurzych zarodków; Szczep różyczki (ssRNA) Wistar RA 27/3, hodowany w ludzkich komórkach diploidalnych (MRC-5); Szczep OKA z Varicella (dsDNA), hodowany w ludzkich komórkach diploidalnych (MRC-5)

### Wymagana analiza

Sprawdzić obecność kwasów nukleinowych (DNA / RNA) pochodzenia ludzkiego i zwierzęcego oraz mikroorganizmów (wirusów, bakterii), stosując podejście metagenomiczne / metatranskryptyczne na platformie Illumina sekwencjonowania następnej generacji.

#### Z porównania trzech szczepionek można wyróżnić następujące kwestie krytyczne:

Priorix Tetra jest szczepionką o największej ilości zanieczyszczającego obcego DNA (całkowity DNA ekstrahowany od 3,7 µg do 1,7 µg, z czego 88% to ludzki, a następnie pochodzący z komórek MRC-5, a pozostałe 12% pochodzi z przypadkowych mikroorganizmów, takich jak wirusy, bakterie, robaki). Ludzki genomowy DNA ma wysoką masę cząsteczkową powyżej 60 000 pz, a całkowite sekwencyjne pokrycie całego ludzkiego genomu odniesienia (HG-19) pokazuje, że obecny jest cały genom komórek płodowych wykorzystywanych do hodowli wirusów krowianki, a nie tylko jego części .

Z odpowiedzi EMA na nasze pytanie<sup>2</sup> dotyczące ograniczeń nałożonych na pozostałości obcego materiału genetycznego w szczepionkach, wydaje się, że w rzeczywistości nie ma ograniczeń dla każdej szczepionki, ale tylko dla niektórych, zgłoszonych w monografiach produktu; maksymalny dozwolony limit waha się od 10 do 10 ng, w oparciu o teoretyczne obliczenie możliwości obcej genomowego DNA na wywołanie mutacji onkogennych.

Warto zauważyć, że organy regulacyjne nie wymagają testowania tych zanieczyszczeń w produkcie końcowym, ale tylko w początkowej fazie przygotowania, a dla atenuowanych szczepionek wirusowych oczyszczenie tych zanieczyszczeń jest krytycznym krokiem<sup>3</sup>. EMA nie dostarczyła konkretnych badań na temat zagrożeń związanych z reszkowym DNA płodu, które pozwalają ocenić ryzyko tych zanieczyszczeń dla zdrowia ludzkiego, więc ten limit pozostaje arbitralny dzisiaj.

*Wynika z tego, że dla tych dwóch partii Priorix Tetra jest to około 325 razy więcej niż maksymalny limit 10 ng i 325 000 razy wyższy niż minimalny limit 10 pg.*

---

<sup>1</sup>[https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer\\_000200\\_038200\\_RCP.pdf&retry=0&sys=m0b113](https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer_000200_038200_RCP.pdf&retry=0&sys=m0b113)

<sup>2</sup>Quesito EMA: <https://www.ivancatalano.eu/wp-content/uploads/2018/05/Letter.pdf>

<sup>3</sup>[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC500003322.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003322.pdf)  
[http://www.who.int/biologicals/Cell\\_Substrates\\_clean\\_version\\_18\\_April.pdf](http://www.who.int/biologicals/Cell_Substrates_clean_version_18_April.pdf)  
<http://www.who.int/biologicals/Molecular%20Methods%20Final%20Mtg%20Report%20April2005.pdf?ua=1>  
<https://pdfs.semanticscholar.org/presentation/0be5/9fbc9c69baa35c0f24086936bc541809ebc6.pdf>

W kwestii skażenia ludzkiego DNA Światowy Instytut Zdrowia w oficjalnym dokumencie z 2011 r. Zatytułowanym „Zalecenia dotyczące oceny hodowli komórek zwierzęcych jako substratu do wytwarzania produktów medycyny biologicznej i do charakteryzowania banków komórkowych” przekonuje, że co należy wziąć pod uwagę, w odniesieniu do rcDNA (resztkowe DNA komórkowe), w szczepionkach to:

- A. zmniejszenie ilości zanieczyszczającego DNA podczas procesu wytwarzania;
- B. zmniejszenie rozmiaru zanieczyszczającego DNA podczas procesu produkcyjnego;
- C. inaktywacja chemiczna aktywności biologicznej DNA wystąpiła podczas procesu wytwarzania

Biorąc pod uwagę trzy opisane powyżej wnioski, produkt jest uznawany przez ich organy regulacyjne (NRA) i laboratoria kontrolne (NCL) za produkty będący na dopuszczalnym poziomie ryzyka w odniesieniu do obecności DNA z substratu komórkowego, w oparciu o (a) i / lub (b) i / lub (c), gdy dane pokazują, że osiągnięto odpowiedni poziom bezpieczeństwa

W szczególności w 2 partiach szczepionki Priorix Tetra przetestowanej do tej pory, punkt A. nie występuje, ponieważ ilość jest około 140 razy wyższa niż zalecana przez FDA (w dokumencie podsumowującym 19 września 2012 r. : spotkanie komitetu doradczego ds. szczepionek i powiązanych produktów biologicznych) oraz EMA, tj.  $\leq 10$  ng na dawkę; punkt B. nie występuje, ponieważ DNA ma wysoką masę cząsteczkową (większość  $> 10\ 000$  pz, skan można łatwo zweryfikować za pomocą prostego żelu agarozowego w celu kontroli jakości DNA ekstrahowanego ze szczepionki), tj. 50 razy większy niż zalecany rozmiar przez FDA (200 pb lub mniej). Wreszcie, w tej samej szczepionce punkt C. nie występuje, ponieważ zawiera atenuowane wirusy, możliwa chemiczna inaktywacja DNA również dezaktywuje wirusy.

#### Porównanie dwóch próbek Priorix Tetra

Próbka #1 - A71CB205A	Próbka#2 - A71CB256A
Analiza DNA	Analiza DNA
Całkowity wyekstrahowany DNA: łącznie 1,7 $\mu$ g na dawkę 0,5 ml	Całkowity wyekstrahowany DNA: łącznie 3,7 $\mu$ g na dawkę 0,5 ml
Analiza sekwencjonowania DNA przeprowadzona przy użyciu metody metagenomicznej, z całkowitej liczby wyprodukowanych sekwencji 3.830.074	Analiza sekwencjonowania DNA przeprowadzona przy użyciu metody metagenomicznej, z całkowitej liczby wyprodukowanych sekwencji 5.836.297
Obecność genomowego DNA	Obecność genomowego DNA
aricella 14% Kurczak 4% Ludzki (MRC-5) 74% proteobakterii 1% wirus RNA 0,01% nie przypisany 5%	Varicella 14% Human (MRC-5) 88% (około 3,3 $\mu$ g, co odpowiada około 300 000 komórek płodowych) Wirus RNA 0,0003% nie przypisany 0,5%
<b>Analiza RNA</b>	<b>Analiza RNA</b>
Wyekstrahowany całkowity RNA: niewymierny za pomocą standardowych metod fluorymetrycznych	Całkowity wyekstrahowany RNA: 200 ng na dawkę 0,5 ml
Analiza seq RNA przeprowadzona przy użyciu metatranskryptycznego podejścia z całkowitej liczby 10.445.038 wytworzonych sekwencji.	Analiza seq RNA przeprowadzona przy użyciu metatranskryptycznego podejścia, z łącznej liczby wyprodukowanych 6.171.266 sekwencji.
Odra 0,004% Świnka 0,008% Różyczka 0,00007% Varicella 5% inne wirusy około 0,002%	Odra 0,004% Świnka 0,008% Różyczka nd% * Varicella 7%

robaki 0,6% Kurczak 0,2% Ludzie 87% nie przypisane 5%	inne wirusy około 0,001% nicienie 1,50% Proteobakterie 5,5% Ludzie 68% nie przypisane 6%  *sekwencjonowanie przy 260.343.42 odczytach: 114 odczytów równych 0.00004%
--	---

## Metody i wyniki

### Ekstrakcja DNA i RNA Partia Priorix Tetra A71CB205A

Partia A71CB205A została poddana obróbce w czerwcu 2018 r.

Ekstrakcję genomowego DNA przeprowadzono za pomocą zestawu Maxwell® 16 Blood DNA Purification Kit sprzedawanego przez Promega oraz za pomocą automatycznego ekstraktora Maxwell® 16IVD (Promega), zgodnie z zaleceniami producenta. Ekstrakcję RNA przeprowadzono za pomocą zestawu PureLink™ Viral RNA / DNA Kit Mini Kit (Invitrogen) zgodnie z protokołem producenta. Wyjściowa ilość użyta do ekstrakcji jest następująca (począwszy od pojedynczej fiołki produktu):

- DNA do ekstrakcji: 125 µl 500 µl zawiesiny do wstrzykiwań
- RNA do ekstrakcji: 125 µl 500 µl zawiesiny do wstrzykiwań

Oznaczenie ilościowe i kontrola jakości wyekstrahowanego DNA przeprowadzono za pomocą fluorometru Qubit 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA) oraz jednocześnie za pomocą spektrofotometru NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Poniżej przedstawiono ilościowe oznaczenia DNA (NanoDrop ND = 1000; QB = 2,0 Qubit; HS = dsDNA HS Assay Kit)

Sample ID	ND A260/280	ND A260/230	QB_HS_ng/µL	volume_µl	Tot_amount_ng
DNA lotA71CB205A	1.54	1.31	9.41	45	423.45
RNA lotA71CB205A*	n.d.	n.d.	Out of range	50	0

\*Quantità di RNA sotto il limite di quantificazione del fluorimetro QBit.

Pomiar stężenia DNA za pomocą fluorometru QuBit wykazał, że **partia A71CB205A** zawiera ilość **gDNA wynoszącą 1,7 µg na dawkę 0,5 ml**, obliczoną w następujący sposób: 9,41 ng / µl (stężenie określone przez QuBit) x 45 (końcowa objętość zawiesiny DNA po ekstrakcji, wyrażonej w mikrolitrach) x4 (początkowe objętości dopuszczone do procedury ekstrakcji, która stanowi 1/4 objętości dawki zawartej w całej fiołce równej 0,5 ml).

DNA e ekstrakcja RNA Seria Priorix Tetra A71CB256A

Partia A71CB206A została poddana obróbce w grudniu 2018 r. Dokonano pewnych usprawnień w procedurze, takich jak:

1. Zastosowanie większej objętości roztworu do wstrzykiwania początkowego w celu zwiększenia ilości ekstrahowanego RNA (w ekstrakcji z poprzedniej partii ilość uzyskanego RNA była poniżej progu detekcji z fluorymetrem);
2. Przeprowadziliśmy elektroforezę w polu pulsacyjnym, aby uzyskać więcej szczegółów na temat wielkości całego genomowego DNA obecnego w próbce;
3. Zastosowaliśmy najbardziej czuły tryb pomiaru dla RNA (Agilent RNA 6000 Pico Kit na Bioanalyzer Agilent).

Ekstrakcję DNA przeprowadzono za pomocą Maxwell® 16 Blood DNA Purification Kit odsprzedanego przez firmę Promega i za pomocą automatycznej ekstrakcji (Maxwell® 16 IVD– (Promega) zgodnie z protokołem producenta. Ekstrakcję RNA przeprowadzono PureLink™ Viral RNA / DNA Mini Kit (Invitrogen) zgodnie z protokołem producenta Ilość początkowa użyta do ekstrakcji jest następująca, począwszy od dwóch fiołek produktu z tej samej partii:



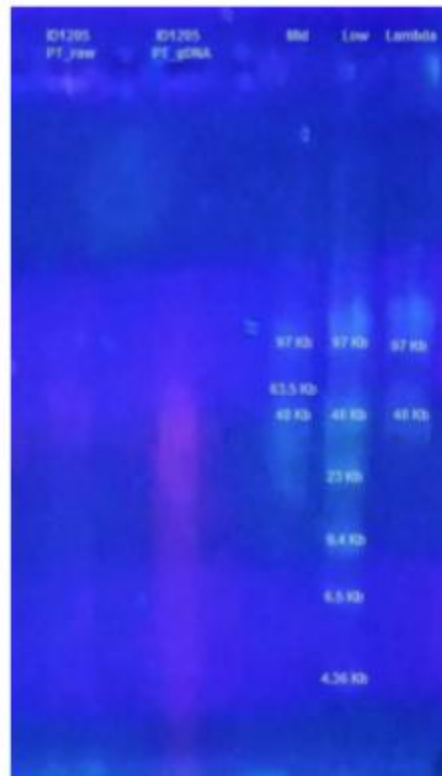
- Ekstrakcja DNA: 300  $\mu$ l 500  $\mu$ l zawiesiny do wstrzykiwań (fiolka 1)
- Ekstrakcja RNA: cała objętość proszku z fiolki została ponownie zawieszona w 200  $\mu$ l zamiast 500  $\mu$ l fizjologicznego roztworu soli dostarczonego w opakowaniu, a cała objętość wynosiła używany do ekstrakcji RNA (fiolka 2).

Ocenę ilościową i kontrolę jakości ekstrahowanego DNA przeprowadzono za pomocą fluorometru Qubit 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA) i odpowiednio spektrofotometru NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Poniżej przedstawiono ilościowe oznaczenia DNA (NanoDrop ND = 1000; QB = 2,0 Qubit; HS = dsDNA HS Assay Kit)

Sample ID	ND A260/280	ND A260/230	QB_HS_ng/ $\mu$ L	volume_ $\mu$ l	Tot_amount_ng
DNA lotA71CB256A	1.95	2.12	40.8	55	2224

Pomiar stężenia DNA za pomocą fluorometru QuBit wykazał, że **partia A71CB256A** zawiera ilość **gDNA wynoszącą 3,7 całkowitej na dawkę 0,5 ml**, obliczoną w następujący sposób:

40,8 ng /  $\mu$ l (stężenie określone przez QuBit) x 55 (końcowa objętość zawiesiny DNA po ekstrakcji wyrażone w mikrolitrach) x 5 / 3 (początkowa objętość poddana procedurze ekstrakcji, czyli 300  $\mu$ l 500  $\mu$ l zawiesiny). Wyekstrahowane DNA za pomocą elektroforezy w polu pulsacyjnym (PFGE, 5-80Kb, runtime 14h in TBE 0,5x, 80V) z partii A71CB256A, było widoczne dzięki fluorescencyjnej międzywarstwie SybrGreen, która wykazała obecność paska gidowego GenomicDNA, który osiąga bardzo wysokie masy cząsteczkowe, ale ze znaczną zawartością DNA w zakresie 20-60Kbp. W szczególności na zdjęciu poniżej, ID1205\_PT\_rawa próbka jest szczepionką zawierającą lizat materiału przed oczyszczeniem DNA, podczas gdy PT\_gDNA jest genomowym DNA po ekstrakcji; Średnie, niskie i lambda są 3 handlowymi markerami masy cząsteczkowej.

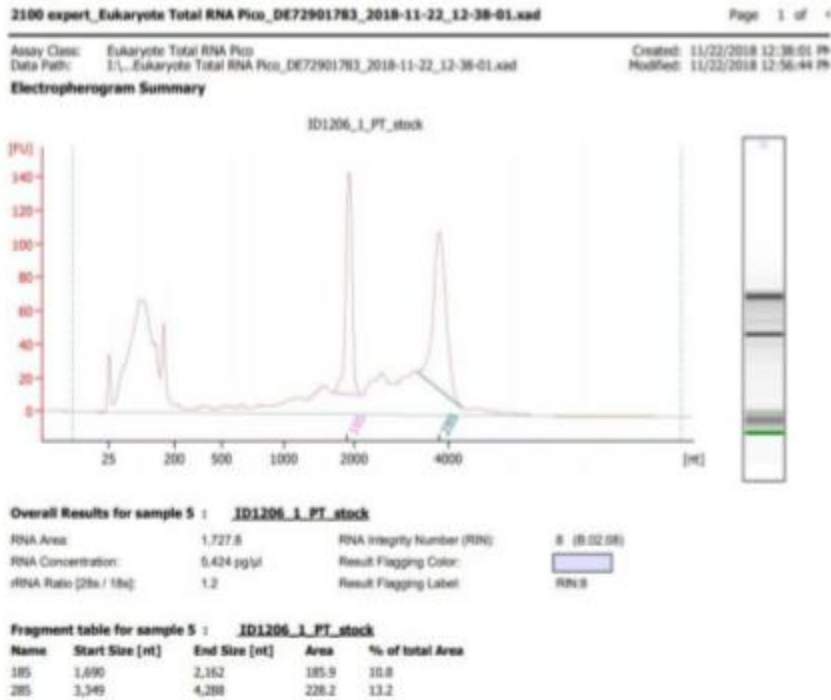


Ocenę ilościową i kontrolę jakości ekstrahowanego RNA przeprowadzono za pomocą Agilent 2100 Bioanalyzer przy użyciu Agilent RNA 6000 PicoKit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Poniżej znajdują się wartości stężenia, RNA (numer integralności) zmierzony w Bionalyzer:



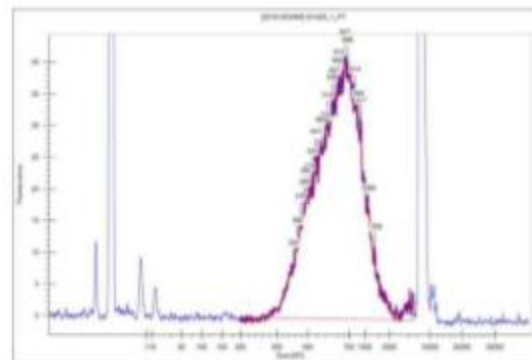
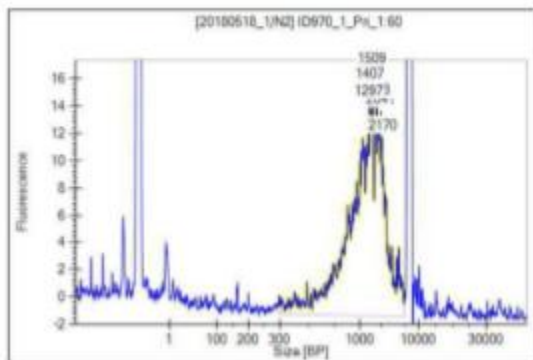
Sample ID	Bioanalyzer_pico_totale_ng/μL	RIN	volume_ul	Tot_amount_ng
RNA lotA71CB256A	5	8	37	200.688

Stwierdzono, że ilość RNA zawarta w **partii fiołki ze szczepionką A71CB256A wynosi około 200 ng**. RIN równy 8 wskazuje na doskonałej jakości RNA i nienaruszony eukariotyczny RNA, będąc jednocześnie pikami 18S i 28S typowymi dla eukariotycznego RNA:



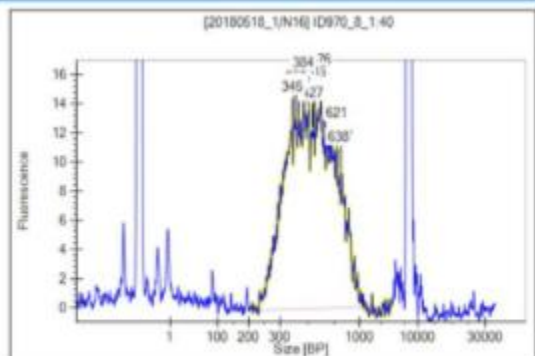
Przygotowanie biblioteki DNA-seq z technologią Illumina

Zestaw Ovation® Ultralow System V4 1–96 (Nugen, San Carlos, CA) został wykorzystany do przygotowania bibliotek zgodnie z instrukcjami producenta, począwszy od 10 ng genomowego DNA. Końcowe biblioteki oznaczono ilościowo za pomocą fluorymetru Qubit 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA) i testowano jakość za pomocą systemu Caliper GX (PerkinElmer, Waltham, MA) dla partii A71CB205A i Agilent 2100 Bioanalyzer, zestaw do analizy DNA o wysokiej czułości (Agilent technologies, Santa Clara, CA) dla partii A71CB256A. Poniżej znajdują się śledzenie dwóch uzyskanych bibliotek:

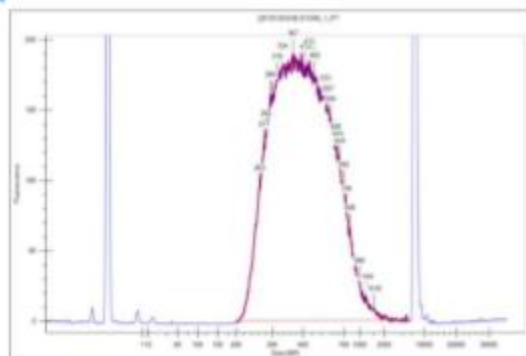


### Przygotowanie biblioteki RNA-seq z zestawem technologicznym Illumina

Ovation® ma przetłoczone sekwencje RNA i sekwencje RNA-SeqSystem V2 (Nugen, San Carlos, CA) w celu przygotowania cDNA i zestawu Ovation® Ultralow System V4 1–96 w celu przygotowania biblioteki od 10ngcDNA. Finallibraries fluorometr Qubit 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA) i test jakości przez system Caliper GX (PerkinElmer, Waltham, MA) dla partii A71CB205A i Agilent 2100 Bioanalyzer, zestaw do analizy DNA o wysokiej czułości (Agilent technologies, Santa Clara, CA) dla partii A71CB256A . Poniżej znajdują się wykresy dwóch uzyskanych bibliotek:

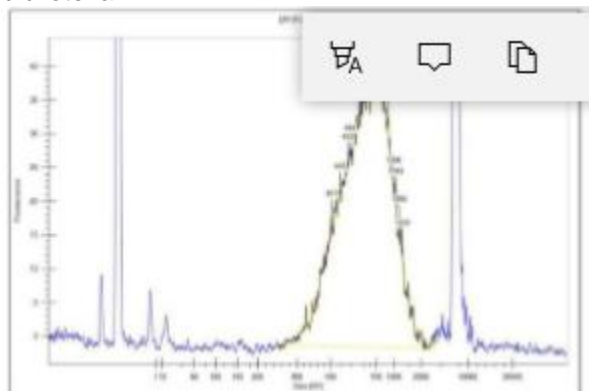


**Lotto A71CB205A, libreria RNA-seq diluita 1:40  
corsa Caliper GX**



**Lotto A71CB256A, libreria RNA-seq  
corsa Bionalyzer**

W celu walidacji procesu przygotowania biblioteki do analizy danych, Standard ATCC (mieszanka genomowego DNA o znanym składzie, 20 Strain Staggered Mix GenomicMaterial, ATCC®MSA-1003TM) zatwierdziła zestaw kalibracyjny z zestawem Ovation® Ultralow System V4 1–96 od 10ngDNA. uzyskana biblioteka:



### Sekwencjonowanie

Biblioteki zostały zsekwencjonowane na instrumencie Illumina HiSeq2500 w trybie „sparowanego końca 125 bp”, zgodnie ze standardowymi instrukcjami Illuminy. Pipeline Illumina CASAVA w wersji 1.8.2 została użyta do przetwarzania surowych sekwencji.

### Analiza bioinformatyczna

#### Przycinanie sekwencji

Seqwencje adapterów (mianowicie „sztuczne” sekwencje oligonukleotydów, które są wprowadzane podczas przygotowania biblioteki iluminacyjnej) i zasad DNA o niskiej jakości odczytu zostały usunięte za pomocą oprogramowania **ERNE1** i **Cutadapt2**.

#### Identyfikacja sekwencji DNA i cDNA Pierwotne organizmy

Analizę metagenomiczną przeprowadzono za pomocą oprogramowania Kraken3 w bazie danych „Human-Virus-Bacteria\_25mer”(https://ccb.jhu.edu/software/kraken/).

Kraken jest klasyfikatorem, który przypisuje tagi taksonomiczne do odczytów krótkiego DNA. Testuje k-mery wewnątrz odczytu i odpytuje bazę danych, która zawiera te k-mery.

odniesienia Bibliograficzne:

1. Del Fabbro, C et al. 2013 An extensive evaluation of read trimming effects on Illumina NGS data analysis. Del Fabbro C, Scalabrin S, Morgante M, Giorgi FM. PLoS One. 2013 Dec 23;8(12):e85024. doi: 10.1371/journal.pone.0085024. eCollection 2013
2. Martin, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. EMBnet journal, [S.l.], 17 (1): 10-12 (2011). ISSN 2226-6089. Date accessed: 02 Apr. 2015. doi:http://dx.doi.org/10.14806/ej.17.1.200 paper
3. Wood and Salzberg. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments Genome Biology 2014, 15:R46

### Wyniki analizy DNA-seq i RNA-seq przeprowadzone na dwóch partiach za pomocą oprogramowania Kraken

Obecność DNA i RNA jest wyrażona jako liczba odczytów i procent odczytów w stosunku do sumy wszystkich uzyskanych odczytów, przypisanych przez publiczne bazy danych różnym organizmom.

#### Analiza DNA Próbkę #1 A71CB205A (Czerwiec 2018)

Całkowita liczba odczytów Sekwencjonowanego DNA Seq 3.830.074

Klasyfikacja		Liczba odczytów	% odczytów
Człowiek		2,853,788	74%
Wirusy		538,112	14%
Aves (Gallus gallus)		152,256	4%
Proteobakteria (Bradyrhizobium) <sup>4</sup>		43,2684	1%
Nieprzypisane		193,248	5%

*Klasyfikacja wirusów		Liczba odczytów	% odczytów
■ Wirusy dsDNA		538,112 3	14%
	Ludzki wirus alfa herpes	537,849	14%
■ wirusy ssRNA		34	0,01%
	Świnka rubulavirus	19	0.0005%
	Odra morbillivirus	12	0.0003%
	Wirus Różyczki	3	0.00008%
■ Microviridae <sup>5</sup>		131	0.003%
■ Retroviridae		26	0.0007%
	Ptasi endogenny retrowirus EAV- HP	7	0.0002%
	Wirus ptasiej erythroblastozy	1	0.00003%
	Wirus ptasiej białaczki	5	0.0001%
	Ludzki retrowirus endogenny HERV-K(II)	1	0.00003%

<sup>4</sup><https://it.wikipedia.org/wiki/Proteobacteria>

<sup>5</sup><https://en.wikipedia.org/wiki/Microviridae>

	Ludzki retrowirus endogeny K	6	0.0002%
	Ludzki retrowirus endogeny	3	0.00008%
■ niesklasyfikowane wirusy bakteryjne i środowiskowe		4	0,0001%

#### Analiza RNA próbka #1 A71CB205A

Całkowita liczba odczytów sekwencji DNA 10.445.038

Klasyfikacja		Liczba odczytów n <sup>o</sup>	% odczytów
■ Homininae (Człowiek)		9,036,993	87%
■ Wirusy		499,098	5%
■ Platyhelminthes (Spirometraerinaceieuropaei)		57,805	0,6%
■ Aves (Gallus gallus)		16,361	0,2%
■ Nieprzypisane		45,660	5%

Klasyfikacja wirusów		Liczba odczytów n <sup>o</sup>	% odczytów
■ wirusy dsDNA		497,498	5%
	Ludzki wirus alfaherpes	497,465	5%
■ wirusy ssRNA		1.324	0,01%
	Rubulavirus świnki	874	0,008%
	Morbiliwirus odry	441	0,004%
	Wirus różyczki	7	0,00007%
■ Microviridae		247	0.002%
■ Retroviridae		23	0,0002%
	HERV-H / env60	9	0,0002%
	HERV-H / env62	2	0,00003%
	Ludzki endogeny retrowirus K	6	0,0001%
	Ludzki retrowirus endogeny	2	0,00003%
	Ludzki wirus niedoboru odporności 1	3	0,0002%
	Alpharetrovirus (wirusy ptasie)	1	0,00008%
■		5	0,0001%

<b>niesklasyfikowane wirusy bakteryjne i środowiskowe</b>			
■ <b>wirus zapalenia wątroby typu B</b>		<b>1</b>	<b>0,00001%</b>

#### Analiza DNA Próbkę #2 A71CB256A

Całkowita liczba odczytów sekwencji DNA 5.836.297

<b>Klasyfikacja</b>		<b>Liczba odczytów n<sup>0</sup></b>	<b>% odczytów</b>
■ Homininae (Człowiek)		5,150,674	88%
■ Wirusy		643,575	11%
■ Nieprzypisane		29,634	0,5%

<b>Klasyfikacja wirusów</b>		<b>Liczba odczytów n<sup>0</sup></b>	<b>% odczytów</b>
■ <b>wirusy dsDNA</b>		<b>643,549</b>	<b>11%</b>
	Human alphaherpesvirus 3	643,542	11%
■ <b>Retroviridae</b>		<b>19</b>	<b>0.0003%</b>
	Avian endogenous retrovirus EAV-HP	13	0.0002%
	Mus musculus mobilized endogenous polytropic provirus	2	0.00003%
	Murine type C retrovirus	1	0.00002%
	Alpharetrovirus	1	0.00002%
■ <b>Bullavirinae</b>		<b>5</b>	<b>0.00009%</b>
■ <b>Saccharomyces 20S RNA narnavirus</b>		<b>1</b>	<b>0.00002%</b>
■ <b>Saccharomyces cerevisiae virus L-BC (La)</b>		<b>1</b>	<b>0.00002%</b>

#### Analiza RNA Próbkę #2 A71CB256A

Całkowita liczba odczytów sekwencji DNA 6.171.266

<b>Klasyfikacja</b>		<b>Liczba odczytów</b>	<b>% odczytów</b>
■ Homininae (Człowiek)		4,210,032	68%
■ Proteobakteria		336,053	5.5%
■ Nematoda (Elaeophora elaphi)		92,290	1.5%
■ Wirusy		419,863	7%
■ Nie przypisane		389,837	6%

<b>*Klasyfikacja wirusów</b>		<b>Liczba odczytów</b>	<b>% odczytów</b>
■ Wirusy dsDNA		<b>418,104</b>	<b>7%</b>
	Ludzki wirus alfa herpes 3	417,868	7%

■wirusy ssRNA			<b>0,01%</b>
	Świnkarubulavirus	508	0,008%
	Odra morbillivirus	217	0,004%
	Wirus Różyczki		
	Wirus grypy A	9	0.0001%
	Cupiximammarenavirus	30	0.0005%
	Pneumoviridae	6	0.0001%
	Wirus Jamestown Canyon	12	0.0002%
	Hepacivirus C	30	0.0005%
	Kobuvirus	20	0.0003%
	Enterovirus	2	0.00003%
	Wirus zespołu rozrodzco-oddechowego świń	3	0.00005%
	Coronavirinae	5	0.00008%
	Potyvirus	3	0.00005 %
■Retroviridae		<b>99</b>	<b>0.002%</b>
	Ludzki wirus niedoboru odporności 1	36	0,0006%
	Ludzki endogenny retrowirus K	16	0,0003%
	Małpi wirus niedoboru odporności	1	0,00002%
	Wirus zakaźnej niedokrwistości koni	1	0,00002%
	Wirus choroby limfoproliferacyjnej	25	0,0004%
	Wirus ptasiej białaczki	1	0,00002%
	Wirus mięsaka Rousa	1	0,00002%
	HERV- H / env62	2	0,00003%
	Wirus koniczyny czerwonej	2	0,00003%
■niesklasyfikowane wirusy bakteryjne i środowiskowe		<b>88</b>	<b>0,001%</b>
■wirusy dsRNA		<b>14</b>	<b>0,0002%</b>
■wirus zapalenia wątroby typ B		<b>2</b>	<b>0,00003%</b>
■niesklasyfikowane wirusy RNA ShiM-2016		<b>9</b>	<b>0,0002%</b>
■Mollivirus sibericum		1	0,0002%


\*Biblioteka sekwencji RNA sekwencjonowano na bardzo dużej głębokości (260.434.942 wytworzonych odczytów Illumina), tylko w celu podkreślenia obecności wirusa różyczki. Znalaziono 114 odczytów związanych z genomem różyczki, co odpowiada procentowi odczytów równym 0,00004%.

Wyniki analizy DNA-seq przeprowadzonej za pomocą oprogramowania Kraken na genomowym standardzie o znanym składzie (20 Stomijnie zmieszany materiał genomowy, ATCC® MSA-1003TM)

#### Całkowita liczba odczytów DNA 4.969.245

Klasyfikacja	Liczba odczytów	% odczytów	%zdeklarowany przez ATCC
▪ Acinetobacter baumannii	10,735	0.2%	0.18%
▪ Actinomyces odontolyticus	2	0.00004%	0.18%
▪ Bacillus cereus	176,327	3.5%	18%
▪ Bacteroides vulgatus	1,088	0.02%	0.02%
▪ Bifidobacterium adolescentis	489	0.01%	0.02%
▪ Clostridium beijerinckii	123,609	2.5%	1.8%
▪ Cutibacterium acnes	6,528	0.13%	0.18%
▪ Deinococcus radiodurans	745	0.02%	0.02%
▪ Enterococcus faecalis	704	0.01%	0.02%
▪ Escherichia coli	929,837	19%	18%
▪ Helicobacter pylori	4,738	0.1%	0.18%
▪ Lactobacillus gasseri	4,491	0.1%	0.18%
▪ Neisseria meningitidis	9,820	0.19%	0.18%
▪ Porphyromonas gingivalis	578,294	12%	18%
▪ Pseudomonas aeruginosa	152,307	3%	1.8%
▪ Rhodobacter sphaeroides	1,135,927	23%	18%
▪ Staphylococcus aureus	72,598	1.5%	1.8%
▪ Staphylococcus epidermidis	634,940	13%	18%
▪ Streptococcus agalactiae	31,622	0.6%	1.8%
▪ Streptococcus mutans	526,420	11%	18%
▪ Unassigned	14,248	0.3%	0%



## Na podstawie porównania tych dwóch szczepionek można podkreślić następujące krytyczne kwestie:

Priorix Tetra to szczepionka z dużą ilością obcego DNA zanieczyszczającego, z których średnio 80% stanowi człowiek, a zatem pochodzi z komórek MRC-5; w próbce nr 1 znajduje się również 4% DNA pochodzącego z zarodkowych komórek kurzych; pozostałe 20% należy do wirusów (retrowirusów, wirusów zakaźnych i rakotwórczych, fagów) i przypadkowych mikroorganizmów, takich jak bakterie i robaki; w szczepionce Priorix Tetra ludzki genomowy DNA ma wysoką masę cząsteczkową (> 10 000 pz) i całkowite pokrycie sekwencyjne całego referencyjnego ludzkiego genomu (HG-19).

Z odpowiedzi EMA na nasze pytanie<sup>6</sup> dotyczące ograniczeń nałożonych na pozostałości obcego materiału genetycznego w szczepionkach, wydaje się, że w rzeczywistości nie ma ograniczeń dla każdej szczepionki, ale tylko dla niektórych, zgłoszonych w monografiach produktu; **maksymalny przewidywany limit mieści się w zakresie od 10 pg<sup>7</sup> do 10 ng**, w oparciu o teoretyczne obliczenie możliwości wywołania mutacji onkogennych przez obce genomowe DNA. Warto zauważyć, że organy regulacyjne nie wymagają, aby te zanieczyszczenia były testowane w produkcie końcowym, ale tylko w początkowej fazie przygotowania, a dla atenuowanych szczepionek wirusowych oczyszczenie tych zanieczyszczeń jest krytycznym krokiem. EMA nie dostarczyła konkretnych badań na temat zagrożeń związanych z resztkowym DNA płodu, które pozwalają ocenić ryzyko tych zanieczyszczeń dla zdrowia ludzkiego, więc ten limit pozostaje arbitralny dzisiaj.

*W próbce nr 2 Priorix Tetra DNA płodu jest około 325 razy większe niż maksymalny limit 10 ng i 325 000 razy większy niż minimalny limit 10 pg.*

W kwestii skażenia ludzkiego DNA Światowy Instytut Zdrowia w oficjalnym dokumencie z 2011 r. zatytułowanym „Zalecenia dotyczące oceny kultur komórek zwierzęcych jako substratów do wytwarzania biologicznych produktów leczniczych i do charakterystyki banków komórkowych” twierdzi, że to, co należy wziąć pod uwagę w odniesieniu do rDNA (resztkowe DNA komórek) w szczepionkach to:

- A. zmniejszenie ilości zanieczyszczającego DNA podczas procesu wytwarzania;
- B. zmniejszenie rozmiaru zanieczyszczającego DNA podczas procesu wytwarzania;
- C. chemiczna inaktywacja aktywności biologicznej DNA wystąpiła podczas procesu wytwarzania.

Biorąc pod uwagę trzy powyższe żądania, produkt jest uznawany przez organy regulacyjne (NRA) i laboratoria kontrolne (NLC) za będący na dopuszczalnym poziomie ryzyka w odniesieniu do obecności DNA z substratu komórkowego, w oparciu o (a) i / lub (b) i / lub (c), gdy dane pokazują, że osiągnięto odpowiedni poziom bezpieczeństwa.

W szczególności w partiach szczepionki Priorix Tetra przetestowanej do tej pory, punkt A. nie występuje, ponieważ ilość jest około 140 razy wyższa niż zalecana przez FDA (w dokumencie informacyjnym 19 września 2012 r. : spotkanie komitetu doradczego ds. szczepionek i powiązanych produktów biologicznych oraz EMA, tj.  $\leq 10$  ng na dawkę; punkt B) nie występuje ponieważ DNA ma wysoką masę cząsteczkową (większość > 10 000 pz, skan można łatwo zweryfikować za pomocą prostego żelu agarozowego w celu kontroli jakości DNA ekstrahowanego ze szczepionki), tj. 50 razy większy niż rozmiar zalecany przez FDA (200 pz lub mniej). Wreszcie, w tej samej szczepionce, punkt C) nie występuje, ponieważ, ponieważ zawiera atenuowane wirusy, możliwa chemiczna inaktywacja DNA również dezaktywuje wirusy.

## Analiza genetycznych wariantów

<sup>6</sup>QuesitoEMA: <https://www.ivancatalano.eu/wp-content/uploads/2018/05/Letter.pdf>

<sup>7</sup>10pg è la quantità indicativa di DNA contenuta in una cellula; ciò significa che nel vaccino è contenuta una quantità di DNA proveniente da ben 325.000 cellule fetali

Dzięki technologii sekwencjonowania następnej generacji możliwe jest odtworzenie całej sekwencji wirusowych genomów DNA i RNA oraz genomów bakteryjnych obecnych w próbce i porównanie go z genomami referencyjnymi obecnymi w publicznych bazach danych. Dlatego technologia może również umożliwić monitorowanie w czasie, jak i czy sekwencja genomu wirusowego lub bakteryjnego zmienia się podczas procedury produkcji szczepionki.

Wynik wywołania wariantu (pojedynczy nukleotyd i małe insercje / delecje) w porównaniu ze szczepami referencyjnymi dostępnymi w publicznych bazach danych (NCBI, National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> ) wykonane na próbkach zawierających żywe atenuowane wirusy lub bakterie dały następujące wyniki:

### **Próbka 1 – Priorix Tetra**

1. Genom wirusa odry zawarty w szczepionce jest identyczny z sekwencją szczepu Edmonston Swartz zdeponowaną w bazach danych o numerze dostępu AF 266291.1.
2. Liczba wykrytych wariantów była w rzeczywistości równa 0;
3. Genom wirusa świnki zawarty w szczepionce wykazał pojedynczą mutację w porównaniu ze szczepem wirusowym Jeryl-Lynn obecnym w publicznych bazach danych o numerze dostępu AF 338106,1;
4. Nie wykryto genomu wirusa różyczki;
5. Genom wirusa ospy wietrznej zawarty w szczepionce wykazał cztery mutacje w porównaniu z ludzkim herpeswirusem obecnym w publicznych bazach danych o numerze dostępu AB097932.1;

Sekwencja antygenów wirusowych / genomów jest ściśle poufnymi danymi, które nie są dostarczane przez EMA. Nie ma wytycznych, które regulują analizę mutacji genetycznych i badania wpływu na ludzkie zdrowie.

Wysoka częstotliwość mutacji genetycznych w wirusach i bakteriach, jak również w DNA linii komórkowych w hodowli, jest problemem o dużym znaczeniu w odniesieniu do bezpieczeństwa, ponieważ nie wiadomo, w jaki sposób znalezione warianty mogą modyfikować zdolność zakaźną i stymulacja układu odpornościowego w kierunku reakcji autoimmunologicznych.

Na przykład sugeruje się, że Efsa wymaga obecnie charakterystyki genomowej szczepów probiotycznych do stosowania u ludzi / zwierząt, a następnie wykazania zbieżności w czasie sekwencji mikroorganizmu z zadeklarowaną, podczas gdy w przypadku szczepionek, jako Vivotif toleruje się 154 warianty genetyczne w porównaniu z tą podaną w arkuszu danych i są obecne w publicznych bazach danych jako szczep szczepionki referencyjnej.

*Obecność wariantów genetycznych w próbkach szczepionek w porównaniu do deklarowanych szczepów można uznać naszym zdaniem za niezgodność leków.*

W niedawno opublikowanym artykule na temat badania F1000 „Czy mnie interesujesz? Wpływ redukcji pokrycia na identyfikację gatunków i rekonstrukcję genomu w złożonych matrycach biologicznych przez wysokowydajne sekwencjonowanie „strzelby” metagenomowej” Technologia NGS została wykorzystana do analizy matryc biologicznych różnych typów, w tym dwóch partii szczepionki przeciw odrze-świnco-różyczce-ospie wietrznej PRIORIX TETRA (GlaxoSmithKlineSpA), w celu wykazania, w jaki sposób, nawet z sekwencjonowania NGS o niskim zasięgu (tj. kilkuset tysięcy fragmentów sekwencji do 1 miliona), możliwe jest scharakteryzowanie biologicznego składnika w złożonej matrycy. Sekwencjonowanie nowej generacji było już stosowane w próbkach szczepionek w publikacji „Głębokie sekwencjonowanie ujawnia utrzymywanie się związanego z komórkami wirusa szczepionki przeciw śwince w przewlekłym zapaleniu mózgu”, aby wykazać zbieżność między genomem wirusa szczepionki świnki a wirusem znalezionym w tkanka mózgową 18-miesięcznego dziecka z SCID, który zmarł na zapalenie mózgu.

W szczególności w opublikowanym wcześniej artykule na temat badań F1000 zaobserwowano, że około 80% sekwencji uzyskanych przy użyciu technologii NGS na dwóch próbkach szczepionki składa się z ludzkiego DNA, jako zanieczyszczenia występującego w procesie roboczym; całkowita ilość obcego DNA

wynosi około 2 mikrogramy, pochodzące z ludzkiej linii komórkowej płodu MRC-5 używanej do hodowli wirusów różyczki i ospy wietrznej]. Analiza metagenomiczna przeprowadzona na tych dwóch próbkach uwydatnia potencjalną obecność ludzkiego DNA we wszystkich szczepionkach zawierających wirusy hodowane w ludzkich płodach, a ponadto została już zweryfikowana za pomocą technologii innej niż NGS również przez dr Deishera w „Epidemiologic and Molecular Relationship Between Vaccine Manufacture and Autism Spectrum Disorder Prevalence”

Grupa dr Theresy Deisher w artykule „Insertional mutagenesis and autoimmunity induced disease caused by human fetal and retroviral residual toxins in vaccines” stwierdza, że poziomy pozostałości DNA w szczepionkach: MPR, przeciw ospie wietrznej i wirusowemu zapaleniu wątroby typu A dostępnych w Stanach Zjednoczonych są znacznie większe niż limit ustalony w wytycznych WHO DNA unieśmiertelnionych linii komórkowych 10 ng na dawkę szczepionki. Chociaż wytyczne EMA nie przewidują maksymalnych limitów dla DNA płodu pozostającego w szczepionkach, grupa Prof. Deisher's i tak wzięła pod uwagę maksymalną dawkę 10 ng w konsekwencji faktu, że krótkie fragmenty DNA płodu obecne w szczepionkach mają zdolność do integracji z DNA gospodarza i mogą prowadzić do mutagenyzy i / lub genomiki w stabilności, jak również odpowiedzi autoimmunologicznej. Ponadto w niektórych szczepionkach przeciwko ospie wietrznej i MPR stwierdzono obecność fragmentów endogennego ludzkiego retrowirusa K (HERVK), które mogą być ponownie aktywowane i mogą ułatwić integrację wolnego DNA z genomem gospodarza.

Jak stwierdziła dr Deisher, niebezpieczeństwo fragmentów retrowirusowych i resztkowego ludzkiego diploidalnego DNA nie zostało jeszcze zbadane u biorców szczepionki, chociaż literatura naukowa wyraźnie wskazuje na wysokie prawdopodobieństwo niebezpieczeństwa autoimmunologicznej i / lub insercyjnej mutagenyzy z powodu obecności tych pozostałości, a to stanowi zagrożenie dla zdrowia ludzkiego, co niewątpliwie wymaga poważnych badań naukowych i epidemiologicznych.

Wyniki te są zintegrowane z nowymi danymi na temat analizy nowej próbki Priorix Tetra i ponownej analizy poprzednich, ponieważ pojawiła się niezgodność dotycząca antygenów szczepionkowych, tj. Wątpliwej obecności antygeny różyczki. Na podstawie dogłębnych analiz trzech partii potwierdzono, że antygen różyczki nie występuje, ponieważ liczba kopii na próbkę jest całkowicie pomijalna, aby uzyskać efekt immunostymulujący.

To bardziej dogłębne badanie umożliwiło wykrycie obecności przypadkowego DNA i RNA, tj. Wirusów, bakterii, grzybów i robaków w ilościach poniżej granicy wykrywalności instrumentu, a zatem w ilościach resztkowych. Należy jednak podkreślić, że średnia całkowita ilość obcego DNA waha się od 1,9 do 3,7 mikrogramów, z czego około 80% pochodzi z ludzkiego płodowego DNA, a pozostałe 20% z embrionalnego DNA z kurczaka i przypadkowego materiału genetycznego, a więc z nie-resztkowego łączna ilość. Należy zauważyć, że w różnych partiach odnotowano znaczną zmienność przypadkowych zanieczyszczeń, ale ogólnie stwierdzono następujące kategorie drobnoustrojów:

<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Bakteria</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Proteobakterie</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Robak</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Platyhelminthes</li> <li>■ Nematoda</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ wirusy dsDNA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Wirus Varicella</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Wirusy ssRNA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ wirusróżyczki, świnki I odry</li> <li>■ Innewirusy zawierające wątrobę typu A, Cupiximamarenavirus, Pneumoviridae, Jamestown Canyon, Hepacivirus C, Kobuvirus Enterovirus, Porcine reproductive and respiratory syndrome virus</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Retrowirus</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Endogenne retrowirusy ludzkie i ptasie</li> <li>■ Wirus ptasi</li> <li>■ wirus ludzkiego niedoboru odporności i małpa</li> <li>■ wirus mysi</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ wirus niedokrwistości zakaźnej konia</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Inne wirusy</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Ludzki wirus alfa herpes 3</li> <li>▪ Epatyt b wirus</li> <li>▪ Wirus drożdży</li> </ul>

## References

- Qin J, Li R, Raes J, et al.: A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. Nature Publishing Group; 2010; 464(7285): 59–65
- Posada-Céspedes S, Seifert D, Beerenwinkel N. Recent advances in inferring viral diversity from high-throughput sequencing data. *Virus Res*. 2017 Jul 15;239:17-32. doi: 10.1016/j.virusres.2016.09.016. Epub 2016 Sep 28. Review. PubMed PMID: 27693290.
- Cattonaro F, Spadotto A, Radovic S and Marroni F. Do you cov me? Effect of coverage reduction on species identification and genome reconstruction in complex biological matrices by metagenome shotgun high-throughput sequencing [version 1; referees: awaiting peer review]. *F1000Research* 2018, 7:1767 (<https://doi.org/10.12688/f1000research.16804.1>)
- Morfopoulou S, Mee ET, Connaughton SM, Brown JR, Gilmour K, Chong WK, Duprex WP, Ferguson D, Hubank M, Hutchinson C, Kaliakatsos M, McQuaid S, Paine S, Plagnol V, Ruis C, Virasami A, Zhan H, Jacques TS, Schepelmann S, Qasim W, Breuer J. Deep sequencing reveals persistence of cell-associated mumps vaccine virus in chronic encephalitis. *Acta Neuropathol*. 2017 Jan;133(1):139-147. doi: 10.1007/s00401-016-1629-y. Epub 2016 Oct 21. PubMed PMID: 27770235; PubMed Central PMCID: PMC5209397.
- Deisher TA, Doan NV, Koyama K, Bwabye S. Epidemiologic and Molecular Relationship Between Vaccine Manufacture and Autism Spectrum Disorder Prevalence. *Issues Law Med*. 2015 Spring;30(1):47-70. PubMed PMID: 26103708.
- Jarzyna P, Doan NV, Deisher TA. Insertional mutagenesis and autoimmunity induced disease caused by human fetal and retroviral residual toxins in vaccines. *Issues Law Med*. 2016 Fall;31(2):221-234. PubMed PMID: 29108182.