

Rilevazione della proteina Spike ricombinante nel sangue di individui vaccinati contro la SARS-CoV-2: possibili meccanismi molecolari

Scopo

Pdf by:
<https://www.pro-memoria.info>

La pandemia di SARS-CoV-2 ha spinto lo sviluppo e l'uso di vaccini di nuova generazione. Tra questi, i vaccini a base di mRNA consistono in soluzioni iniettabili di mRNA che codificano per uno Spike ricombinante, che è distinguibile dalla proteina wild-type a causa di specifiche variazioni di aminoacidi introdotte per mantenere la proteina in uno stato prefoldato. Questo lavoro presenta un approccio proteomico per rivelare la presenza della proteina Spike ricombinante nei soggetti vaccinati indipendentemente dal titolo anticorpale.

Progettazione sperimentale

L'esame di spettrometria di massa di campioni biologici è stato utilizzato per rilevare la presenza di frammenti specifici di proteina Spike ricombinante in soggetti che hanno ricevuto vaccini a base di mRNA.

Risultati

Lo specifico frammento PP-Spike è stato trovato nel 50% dei campioni biologici analizzati e la sua presenza era indipendente dal titolo anticorpale SARS-CoV-2 IgG. Il tempo minimo e massimo in cui PP-Spike è stato rilevato dopo la vaccinazione è stato rispettivamente di 69 e 187 giorni.

Conclusioni e rilevanza clinica

Il metodo presentato consente di valutare l'emivita della molecola della proteina Spike "PP" e di considerare i rischi o i benefici nel continuare a somministrare dosi di richiamo aggiuntive del vaccino mRNA SARS-CoV-2. Questo approccio è di prezioso supporto per integrare il monitoraggio del livello degli anticorpi e rappresenta la prima rilevazione proteomica di Spike ricombinante nei soggetti vaccinati.

Abbreviazioni

- m¹Ψ
 - metil pseudouridina
- HCoV
 - coronavirus umani
- LNP
 - nanoparticelle lipidiche
- mRNA
 - acido ribonucleico messaggero
- DBS
 - Macchia di sangue secco
- SARS-CoV-2
 - Coronavirus per sindrome respiratoria acuta grave 2
- ACE2
 - Enzima di conversione dell'angiotensina 2
- S
 - Proteine Spike
- PP
 - Doppio amminoacido prolina
- wt
 - Tipo selvaggio
- IgG
 - Immunoglobulina G

1 INTRODUZIONE

La sindrome respiratoria acuta grave coronavirus 2 (SARS-CoV-2) è il coronavirus causale della malattia respiratoria COVID-19 (malattia da coronavirus 2019), responsabile della pandemia in corso che tiene sotto controllo il mondo intero. I ricercatori di tutto il mondo durante questi anni di pandemia hanno studiato questo virus, cercando di capire il suo meccanismo d'azione [1-11]. Il genoma dell'RNA di SARS-CoV-2 è costituito da circa 30.000 nucleotidi e contiene 11 principali geni codificanti. Da un punto di vista strutturale, il SARS-CoV-2 è caratterizzato da un gran numero di proteine Spike (S) glicosilate che coprono la sua superficie e facilitano il legame al recettore dell'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2) della cellula ospite, mediando l'ingresso delle cellule virali [12]. La proteina Spike (S) è una delle quattro principali proteine della SARS-CoV-2 [13]. Consente il riconoscimento del recettore della cellula ospite e il successivo ingresso nella cellula ospite. È costituito dalla subunità distale S1, che è utile per il riconoscimento, e dalla subunità S2 prossimale, che è essenziale per la fusione con la membrana cellulare ospite [13]. Durante lo sviluppo dei due vaccini a base di mRNA più utilizzati, Pfizer-BioNTech (BNT162b2- Comirnaty) e Moderna (mRNA-1273), tutte le basi azotate di uridina sono state sostituite con metil pseudouridina (m¹ψ), una base azotata meno immunogenica [14] ma più stabile [15]. Allo stesso tempo, sono state fatte mutazioni all'interno dei 4284 nucleotidi che costituiscono la proteina Spike, alle posizioni K986P e V987P per rendere la proteina prodotta dopo la lettura ribosomiale forma di prefusione stabile per stimolare una maggiore produzione di anticorpi umani (Figura 1A) [15]. La proteina S di SARS-CoV-2 è altamente conservata tra tutti i coronavirus umani (HCoV) ed è coinvolta nel riconoscimento dei recettori, nell'attaccamento virale e nell'ingresso nelle cellule ospiti. Per questo motivo, rappresenta, per una parte degli scienziati, uno degli obiettivi più importanti per lo sviluppo di vaccini e approcci terapeutici contro il COVID-19. Tra i vaccini COVID-19 sviluppati e testati, quelli che hanno mostrato i risultati più promettenti nella prevenzione dell'infezione da COVID-19 sono una nuova classe di

prodotti vaccinali composti da filamenti di acido ribonucleico messaggero (mRNA) incapsulati in nanoparticelle lipidiche (LNP). Due di loro hanno ricevuto "autorizzazione all'uso di emergenza" (dalla Federal and Drug Administration) e "approvazione condizionata" (dall'Agenzia europea dei medicinali). Entrambi consistono in un mRNA ricombinante da inoculare come vaccino, che codifica per una proteina spike SARS-CoV-2 ricombinante. Anche se gli mRNA sono diversi, entrambi codificano per la stessa proteina Spike ricombinante (qui chiamata PP-Spike). Questo differisce da quello naturale (wt-Spike, Figura 1B) per un doppio cambiamento di amminoacido nelle posizioni 986 e 987 (K986P e V987P, cioè, gli amminoacidi lisina e valina sono entrambi sostituiti da due amminoacidi prolini) [16, 17], al fine di stabilizzare la conformazione Spike in uno stato di prefusione inattiva (Figura 1A). La variazione a doppio amminoacido introdotta abolisce un sito di digestione triptica. Di conseguenza, è possibile distinguere, mediante digestione triptica [18], seguita da analisi di spettrometria di massa [], proteine sintetiche di Spike originate dalla traduzione dei vaccini mRNA da Spike naturale che circola nei fluidi biologici. Qui presentiamo un approccio metodologico in grado di rilevare specificamente la presenza di PP-Spike nei fluidi biologici di organismi umani e animali, come sangue, urina, saliva e fluidi di lavaggio broncoalveolare.

Significato dello studio

Sebbene la pandemia di COVID-19 abbia messo in ginocchio il mondo intero, ha anche permesso a molti scienziati di sviluppare idee e soluzioni contro i virus. Questi includono i vaccini mRNA, che, grazie alla loro versatilità nella produzione, possono rappresentare un nuovo standard di vaccinazione. Tuttavia, è dovere dello scienziato non trascurare i controlli. Qui si trova l'importanza di monitorare la proteina Spike "PP" indotta dal vaccino dopo un periodo di tempo dopo la vaccinazione in campioni biologici umani. Il metodo presentato consente di valutare l'emivita della molecola proteica Spike "PP" e di considerare i rischi o i benefici nel

continuare ulteriori dosi di richiamo del vaccino mRNA SARS-CoV-2.

Il gruppo di studio, dal sud Italia, era di 40 soggetti, 20 sono stati vaccinati con il ciclo completo del vaccino mRNA ad aprile 2022, facendo parte del settore sanitario, e 20 non sono stati vaccinati con negatività per COVID-19 al test nasofaringeo e senza titolo di anticorpi. Sono state aggiunte altre 20 persone non vaccinate che erano positive al COVID-19. Lo specifico frammento di PP-Spike è stato trovato nel 50% dei campioni biologici analizzati (Figure 1C-E e 2). Questa presenza era indipendente dal titolo dell'anticorpo SARS-CoV-2 IgG. I titoli anticorpali avevano una media geometrica di 629,86 BAU/mL (Figura 1E). Il tempo minimo rilevato PP-Spike è stato di 69 giorni dopo la vaccinazione, mentre il tempo massimo è stato di 187 giorni. Tutti i controlli (campioni di individui non vaccinati) erano negativi. Anche il gruppo di controllo (20 persone non vaccinate) è stato testato dopo aver contratto il COVID-19 ed è risultato negativo per PP-spike.

Alcuni studi [23] hanno osservato la presenza della proteina Spike del vaccino immediatamente dopo l'iniezione.

Secondo gli autori [15] e in generale, le molecole di nanoparticella di RNA messaggero del vaccino dovrebbero essere raccolte dalle cellule immunitarie nei linfonodi dopo l'iniezione nel muscolo. Recentemente, altri autori hanno isolato sequenze di RNA messaggero del vaccino dal plasma periferico dopo 28 giorni dopo l'iniezione [24]. La questione se l'RNA del vaccino possa essere integrato o meno nei linfociti o in altre cellule del corpo è molto dibattuto. Tuttavia, l'osservazione della proteina prodotta, come presentata in questo manoscritto, va oltre l'aspetto puramente cognitivo e definisce un metodo per verificare non solo la persistenza dell'RNA del vaccino, ma la quantificazione del prodotto, cioè la proteina che dovrebbe indurre la produzione di anticorpi, al fine di verificare la corretta emivita e la possibile necessità di aggiornare lo stato del vaccino. Utilizzando l'esame di spettrometria di massa di campioni biologici,

abbiamo rilevato la presenza di frammenti specifici di proteina Spike ricombinante in circa il 50% dei soggetti che hanno ricevuto vaccini a base di mRNA. In alcuni casi, abbiamo trovato il marcatore PP-Spike in individui vaccinati più di 30 giorni dopo il vaccino, indicando che è possibile rilevare la proteina "Spike" del vaccino anche qualche tempo dopo la vaccinazione e in qualsiasi tessuto organico (dati in preparazione). Sulla base dei risultati ottenuti, si possono fare ipotesi per possibili meccanismi molecolari di persistenza di "Spike PP". In particolare, tre ipotesi sono possibili e sono mostrate nella Figura 3.

1. È possibile che l'mRNA possa essere integrato o ritrascritto in alcune cellule.
2. È possibile che le pseudo-uridine in una particolare posizione di sequenza, come descritto nell'articolo, in inducano la formazione di una proteina spike che è sempre costitutivamente attiva. Ma sembra molto remoto come ipotesi.
3. È possibile che la nanoparticella contenente mRNA venga raccolta dai batteri normalmente presenti a livello basale nel sangue. Infatti, l'esistenza del microbiota del sangue in individui clinicamente sani è stata dimostrata negli ultimi 50 anni. In effetti, prove indirette da analisi radiometriche hanno suggerito l'esistenza di forme microbiche viventi negli eritrociti [25]. Inoltre, l'osservazione del marcatore PP-Spike in individui vaccinati più di 30 giorni dopo il vaccino in circa il 50% dei soggetti potrebbe anche essere spiegata dall'ampia biodiversità del microbiota eucariotico e procariotico identificata nel sangue dalle tecnologie di sequenziamento di prossima generazione [25].

In conclusione, la possibilità di rilevare la presenza di frammenti specifici di proteina Spike ricombinante apre nuovi scenari per il monitoraggio della presenza e dell'emivita della proteina Spike del vaccino negli individui vaccinati. Le ipotesi avanzate hanno bisogno di studi sempre più ampi. Al

momento, queste osservazioni iniziali sono limitate solo a valutare la presenza della proteina del vaccino con l'obiettivo di voler fornire aiuto nella decisione dell'individuo di somministrare dosi di richiamo o temporizzare.

2 DATI ASSOCIATI

Analisi statistica: il t-test con © 2023 GraphPad Software è stato eseguito tra i due gruppi, vaccinati e non vaccinati per la presenza del peptide di picco chiamato PP. "Valore *P* e significatività statistica: il valore *P* a due code è uguale a 0,0010. Intervallo di confidenza: la media del gruppo uno meno il gruppo due è uguale a 0,40, intervallo di confidenza del 95% di questa differenza: 0,17-60,63. Valori intermedi utilizzati nei calcoli: $t = 35.590$, $df = 38$, errore standard della differenza = 0,112. La differenza di anticorpi del titolo tra i due gruppi non è significativa.

3 PROCEDURE SPERIMENTALI

In conformità con le normative territoriali applicabili, le relazioni sui casi, le serie di casi e gli studi retrospettivi osservazionali non richiedono l'approvazione del comitato etico. È stato ottenuto il consenso informato espresso da tutti i partecipanti, nel sud dell'Italia. Venti campioni biologici umani sono stati raccolti da soggetti vaccinati con consenso espresso, gratuito e informato per la raccolta e l'uso. La media geometrica dei loro anticorpi' titolo contro proteina spike era di 629,86 BAU/mL dopo 60 giorni dalla vaccinazione. Inoltre, sono stati raccolti 20 campioni biologici umani da soggetti non vaccinati (gruppo di controllo, negativo) con consenso espresso, gratuito e informato per la raccolta e l'uso. I candidati non avevano precedentemente subito il COVID-19 ed erano negativi per i test molecolari mediante tampone nasofaringeo e il titolo degli anticorpi era negativo. Sono stati ottenuti altri 20 campioni biologici umani di pazienti non vaccinati, che erano malati di COVID-19, (la media geometrica del titolo degli anticorpi rispetto alla proteina di picco era di

187,89 BAU/mL dopo 105 giorni dalla malattia).

3.1 Pre-analitico

La raccolta preclinica di campioni di sangue secco è stata eseguita in conformità con la letteratura scientifica: *la tecnica Dry Blood Spot (DBS) è comune per la raccolta di piccole quantità di sangue, specialmente dai neonati per l'applicazione dello screening. Questo metodo è stato pubblicato per la prima volta da Robert Guthrie nei primi anni '60 e si basa sul campionamento di una piccola macchia di sangue su una carta da filtro invece di estrarre alcuni millilitri di sangue in una fiala. Con la tecnica DBS, il campionamento è facile e veloce senza la necessità di professionisti qualificati. Tuttavia, le piccole quantità di sangue prelevate (~20-40 μ L) rendono questo approccio più analiticamente più impegnativo in termini di preparazione del campione e sensibilità rispetto al campionamento tradizionale del sangue [26, 27].* Le gocce di sangue sono state raccolte in modalità sterile. Al fine di preservare la struttura proteica, il filtro del sangue secco è stato mantenuto a -20°C fino alla lavorazione [28].

3.2 Motivazione

La tripsina [18] è un enzima appartenente alla classe delle idrolasi in grado di ridurre le proteine a polipeptidi più piccoli mediante tagli proteolitici con specificità per arginina (R) e lisina (K). La proteina Spike sintetica e la proteina Spike naturale possono quindi essere distinte in quanto producono diversi prodotti per la digestione triptica:

- Quando digerito dalla tripsina, il PP-Spike codificato dall'mRNA vaccinale produce un frammento LDPPEAEVQIDR (marcatore PP-Spike) (Figura 2C).
- La proteina wild-type SAR-CoV-2, quando digerita dalla tripsina, produce due frammenti più piccoli, vale a dire LDK + VEAEVQIDR.

Più di 6.600.000 genomi SARS-CoV-2 sono stati sequenziati, e sembra che nessuno di loro abbia mutazioni K986P e V987P, compresa la variante Omicron [29].

Tamponi utilizzati: acqua doppia distillata (VWR); bicarbonato di ammonio (NH_4HCO_3) (Sigma Aldrich). Reagenti: Trypsin di Promega.

Preparazione del reagente: soluzione di tripsina 25 ng/ μL .

Procedura di preparazione: Resusare, in un flaconcino, 20 μg di tripsina solida in 800 μL di soluzione di 50 mM NH_4HCO_3 . Vortice il flaconcino fino a quando la tripsina non è completamente disciolta.

Il peptide standard corrispondente al frammento LDPPEAEVQIDR (Sigma Aldrich, Regno Unito) è stato diluito ad una concentrazione di 10 ng/mL in acqua bi-distillata. Dieci microlitri sono stati iniettati nell'apparecchio LC-MS a scopo di controllo. Il peptide rilevato nel plasma è stato caratterizzato sulla base dei regolamenti dell'UE [30].

3.3 Digestione enzimatica

La procedura di digestione enzimatica delle gocce di sangue viene eseguita sotto una cappa al fine di ridurre al minimo l'esposizione dell'operatore a qualsiasi forma di rischio biologico chimico. Per ogni campione di sangue è stato utilizzato il seguente metodo. Mettere 2 μL di sangue capillare in una provetta di Eppendorf marcata; aggiungere 40 μL di tripsina (Promega, Italia) solubilizzata in una soluzione di NH_4HCO_3 da 50 mm al campione del sangue; vortice per 30 s; testare il pH, che deve essere compreso tra 7 e 8; trasferire il tubo di Eppendorf nel termoblocco; incubare per 2 giorni a 37°C; aggiungere 40 μL di NH_4HCO_3 50 mmol. Raccogliere 40 μL del surnatante ottenuto dopo la centrifugazione a 13000 G per 10 min e trasferirli in un tubo di Eppendorf. Aggiungere 2 μL di acido formico puro e trasferire la soluzione in un flaconcino di iniezione. Il flaconcino viene inserito nell'autocampionatore accoppiato allo

spettrometro di massa e 5 μ L vengono iniettati nella colonna cromatografica.

3.4 Strumentazione LC-SACI-MS

L'analisi è stata eseguita con un Surveyor MS HPLC (ThermoFisher, USA). La colonna utilizzata era un Kinetex 50 \times 4,6 mm 2,6 μ m. L'analisi è stata eseguita utilizzando un gradiente bifase: Fase A (H₂O + 0,2 % acido formico (HCOOH)) e Fase C (CH₃CN) (Tabella 1). Il gradiente cromatografico utilizzato è mostrato nella Tabella 1. Il volume del campione iniettato è di 5 μ L. La sorgente di ionizzazione utilizzata è un SACI-ESI. Sono stati utilizzati un potenziale superficiale di 0 V, una pressione del gas nebulizzatore di 75 PSI e un flusso di gas secco di 1,0 L/min. La temperatura del gas secco è di 320°C [].

TABELLA 1. Condizioni cromatografiche di eluizione del gradiente.

Tempo (min)	% C	Flusso (mL/min)
0	2%	0.250
2.5	2%	0.250
3	80%	0.250
7	80%	0.250
8	2%	0.250

RICONOSCIMENTI

Pdf by:
<https://www.pro-memoria.info>

Ringraziamo tutti i pazienti che hanno partecipato ai nostri studi. Ringraziamo il dottor Aquilino Frongillo per il supporto tecnico. Questa ricerca non ha ricevuto finanziamenti esterni.

DICHIARAZIONE DI CONFLITTO DI INTERESSI

Gli autori non dichiarano alcun conflitto di interessi.

Ricerca aperta

RIFERIMENTI

1Brogna, B., Brogna, C., Petrillo, M., Conte, A. M., Benincasa, G., Montano, L., & Piscopo, M. (2021). Rilevamento di SARS-CoV-2 in un campione fecale di un paziente con risultati tipici di polmonite da COVID-19 su TC ma negativo a più test SARS-CoV-2 RT-PCR su campioni di tampone orofaringeo e nasofaringeo. *Medicina*, 57(3),

3.<https://doi.org/10.3390/medicina57030290>

2Brogna, C., Brogna, B., Bisaccia, D. R., Giuliano, M., Montano, L., Cristoni, S., Petrillo, M., & Piscopo, M. (2022). SARS-CoV-2: Reinfezione dopo 18 mesi di un caso precedente con più test di tampone nasofaringeo negativi e test molecolare fecale positivo. *Medicina*, 58(5),

5.<https://doi.org/10.3390/medicina58050642>

3Brogna, C., Brogna, B., Bisaccia, D. R., Lauritano, F., Marino, G., Montano, L., Cristoni, S., Prisco, M., & Piscopo, M. (2022). La SARS-CoV-2 potrebbe avere un comportamento da batteriofago o indurre l'attività di altri batteriofagi? *Vaccini*, 10(5), 5.<https://doi.org/10.3390/vaccines10050708>

4Brogna, C., Costanzo, V., Brogna, B., Bisaccia, D. R., Brogna, G., Giuliano, M., Montano, L., Viduto, V., Cristoni, S., Fabrowski, M., & Piscopo, M. (2023). Analisi del comportamento dei batteriofagi di un virus RNA umano, SARS-CoV-2, attraverso l'approccio integrato della microscopia a immunofluorescenza, della proteomica e della quantificazione dei D-amminoacido. *Rivista internazionale di scienze molecolari*, 24(4),

4.<https://doi.org/10.3390/ijms24043929>

5Brogna, C., Cristoni, S., Brogna, B., Bisaccia, D. R., Marino, G., Viduto, V., Montano, L., & Piscopo, M. (2023). Peptidi simili alla tossine dalle colture batteriche derivate dal microbioma intestinale infettato da SARS-CoV-2, nuovi dati per un possibile ruolo nel lungo modello COVID. *Biomedicine*, 11(1), 1.<https://doi.org/10.3390/biomedicines11010087>

6Gu, W., Gan, H., Ma, Y., Xu, L., Cheng, Z. J., Li, B., Zhang, X., Jiang, W.,

- Sun, J., Sun, B., & Hao, C. (2022). Il meccanismo molecolare della SARS-CoV-2 che evade l'immunità innata antivirale dell'ospite. *Rivista di virologia*, 19(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s12985-022-01783-5>
- 7Gusev, E., Sarapultsev, A., Solomatina, L., & Chereshnev, V. (2022). Risposta immunitaria specifica per SARS-CoV-2 e patogenesi del COVID-19. *Rivista internazionale di scienze molecolari*, 23(3), 1716. <https://doi.org/10.3390/ijms23031716>
- 8Patel, R., Kaki, M., Potluri, V. S., Kahar, P., & Khanna, D. (2022). Una revisione completa dei vaccini SARS-CoV-2: Pfizer, Moderna & Johnson & Johnson. *Vaccini umani e immunoterapie*, 18(1), 2002083. <https://doi.org/10.1080/21645515.2021.2002083>
- 9Săndulescu, O., Apostolescu, C. G., Preoteșcu, L. L., Streinu-Cercel, A., & Săndulescu, M. (2023). Sviluppi terapeutici per l'infezione da SARS-CoV-2: meccanismi molecolari d'azione degli antivirali e strategie per mitigare la resistenza nelle varianti emergenti nella pratica clinica. *Frontiere in Microbiologia*, 14, 1132501. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2023.1132501>
- 10Sasidharan, S., Sarkar, N., & Saudagar, P. (2023). Scoperta di composti che inibiscono i multi-bersaglio SARS-COV-2. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 41(6), 2602–2617. <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.2025149>
- 11Silva Andrade, B., Siqueira, S., de Assis Soares, W. R., de Souza Rangel, F., Santos, N. O., dos Santos Freitas, A., Ribeiro da Silveira, P., Tiwari, S., Alzahrani, K. J., Góes-Neto, A., Azevedo, V., Ghosh, P., & Barh, D. (2021). Complicanze sanitarie long-COVID e post-COVID: una revisione aggiornata sulle condizioni cliniche e sui loro possibili meccanismi molecolari. *Virus*, 13(4), 4. <https://doi.org/10.3390/v13040700>
- 12Letko, M., Marzi, A., & Munster, V. (2020). Valutazione funzionale dell'ingresso cellulare e dell'uso del recettore per SARS-CoV-2 e altri betacoronavirus del lignaggio B. *Microbiologia della natura*, 5(4), 562–569. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0688-y>
- 13Dai, L., & Gao, G. F. (2021). Obiettivi virali per i vaccini contro il COVID-

19. *Nature Reviews Immunology*, 21(2), 2.<https://doi.org/10.1038/s41577-020-00480-0>

14Andries, O., Mc Cafferty, S., De Smedt, S. C., Weiss, R., Sanders, N. N., & Kitada, T. (2015). L'mRNA incorporato nella N(1)-metilpseudouridina supera l'mRNA incorporato nella pseudouridina fornendo una maggiore espressione proteica e una ridotta immunogenicità nelle linee cellulari di mammiferi e nei topi. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 217, 337–344.<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.08.051>

15Nance, K. D., & Meier, J. L. (2021). Modifiche in caso di emergenza: il ruolo della N1-metilpseudouridina nei vaccini COVID-19. *ACS Central Sciences*, 7(5), 748–756.<https://doi.org/10.1021/acscentsci.1c00197>

16Corbett, K. S., Edwards, D. K., Leist, S. R., Abiona, O. M., Boyoglu-Barnum, S., Gillespie, R. A., Himansu, S., Schäfer, A., Ziwawo, C. T., DiPiazza, A. T., Dinnon, K. H., Elbashir, S. M., Shaw, C. A., Woods, A., Fritch, E. J., Martinez, D. R., Bock, K. W., Minai, M., Nagata, B. M., & Graham, B. S. (2020). Progettazione del vaccino mRNA SARS-CoV-2 abilitata dal prototipo di preparazione ai patogeni. *Natura*, 586(7830), 567–571.<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2622-0>

17Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K. S., Goldsmith, J. A., Hsieh, C.-L., Abiona, O., Graham, B. S., & McLellan, J. S. (2020). Struttura Cryo-EM del picco 2019-nCoV nella conformazione di prefusione. *Scienza*, 367(6483), 1260–1263.<https://doi.org/10.1126/scienza.abb2507>

18Olsen, J. V., Ong, S.-E., & Mann, M. (2004). La tripsina scinde esclusivamente C-terminale ai residui di arginina e lisina. *Proteomica molecolare e cellulare: MCP*, 3(6), 608–614.<https://doi.org/10.1074/mcp.T400003-MCP200>

19Cristoni, S., & Bernardi, L. R. (2004). Bioinformatica nell'analisi dei dati della spettrometria di massa per studi proteomici. *Revisione esperta di Proteomics*, 1(4), 469–483.<https://doi.org/10.1586/14789450.1.4.469>

20Cristoni, S., Bernardi, L. R., Biunno, I., Tubaro, M., & Guidugli, F. (2003). Iolizione chimica a pressione atmosferica senza scarico attivata dalla

superficie. *Comunicazioni rapide nella spettrometria di massa*, 17(17), 1973-1981.<https://doi.org/10.1002/rcm.1141>

21Lundgren, D. H., Hwang, S.-I., Wu, L., & Han, D. K. (2010). Ruolo del conteggio spettrale nella proteomica quantitativa. *Revisione di esperti di Proteomics*, 7(1), 39-53.<https://doi.org/10.1586/epr.09.69>

22Okada, P., Buathong, R., Phuygun, S., Thanadachakul, T., Parnmen, S., Wongboot, W., Waicharoen, S., Wacharapluesadee, S., Uttayamakul, S., Vachiraphan, A., Chittaganpitch, M., Mekha, N., Janejai, N., Iamsirithaworn, S., Lee, R. T., & Maurer-Stroh, S. (2020). Modelli precoci di trasmissione della malattia da coronavirus 2019 (COVID-19) nei viaggiatori da Wuhan alla Thailandia, gennaio 2020. *Eurosurveillance*, 25(8), 2000097.<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.8.2000097>

23Cognetti, J. S., & Miller, B. L. (2021). Monitoraggio della proteina spike sierica con biosensori fotonici monouso dopo la vaccinazione SARS-CoV-2. *Sensori*, 21(17), 17.<https://doi.org/10.3390/s21175857>

24Castruita, J. A. S., Schneider, U. V., Mollerup, S., Leineweber, T. D., Weis, N., Bukh, J., Pedersen, M. S., & Westh, H. (2023). Le sequenze del vaccino mRNA di picco SARS-CoV-2 circolano nel sangue fino a 28 giorni dopo la vaccinazione COVID-19. *Apmis*, 131(3), 128-132.<https://doi.org/10.1111/apm.13294>

25Tsafarova, B., Hodzhev, Y., Yordanov, G., Tolchkov, V., Kalfin, R., & Panaiotov, S. (2023). Morfologia del microbiota del sangue in individui sani valutati mediante microscopia ottica ed elettronica. *Frontiere nella microbiologia cellulare e delle infezioni*, 12, 1091341.<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2022.1091341>

26Yishai Aviram, L., Magen, M., Chapman, S., Neufeld Cohen, A., Lazar, S., & Dagan, S. (2018). Raccolta di campioni Dry Blood Spot per il monitoraggio post-esposizione di agenti di guerra chimica - determinazione in vivo di acidi fosforici utilizzando LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1093-1094, 60-65.<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.06.035>

27 Segreteria di consulenza medica. (2003). Screening neonatale di errori innati del metabolismo utilizzando la spettrometria di massa tandem: un'analisi basata sull'evidenza. *Ontario Health Technology Assessment Series*, 3(3), 1–36.

28 Di Girolamo, F., Alessandroni, J., Somma, P., & Guadagni, F. (2010). Procedure operative pre-analitiche per la profilazione proteica a basso peso molecolare del siero. *Journal of Proteomics*, 73(3), 667–677. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.09.006>

29 Miller, N. L., Clark, T., Raman, R., & Sasisekharan, R. (2021). Approfondimenti sul panorama mutazionale della variante SARS-CoV-2 Omicron. *Cell Reports Medicine*, 3(2), 100527. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.1005279>

30 Cristoni, S., Dusi, G., Brambilla, P., Albini, A., Conti, M., Brambilla, M., Bruno, A., Di Gaudio, F., Ferlin, L., Tazzari, V., Mengozzi, S., Barera, S., Sialer, C., Trenti, T., Cantu, M., Rossi Bernardi, L., & Noonan, D. M. (2017). SANIST: Ottimizzazione di una tecnologia per l'identificazione dei composti basata sulla direttiva dell'Unione europea con applicazioni nelle analisi forensi, farmaceutiche e alimentari. *Journal of Mass Spectrometry: JMS*, 52(1), 16–21. <https://doi.org/10.1002/jms.3895>

Pdf by:
<https://www.pro-memoria.info>