

PROTEOMICS – Clinical Applications / Early View / 2300048

SCHNELLE KOMMUNIKATION  Freier Zugang    

Nachweis von rekombinantem Spike-Protein im Blut von gegen SARS-CoV-2 geimpften Personen: Mögliche molekulare Mechanismen

Carlo Brogna , Simone Cristoni, Giuliano Marino, Luigi Montano, Valentina Viduto, Mark Fabrowski, Gennaro Lettieri, Marina Piscopo 

Erstveröffentlichung: 31. August 2023

<https://doi.org/10.1002/prca.202300048>

Carlo Brogna und Simone Cristoni trugen zu gleichen Teilen zu dieser Studie bei.

Abstrakt

Zweck

Die SARS-CoV-2-Pandemie war der Anstoß für die Entwicklung und den Einsatz von Impfstoffen der nächsten Generation. Unter diesen bestehen mRNA-basierte Impfstoffe aus injizierbaren mRNA-Lösungen, die für einen rekombinanten Spike kodieren, der sich vom Wildtyp-Protein durch spezifische Aminosäurevariationen unterscheidet, die eingeführt werden, um das Protein in einem verweigerten Zustand zu halten. In dieser Arbeit wird ein proteomischer Ansatz vorgestellt, um das Vorhandensein von rekombinantem Spike-Protein bei geimpften Probanden unabhängig vom Antikörpertiter aufzudecken.

Versuchsplanung

Die massenspektrometrische Untersuchung biologischer Proben wurde verwendet, um das Vorhandensein spezifischer Fragmente des rekombinanten Spike-Proteins bei Probanden nachzuweisen, die mRNA-basierte Impfstoffe erhielten.

Befund

Das spezifische PP-Spike-Fragment wurde in 50 % der analysierten biologischen Proben gefunden und war unabhängig vom SARS-CoV-2-IgG-Antikörpertiter. Der minimale und maximale Zeitpunkt, zu dem PP-Spike nach der Impfung nachgewiesen wurde, betrug 69 bzw. 187 Tage.

Schlussfolgerungen und klinische Relevanz

Die vorgestellte Methode ermöglicht es, die Halbwertszeit des Spike-Proteinmoleküls "PP" zu bewerten und die Risiken oder Vorteile der weiteren Verabreichung zusätzlicher Auffrischungsdosen des SARS-CoV-2-mRNA-Impfstoffs zu berücksichtigen. Dieser Ansatz ist eine wertvolle Unterstützung bei der Ergänzung zur Überwachung des Antikörperspiegels und stellt den ersten proteomischen Nachweis von rekombinantem Spike bei geimpften Probanden dar.

Abkürzungen

m1Ψ

Methylpseudouridin

HCoV

Humane Coronaviren

LNPs

Lipid-Nanopartikel

mrna

Boten-Ribonukleinsäure

DBS

Trockener Blutfleck

SARS-CoV-2

Schweres akutes respiratorisches Syndrom Coronavirus 2

ACE2

Angiotensin-konvertierendes Enzym 2

S

Spike-Protein

PP

Doppelte Prolin-Aminosäure

Wt

Wild-Typ

Hgf

Immunglobulin G

1 EINLEITUNG

Das schwere akute respiratorische Syndrom Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) ist das ursächliche Coronavirus der COVID-19-Atemwegserkrankung (Coronavirus-Krankheit 2019), das für die anhaltende Pandemie verantwortlich ist, die die ganze Welt in Schach hält. Forscher auf der ganzen Welt haben in diesen Pandemie Jahren dieses Virus untersucht und versucht, seinen

Wirkmechanismus zu verstehen [1-11]. Das RNA-Genom von SARS-CoV-2 besteht aus etwa 30.000 Nukleotiden und enthält 11 wichtige kodierende Gene. Aus struktureller Sicht zeichnet sich SARS-CoV-2 durch eine große Anzahl von glykosylierten Spike (S)-Proteinen aus, die seine Oberfläche bedecken und die Bindung an den Angiotensin-konvertierenden Enzym 2 (ACE2)-Rezeptor der Wirtszelle erleichtern und den Eintritt in virale Zellen vermitteln [12]. Das Spike-Protein (S) ist eines der vier Hauptproteine von SARS-CoV-2 [13]. Es ermöglicht die Erkennung des Wirtszellrezeptors und das anschließende Eindringen in die Wirtszelle. Sie besteht aus der distalen S1-Untereinheit, die für die Erkennung nützlich ist, und der proximalen S2-Untereinheit, die für die Fusion mit der Wirtszellmembran essentiell ist [13]. Bei der Entwicklung der beiden am weitesten verbreiteten mRNA-basierten Impfstoffe Pfizer-BioNTech (BNT162b2-Comirnaty) und Moderna (mRNA-1273) wurden alle Uridin-Stickstoffbasen durch Methylpseudouridin (m¹Ψ) ersetzt – eine weniger immunogene [14], aber stabilere Stickstoffbase [15]. Gleichzeitig wurden Mutationen innerhalb der 4284 Nukleotide, aus denen das Spike-Protein besteht, an den Positionen K986P und V987P vorgenommen, um das nach ribosomalem Ablesen produzierte Protein zu einer stabilen Präfusionsform zu machen, die eine erhöhte Produktion von humanen Antikörpern stimuliert (Abbildung 1A) [15]. Das S-Protein von SARS-CoV-2 ist unter allen humanen Coronaviren (HCoV) hochkonserviert und an der Rezeptorerkennung, der Virusanheftung und dem Eintritt in die Wirtszellen beteiligt. Aus diesem Grund stellt es für einen Teil der Wissenschaftler eines der wichtigsten Ziele für die Entwicklung von Impfstoffen und Therapieansätzen gegen COVID-19 dar. Unter den entwickelten und getesteten COVID-19-Impfstoffen haben diejenigen die vielversprechendsten Ergebnisse bei der Verhinderung einer COVID-19-Infektion gezeigt, eine neuartige Klasse von Impfstoffprodukten, die aus Boten-Ribonukleinsäure-Filamenten (mRNA) bestehen, die in Lipid-Nanopartikeln (LNPs) eingekapselt sind. Zwei von ihnen haben eine "Notfallzulassung" (von der Federal and Drug Administration) und eine "bedingte Zulassung" (von der Europäischen Arzneimittel-Agentur) erhalten. Beide bestehen aus einer rekombinanten mRNA, die als Impfstoff beimpft werden soll und für ein rekombinantes SARS-CoV-2-Spike-Protein kodiert. Obwohl die mRNAs unterschiedlich sind, kodieren beide für dasselbe rekombinante Spike-Protein (hier PP-Spike genannt). Diese unterscheidet sich von der natürlichen (wt-Spike, Abbildung 1B) durch einen doppelten Aminosäurewechsel an Position 986 und 987 (K986P und V987P, d.h. die Aminosäuren Lysin und Valin werden beide durch zwei Prolin-Aminosäuren ersetzt) [16, 17], um die Spike-Konformation in einem inaktiven Präfusionszustand zu stabilisieren (Abbildung 1A). Die eingeführte doppelte Aminosäurevariation hebt eine tryptische Verdauungsstelle auf. Infolgedessen ist es möglich, durch tryptischen Aufschluss [18] und anschließende massenspektrometrische Analyse [19-22] synthetische Spike-Proteine zu unterscheiden, die aus der Translation der mRNA-Impfstoffe aus natürlichem Spike stammen, das in biologischen Flüssigkeiten zirkuliert. Hier stellen wir einen methodischen Ansatz vor, mit dem das Vorhandensein von PP-Spike in biologischen Flüssigkeiten menschlicher und tierischer Organismen, wie Blut, Urin, Speichel und bronchoalveolären Lavageflüssigkeiten, spezifisch nachgewiesen werden kann.

Aussagekraft der Studie

Obwohl die COVID-19-Pandemie die ganze Welt in die Knie zwang, ermöglichte sie es auch vielen Wissenschaftlern, Ideen und Lösungen gegen Viren zu entwickeln. Dazu gehören mRNA-Impfstoffe, die aufgrund ihrer Vielseitigkeit in der Herstellung einen neuen Impfstandard darstellen könnten. Es ist jedoch die Pflicht des Wissenschaftlers, die Kontrollen nicht zu vernachlässigen. Hierin liegt die Bedeutung der Überwachung des impfstoffinduzierten Spike-Proteins "PP" nach einer bestimmten Zeit nach der Impfung in humanen biologischen Proben. Die vorgestellte Methode ermöglicht es, die Halbwertszeit des Spike-Proteinmoleküls "PP" zu bewerten und die Risiken oder Vorteile bei der Fortsetzung weiterer Auffrischungsdosen des SARS-CoV-2-mRNA-Impfstoffs zu berücksichtigen.

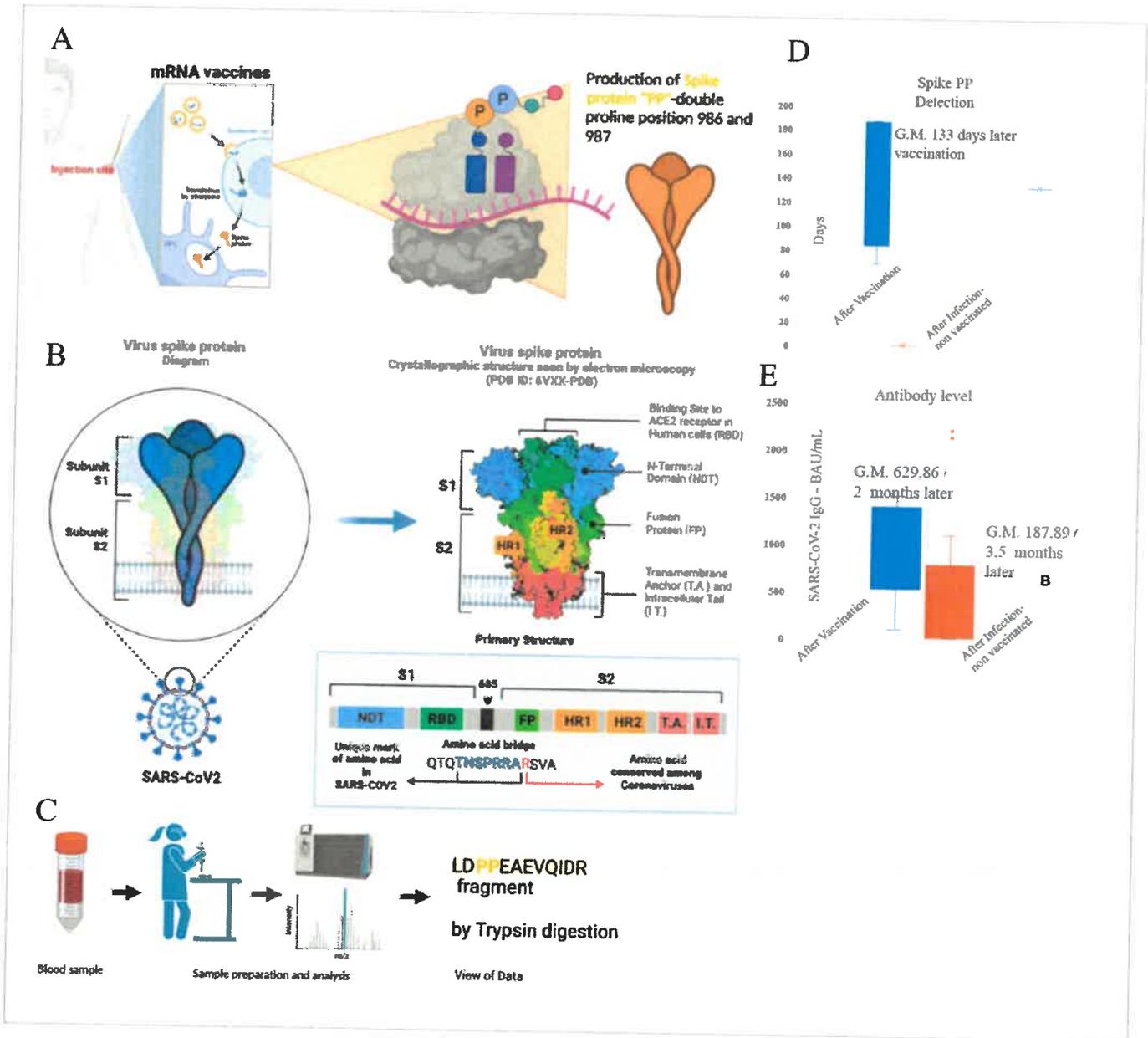


ABBILDUNG 1

[Im Figuren-Viewer öffnen](#) | [PowerPoint](#)

Schematische Darstellung der PP-Spike-Proteinproduktion. (A) Bildung des Spike-PP-Proteins nach Injektion von Impfstoff-mRNA. (B) Beispiel für ein unmodifiziertes Spike-Protein vom Wildtyp. (C) Extraktions- und Nachweisschema (weitere Einzelheiten im Text). (D) Quantifizierung des Antikörpertiters der 20 geimpften Fälle. (E) Zeit vom Tag des Abschlusses der Impfung bis zur Entdeckung des mRNA-induzierten Spike-Proteins "PP" des Impfstoffs.

Die Studiengruppe aus Süditalien bestand aus 40 Probanden, von denen 20 im April 2022 mit dem vollständigen Zyklus des mRNA-Impfstoffs geimpft wurden und Teil des Gesundheitssektors waren, und 20 waren ungeimpft mit Negativität auf COVID-19 zum Nasopharynx-Test und ohne Titer von Antikörpern. Weitere 20 ungeimpfte Personen, die positiv auf COVID-19 getestet wurden, kamen hinzu. Das spezifische PP-Spike-Fragment wurde in 50 % der analysierten biologischen Proben gefunden (Abbildungen 1C–E und 2). Diese Präsenz war unabhängig vom SARS-CoV-2 IgG-Antikörpertiter. Die Antikörpertiter

wiesen ein geometrisches Mittel von 629,86 BAU/ml auf (Abbildung 1E). Die minimale Zeit, in der PP-Spike nachgewiesen wurde, betrug 69 Tage nach der Impfung, während die maximale Zeit 187 Tage betrug. Alle Kontrollen (Proben von ungeimpften Personen) waren negativ. Die Kontrollgruppe (20 ungeimpfte Personen) wurde ebenfalls getestet, nachdem sie sich mit COVID-19 infiziert hatte, und war negativ für PP-Spike.

RT± 10,60-12,96 sm 11G

NL: 7.03 E2
m/z= 691.35-
692.35
F. ITMS + c ESI
Full ms
(50.00-1200.00)
MS 1

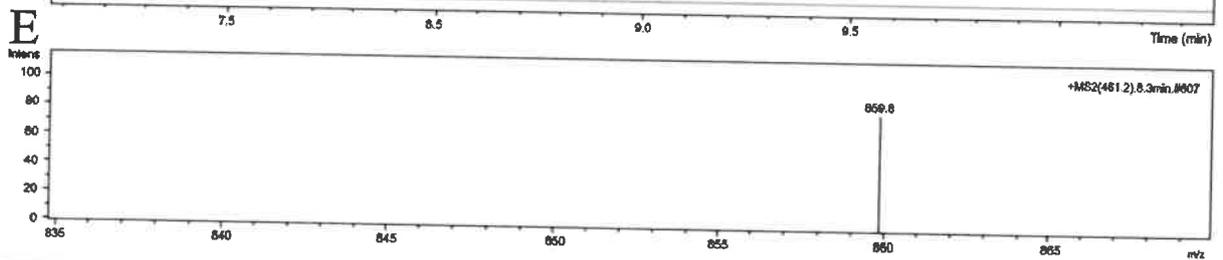
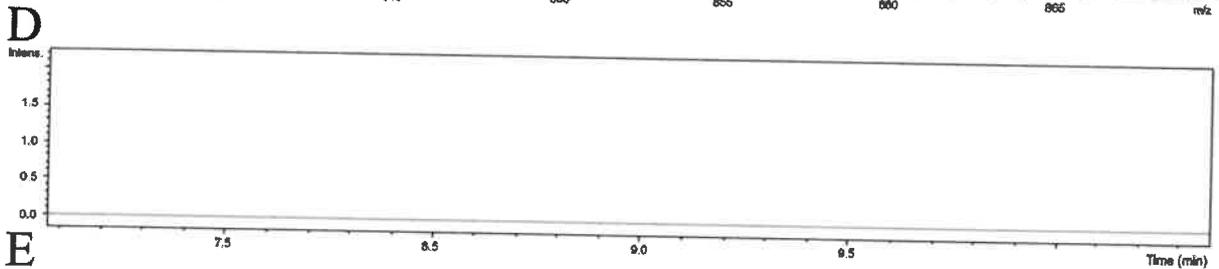
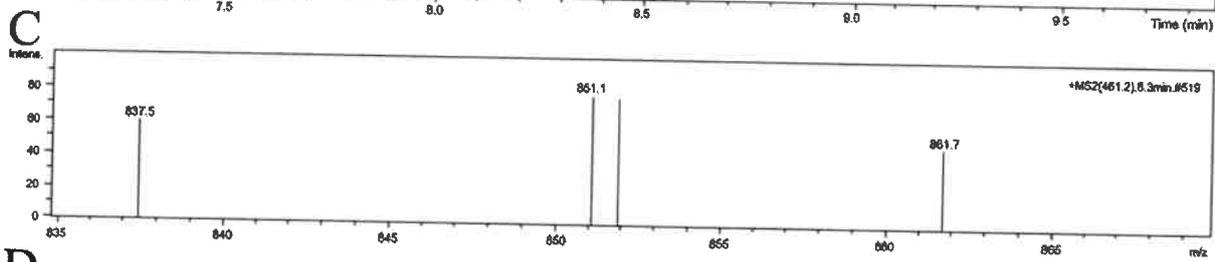
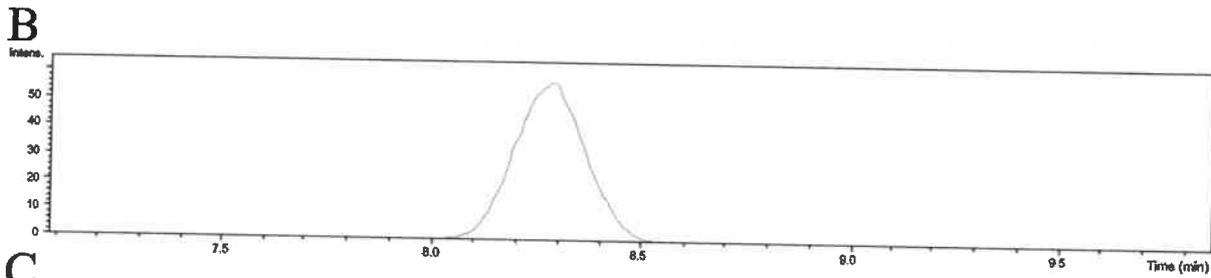
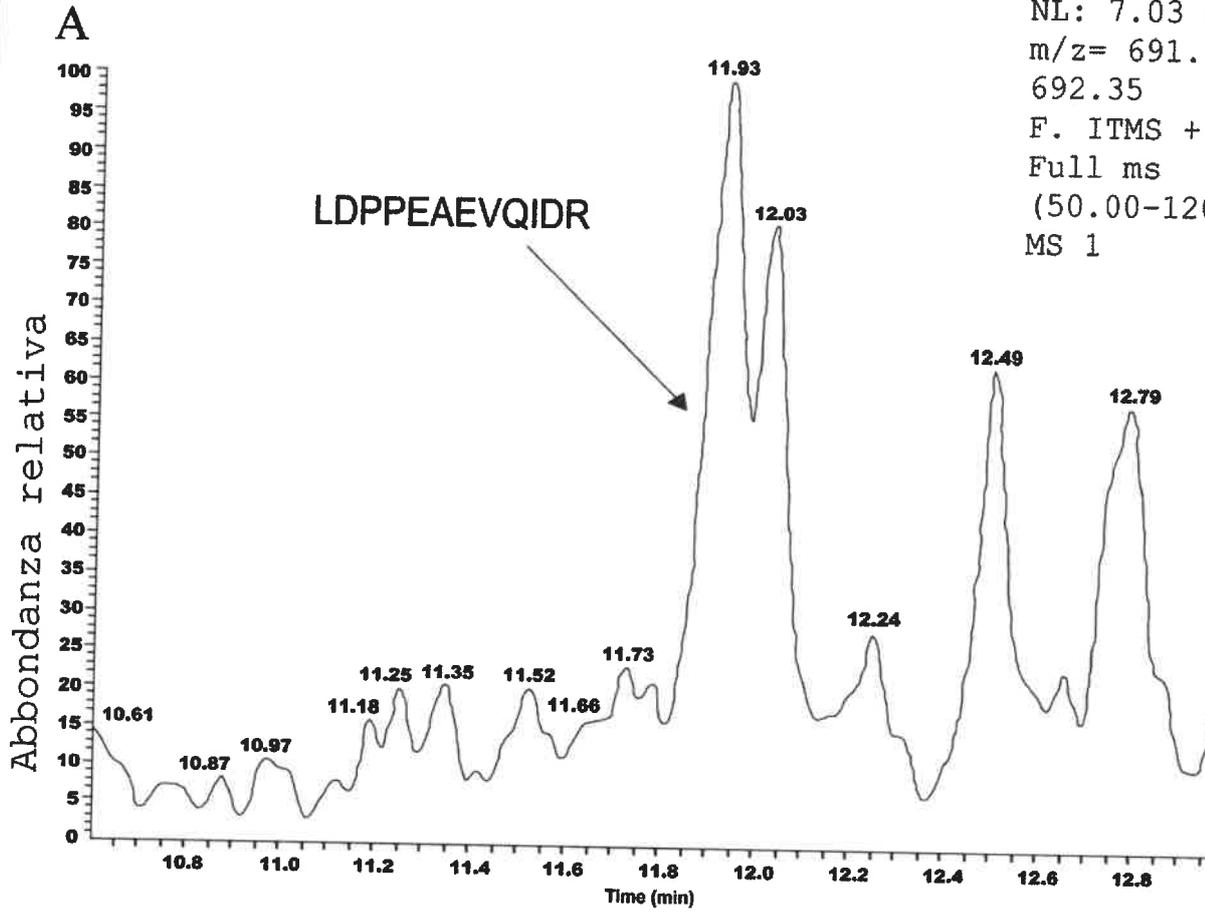


ABBILDUNG 2

[Im Figuren-Viewer öffnen](#) | [PowerPoint](#)

Molekülon der Sequenz LDPPEAEVQIDR-Spike "PP". (A) Zeigt das m/z-Verhältnis (Molekülonen) der SEQ ID NO:1-Detektion an. Zeigt ein Beispiel für das Spektrum der Peptidzone, die durch das enzymatische Versagen gekennzeichnet ist, die "PP"-Aminosäuren des "Spike"-Proteins zu schneiden, das durch mRNA-Impfstoffe induziert wird. (B-E) Extraktionsmassenchromatogramme von (B) geimpften Probanden und (D) Kontrollproben wurden durch Fragmentierung des $[M+3H]^{3+}$ -Ions bei m/z 461 und Überwachung des einfach geladenen Signals bei m/z 851 erhalten. Ebenfalls gezeigt sind die Tandem-Massenspektren, die durch die Analyse (C) des geimpften Probanden und (E) des Kontrollsubjekts erhalten wurden. Fünf Mikroliter aufgeschlossener Proben wurden injiziert, und die Flüßflussrate betrug 250 Mikroliter/min.

Einige Studien [23] haben das Vorhandensein des Spike-Proteins des Impfstoffs unmittelbar nach der Injektion beobachtet.

Den Autoren zufolge [15] sollten die Impfstoff-Boten-RNA-Nanopartikelmoleküle nach der Injektion in den Muskel von den Immunzellen in den Lymphknoten aufgenommen werden. Kürzlich haben andere Autoren Impfstoff-Boten-RNA-Sequenzen nach 28 Tagen nach der Injektion aus peripherem Plasma isoliert [24]. Die Frage, ob die Impfstoff-RNA in die Lymphozyten oder andere Körperzellen eingebaut werden kann, ist umstritten. Die Beobachtung des produzierten Proteins, wie sie in diesem Manuskript vorgestellt wird, geht jedoch über den rein kognitiven Aspekt hinaus und definiert eine Methode, um nicht nur die Persistenz der Impfstoff-RNA, sondern auch die Quantifizierung des Produkts, d.h. des Proteins, das die Antikörperproduktion induzieren soll, zu überprüfen, um die korrekte Halbwertszeit und eine mögliche Notwendigkeit der Aktualisierung des Impfstoffstatus zu überprüfen. Mittels massenspektrometrischer Untersuchung biologischer Proben wiesen wir bei etwa 50 % der Probanden, die mRNA-basierte Impfstoffe erhielten, das Vorhandensein spezifischer Fragmente des rekombinanten Spike-Proteins nach. In einigen Fällen fanden wir den PP-Spike-Marker bei geimpften Personen mehr als 30 Tage nach der Impfung, was darauf hindeutet, dass es möglich ist, das "Spike"-Protein des Impfstoffs auch einige Zeit nach der Impfung und in jedem organischen Gewebe nachzuweisen (Daten in Vorbereitung). Basierend auf den gewonnenen Ergebnissen können Hypothesen für mögliche molekulare Mechanismen der Persistenz von "Spike PP" aufgestellt werden. Insbesondere sind drei Hypothesen möglich, die in Abbildung 3 dargestellt sind.

1. Es ist möglich, dass die mRNA in einigen Zellen integriert oder retranskribiert wird.
2. Es ist möglich, dass Pseudo-Uridine an einer bestimmten Sequenzposition, wie im Artikel beschrieben, die Bildung eines Spike-Proteins induzieren, das immer konstitutiv aktiv ist. Aber es scheint als Hypothese sehr weit entfernt zu sein.
3. Es ist möglich, dass die mRNA-haltigen Nanopartikel von Bakterien aufgenommen werden, die normalerweise auf basaler Ebene im Blut vorhanden sind. Tatsächlich wurde die Existenz von Blutmikrobiota bei klinisch gesunden Personen in den letzten

50 Jahren nachgewiesen. In der Tat deuteten indirekte Hinweise durch radiometrische Analysen auf die Existenz lebender mikrobieller Formen in Erythrozyten hin [25]. Darüber hinaus konnte die Beobachtung des PP-Spike-Markers bei Personen, die mehr als 30 Tage nach der Impfung geimpft wurden, bei etwa 50 % der Probanden auch durch die große Artenvielfalt der eukaryotischen und prokaryotischen Mikrobiota erklärt werden, die durch Next-Generation-Sequencing-Technologien im Blut identifiziert wurde [25].

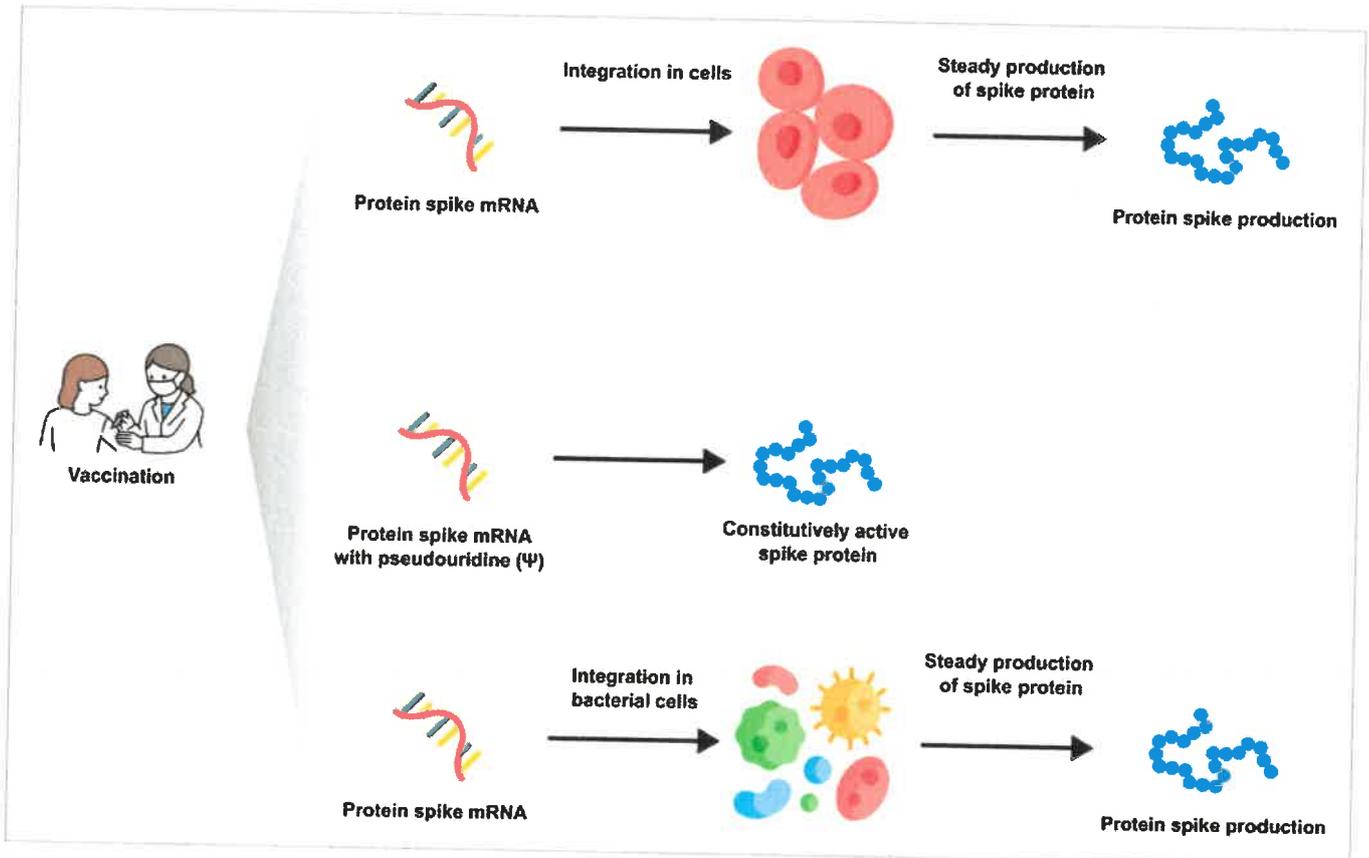


ABBILDUNG 3

[Im Figuren-Viewer öffnen](#) | [PowerPoint](#)

Mögliche molekulare Mechanismen der Persistenz von "Spike PP".

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Möglichkeit, das Vorhandensein spezifischer Fragmente des rekombinanten Spike-Proteins nachzuweisen, neue Szenarien für die Überwachung des Vorhandenseins und der Halbwertszeit des Spike-Proteins des Impfstoffs bei geimpften Personen eröffnet. Die aufgestellten Hypothesen bedürfen weiterer und umfangreicherer Studien. Gegenwärtig beschränken sich diese ersten Beobachtungen nur auf die Beurteilung des Vorhandenseins des Impfstoffproteins mit dem Ziel, dem Einzelnen bei der Entscheidung über die Verabreichung von Auffrischungsimpfungen oder eine vorübergehende Impfung behilflich sein zu wollen.

2 ZUGEHÖRIGE DATEN

Statistische Analyse: Der t-Test mit © der GraphPad-Software 2023 wurde zwischen den beiden Gruppen durchgeführt, geimpft und nicht geimpft auf das Vorhandensein des Peptids von Spike namens PP. "P-Wert und statistische Signifikanz: Der zweiseitige *P*-Wert ist gleich 0,0010. Konfidenzintervall: Der Mittelwert von Gruppe eins minus Gruppe zwei ist gleich 0,40, 95%-Konfidenzintervall dieser Differenz: 0,17–0,63. Bei Berechnungen verwendete Zwischenwerte: $t = 35.590$, $df = 38$, Standardfehler der Differenz = 0,112. Der Unterschied im Titer-Antikörper zwischen den beiden Gruppen ist nicht signifikant.

3 EXPERIMENTELLE VERFAHREN

In Übereinstimmung mit den geltenden territorialen Vorschriften bedürfen Fallberichte, Fallserien und retrospektive Beobachtungsstudien keiner Genehmigung durch die Ethikkommission. Die von allen Teilnehmern in Süditalien zum Ausdruck gebrachte Einverständniserklärung wurde eingeholt. Zwanzig menschliche biologische Proben wurden von geimpften Probanden mit ausdrücklicher, kostenloser und informierter Zustimmung zur Entnahme und Verwendung entnommen. Das geometrische Mittel des Antikörpertiters im Vergleich zum Spike-Protein betrug 629,86 BAU/ml nach 60 Tagen nach der Impfung. Darüber hinaus wurden 20 menschliche biologische Proben von ungeimpften Probanden (Kontrollgruppe, negativ) mit ausdrücklicher, kostenloser und informierter Zustimmung zur Entnahme und Verwendung entnommen. Die Kandidaten hatten sich zuvor nicht an COVID-19 erkrankt und waren negativ für molekulare Tests mittels Nasen-Rachen-Abstrich, und der Antikörpertiter war negativ. Weitere 20 humanbiologische Proben von ungeimpften Patienten, die an COVID-19 erkrankt waren, wurden entnommen (geometrisches Mittel des Antikörpertiters im Vergleich zum Spike-Protein betrug 187,89 BAU/ml später 105 Tage nach der Erkrankung).

3.1 Voranalytisch

Die präklinische Trockenblutentnahme wurde in Übereinstimmung mit der wissenschaftlichen Literatur durchgeführt: *Die Dry Blood Spot (DBS)-Technik ist für die Entnahme kleiner Blutmengen, insbesondere von Neugeborenen, für die Screening-Anwendung üblich. Diese Methode wurde erstmals in den frühen 1960er Jahren von Robert Guthrie veröffentlicht und basiert darauf, einen kleinen Blutfleck auf ein Filterpapier zu entnehmen, anstatt ein paar Milliliter Blut in ein Fläschchen zu entnehmen. Mit der DBS-Technik ist die Probenahme einfach und schnell, ohne dass geschulte Fachkräfte erforderlich sind. Die geringen Blutentnahmemengen (~20–40 µL) machen diesen Ansatz jedoch im Vergleich zur traditionellen Blutentnahme analytisch anspruchsvoller in Bezug auf Probenvorbereitung und Sensitivität [26, 27].* Die Blutstropfen wurden steril entnommen. Um die Proteinstruktur zu erhalten, wurde der Trockenblutfilter bis zur Verarbeitung bei -20°C gehalten [28].

3.2 Begründung

Trypsin [18] ist ein Enzym aus der Klasse der Hydrolasen, das in der Lage ist, Proteine durch proteolytische Schnitte mit Spezifität für Arginin (R) und Lysin (K) zu kleineren Polypeptiden zu reduzieren. Synthetisches Spike-Protein und natürliches Spike-Protein können daher unterschieden werden, da sie unterschiedliche tryptische Verdauungsprodukte produzieren:

- Bei der Verdauung durch Trypsin produziert der von der Impfstoff-mRNA kodierte PP-Spike ein LDPPEAEVQIDR-Fragment (PP-Spike-Marker) (Abbildung 2C).
- Das Wildtyp-SAR-CoV-2-Protein produziert, wenn es von Trypsin verdaut wird, zwei kleinere Fragmente, nämlich LDK + VEAQVQIDR.

Mehr als 6.600.000 SARS-CoV-2-Genome wurden sequenziert, und es scheint, dass keines von ihnen K986P- und V987P-Mutationen aufweist, einschließlich der Omikron-Variante [29].

Verwendete Puffer: Doppelt destilliertes Wasser (VWR); Ammoniumhydrogencarbonat (NH_4HCO_3) (Sigma Aldrich). Reagenzien: Trypsin von Promega.

Reagenzienzubereitung: Trypsinlösung 25 ng/ μl .

Zubereitungsverfahren: Resuspendieren Sie in einer Durchstechflasche 20 μg festes Trypsin in 800 μl 50 mM NH_4HCO_3 Lösung. Wirbeln Sie die Durchstechflasche, bis sich das Trypsin vollständig aufgelöst hat.

Das Standardpeptid, das dem Fragment LDPPEAEVQIDR (Sigma Aldrich, UK) entspricht, wurde in bidestilliertem Wasser auf eine Konzentration von 10 ng/ml verdünnt. Zehn Mikroliter wurden zu Kontrollzwecken in die LC-MS-Apparatur injiziert. Das im Plasma nachgewiesene Peptid wurde anhand von EU-Verordnungen charakterisiert [30].

3.3 Enzymatische Verdauung

Der enzymatische Aufschluss von Blutstropfen wird unter einem Abzug durchgeführt, um die Exposition des Bedieners gegenüber jeglicher Form chemischer biologischer Gefahren zu minimieren. Für jede Blutprobe wurde die folgende Methode angewendet. Geben Sie 2 μl Kapillarblut in ein beschriftetes Eppendorf-Röhrchen; 40 μl Trypsin (Promega, Italien) in einem 50 mmol/L NH_4HCO_3 Lösung für die Blutprobe; Wirbel für 30 s; Testen Sie den pH-Wert, der zwischen 7 und 8 liegen muss. Übertragen Sie den Eppendorf-Schlauch in den Thermoblock; 2 Tage bei 37°C inkubieren; 40 μl NH_4HCO_3 50 mmol/L. 40 μl des nach der Zentrifugation erhaltenen Überstandes bei 13000 G für 10 min auffangen und in ein Eppendorf-Röhrchen überführen. Fügen Sie 2 μl reine Ameisensäure hinzu und geben Sie die Lösung in eine Injektionsdurchstechflasche. Das Fläschchen wird in den Autosampler eingeführt, der mit dem Massenspektrometer gekoppelt ist, und 5 μL werden in die chromatographische Säule injiziert.

3.4 LC-SACI-MS-Messgeräte

Die Analyse wurde mit einem Surveyor MS HPLC (ThermoFisher, USA) durchgeführt. Als Säule kam eine Kinetex 50 × 4,6 mm 2,6 µm zum Einsatz. Die Analyse wurde mit einem Zwei-Phasen-Gradienten durchgeführt: Phase A (H₂O + 0,2 % Ameisensäure (HCOOH)) und Phase C (CH₃CN) (Tabelle 1). Der verwendete chromatographische Gradient ist in Tabelle 1 dargestellt. Das Volumen der injizierten Probe beträgt 5 µl. Als Ionisationsquelle kommt ein SÄCI-ESI zum Einsatz. Es wurde ein Oberflächenpotential von 0 V, ein Verneblergasdruck von 75 PSI und ein Trockengasdurchfluss von 1,0 l/min verwendet. Die Trockengastemperatur liegt bei 320°C [19-22].

TABELLE 1. Chromatographische Bedingungen der Gradientenelution.

Zeit (min)	% C	Durchfluss (ml/min)
0	2%	0.250
2.5	2%	0.250
3	80%	0.250
7	80%	0.250
8	2%	0.250

Hinweis: Der prozentuale Anteil der Eluentenphase C (CH₃CN) wird zusammen mit der Flussrate des Eluenten bei verschiedenen Gradientenelutionszeiten angegeben.

BESTÄTIGUNGEN

Wir danken allen Patienten, die an unseren Studien teilgenommen haben. Wir danken Dr. Aquilino Frongillo für die technische Unterstützung. Diese Forschung wurde nicht durch Drittmittel finanziert.

ERKLÄRUNG ZU INTERESSENKONFLIKTEN

Die Autoren erklären keinen Interessenkonflikt.

Offene Forschung

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data available on request from the authors.

REFERENZEN

- 1 Brogna, B., Brogna, C., Petrillo, M., Conte, A. M., Benincasa, G., Montano, L., & Piscopo, M. (2021). SARS-CoV-2 detection in fecal sample from a patient with typical findings of COVID-19 pneumonia on CT but negative to multiple SARS-CoV-2 RT-PCR tests on oropharyngeal and nasopharyngeal swab samples. *Medicina*, 57(3), 3. <https://doi.org/10.3390/medicina57030290>
- 2 Brogna, C., Brogna, B., Bisaccia, D. R., Giuliano, M., Montano, L., Cristoni, S., Petrillo, M., & Piscopo, M. (2022). SARS-CoV-2: Reinfection after 18 months of a previous case with multiple negative nasopharyngeal swab tests and positive fecal molecular test. *Medicina*, 58(5), 5. <https://doi.org/10.3390/medicina58050642>
- 3 Brogna, C., Brogna, B., Bisaccia, D. R., Lauritano, F., Marino, G., Montano, L., Cristoni, S., Prisco, M., & Piscopo, M. (2022). Could SARS-CoV-2 have bacteriophage behavior or induce the activity of other bacteriophages? *Vaccines*, 10(5), 5. <https://doi.org/10.3390/vaccines10050708>
- 4 Brogna, C., Costanzo, V., Brogna, B., Bisaccia, D. R., Brogna, G., Giuliano, M., Montano, L., Viduto, V., Cristoni, S., Fabrowski, M., & Piscopo, M. (2023). Analysis of bacteriophage behavior of a human RNA virus, SARS-CoV-2, through the integrated approach of immunofluorescence microscopy, proteomics and D-amino acid quantification. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 4. <https://doi.org/10.3390/ijms24043929>
- 5 Brogna, C., Cristoni, S., Brogna, B., Bisaccia, D. R., Marino, G., Viduto, V., Montano, L., & Piscopo, M. (2023). Toxin-like peptides from the bacterial cultures derived from gut microbiome infected by SARS-CoV-2—new data for a possible role in the long COVID pattern. *Biomedicines*, 11(1), 1. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11010087>
- 6 Gu, W., Gan, H., Ma, Y., Xu, L., Cheng, Z. J., Li, B., Zhang, X., Jiang, W., Sun, J., Sun, B., & Hao, C. (2022). The molecular mechanism of SARS-CoV-2 evading host antiviral innate immunity. *Virology Journal*, 19(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s12985-022-01783-5>

- 7 Gusev, E., Sarapultsev, A., Solomatina, L., & Chereshev, V. (2022). SARS-CoV-2-specific immune response and the pathogenesis of COVID-19. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(3), 1716. <https://doi.org/10.3390/ijms23031716>
- 8 Patel, R., Kaki, M., Potluri, V. S., Kahar, P., & Khanna, D. (2022). A comprehensive review of SARS-CoV-2 vaccines: Pfizer, Moderna & Johnson & Johnson. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, *18*(1), 2002083. <https://doi.org/10.1080/21645515.2021.2002083>
- 9 Săndulescu, O., Apostolescu, C. G., Preoteşcu, L. L., Streinu-Cercel, A., & Săndulescu, M. (2023). Therapeutic developments for SARS-CoV-2 infection—molecular mechanisms of action of antivirals and strategies for mitigating resistance in emerging variants in clinical practice. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1132501. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2023.1132501>
- 10 Sasidharan, S., Sarkar, N., & Saudagar, P. (2023). Discovery of compounds inhibiting SARS-COV-2 multi-targets. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *41*(6), 2602–2617. <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.2025149>
- 11 Silva 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). Long-COVID and post-COVID health complications: An up-to-date review on clinical conditions and their possible molecular mechanisms. *Viruses*, *13*(4), 4. <https://doi.org/10.3390/v13040700>
- 12 Letko, M., Marzi, A., & Munster, V. (2020). Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nature Microbiology*, *5*(4), 562–569. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0688-y>
- 13 Dai, L., & Gao, G. F. (2021). Viral targets for vaccines against COVID-19. *Nature Reviews Immunology*, *21*(2), 2. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00480-0>
- 14 Andries, O., Mc Cafferty, S., De Smedt, S. C., Weiss, R., Sanders, N. N., & Kitada, T. (2015). N(1)-methylpseudouridine-incorporated mRNA outperforms pseudouridine-incorporated mRNA by providing enhanced protein expression and reduced immunogenicity in mammalian cell lines and

mice. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 217, 337–344. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.08.051>

15 Nance, K. D., & Meier, J. L. (2021). Modifications in an emergency: The role of N1-methylpseudouridine in COVID-19 vaccines. *ACS Central Sciences*, 7(5), 748–756. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.1c00197>

16 Corbett, 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). SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness. *Nature*, 586(7830), 567–571. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2622-0>

17 Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K. S., Goldsmith, J. A., Hsieh, C.-L., Abiona, O., Graham, B. S., & McLellan, J. S. (2020). Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*, 367(6483), 1260–1263. <https://doi.org/10.1126/science.abb2507>

18 Olsen, J. V., Ong, S.-E., & Mann, M. (2004). Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 3(6), 608–614. <https://doi.org/10.1074/mcp.T400003-MCP200>

19 Cristoni, S., & Bernardi, L. R. (2004). Bioinformatics in mass spectrometry data analysis for proteomics studies. *Expert Review of Proteomics*, 1(4), 469–483. <https://doi.org/10.1586/14789450.1.4.469>

20 Cristoni, S., Bernardi, L. R., Biunno, I., Tubaro, M., & Guidugli, F. (2003). Surface-activated no-discharge atmospheric pressure chemical ionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 17(17), 1973–1981. <https://doi.org/10.1002/rcm.1141>

21 Lundgren, D. H., Hwang, S.-I., Wu, L., & Han, D. K. (2010). Role of spectral counting in quantitative proteomics. *Expert Review of Proteomics*, 7(1), 39–53. <https://doi.org/10.1586/epr.09.69>

- 22 Okada, 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). Early transmission patterns of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in travellers from Wuhan to Thailand, January 2020. *Eurosurveillance*, 25(8), 2000097. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.8.2000097>
- 23 Cognetti, J. S., & Miller, B. L. (2021). Monitoring serum spike protein with disposable photonic biosensors following SARS-CoV-2 vaccination. *Sensors*, 21(17), 17. <https://doi.org/10.3390/s21175857>
- 24 Castruita, J. A. S., Schneider, U. V., Mollerup, S., Leineweber, T. D., Weis, N., Bukh, J., Pedersen, M. S., & Westh, H. (2023). SARS-CoV-2 spike mRNA vaccine sequences circulate in blood up to 28 days after COVID-19 vaccination. *Apmis*, 131(3), 128–132. <https://doi.org/10.1111/apm.13294>
- 25 Tsafarova, B., Hodzhev, Y., Yordanov, G., Tolchkov, V., Kalfin, R., & Panaiotov, S. (2023). Morphology of blood microbiota in healthy individuals assessed by light and electron microscopy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 1091341. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2022.1091341>
- 26 Yishai Aviram, L., Magen, M., Chapman, S., Neufeld Cohen, A., Lazar, S., & Dagan, S. (2018). Dry Blood Spot sample collection for post-exposure monitoring of chemical warfare agents—in vivo determination of phosphonic acids using 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 Medical Advisory Secretariat. (2003). Neonatal screening of inborn errors of metabolism using tandem mass spectrometry: An evidence-based analysis. *Ontario Health Technology Assessment Series*, 3(3), 1–36.
- 28 Di Girolamo, F., Alessandrini, J., Somma, P., & Guadagni, F. (2010). Pre-analytical operating procedures for serum low molecular weight protein profiling. *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). Insights on the mutational landscape of the SARS-CoV-2 Omicron variant. *Cell Reports Medicine*, 3(2), 100527. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.1005279>

30 Cristoni, S., Dusi, G., Brambilla, P., Albin, 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: Optimization of a technology for compound identification based on the European Union directive with applications in forensic, pharmaceutical and food analyses. *Journal of Mass Spectrometry: JMS*, 52(1), 16–21. <https://doi.org/10.1002/jms.3895>

PDF herunterladen

ÜBER DIE WILEY ONLINE LIBRARY

[Datenschutzrichtlinie](#)
[Nutzungsbedingungen](#)
[Über Cookies](#)
[Cookies verwalten](#)
[Zugänglichkeit](#)
[Wiley Research DE&I Erklärung und Veröffentlichungsrichtlinien](#)
[Zugang für Entwicklungslander](#)

HILFE & SUPPORT

[Kontaktieren Sie uns](#)
[Schulung und Support](#)
[DMCA & Piraterie melden](#)

GELEGENHEITEN

[Abonnement-Agenten](#)
[Werbetreibende & Unternehmenspartner](#)

VERNETZEN SIE SICH MIT WILEY

[Das Wiley-Netzwerk](#)
[Wiley Presseraum](#)