

Articolo

Autoanticorpi contro recettori accoppiati alle proteine G e molecole correlate a RAS nella sindrome post-acuta da vaccinazione anti-covid. Uno studio retrospettivo di serie di casi

Mauro Mantovani ¹, Paolo Bellavite ^{2*}, Serafino Fazio ^{3*}, Giuseppe Di Fede ¹, Marco Tomasi ¹, Daniele Belli ¹ and Elisabetta Zanolin ⁴

¹ Istituto di Medicina Biologica, 20129 Milano, Italia

² Ricercatore indipendente, 37121 Verona, Italia

³ Scuola di Medicina, Università Federico II, 80100 Napoli, Italia

⁴ Unità di Epidemiologia & Statistica Medica, Dipartimento di Diagnostica e Sanità Pubblica, Università di Verona, 37134 Verona, Italia

* Corrispondenza: P.B.: paolo.bellavite@gmail.com; S.F.: fazio0502@gmail.com

Citazione: Mantovani, M.; Bellavite, P.; Fazio, S.; Di Fede, G.; Tomasi, M.; Belli, D.; Zanolin, E. Autoantibodies Targeting G-Protein-Coupled Receptors and RAS-Related Molecules in Post-Acute COVID Vaccination Syndrome: A Retrospective Case Series Study. *Biomedicines* 2024, 12, 2852. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12122852>

Academic Editor: Toshihiro Kita

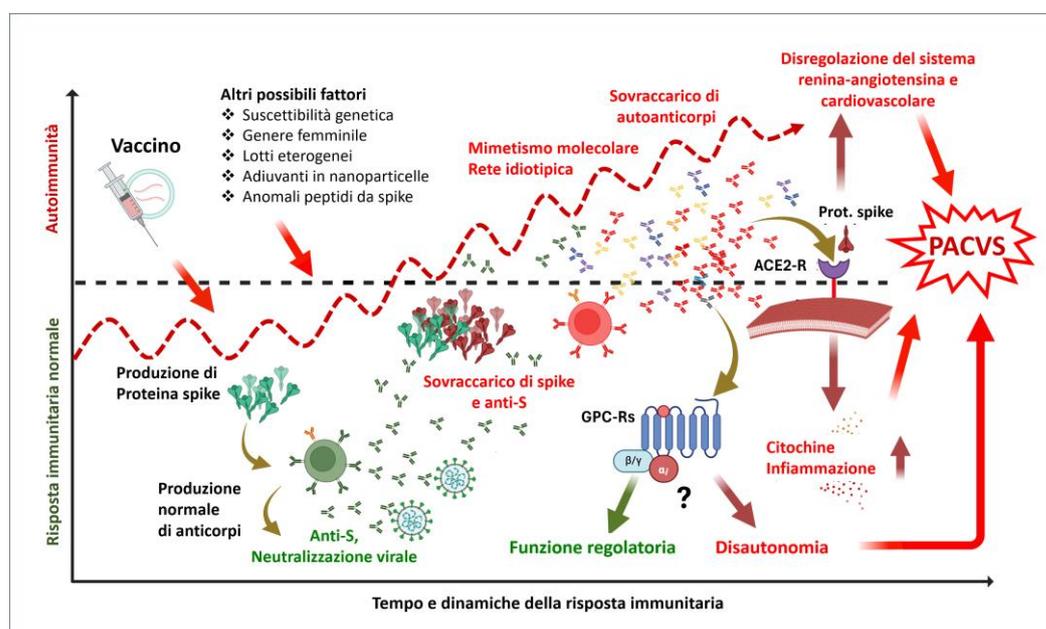
Received: 19 November 2024

Revised: 6 December 2024

Accepted: 13 December 2024

Published: 15 December 2024

Riassunto grafico



Riassunto: Contesto/obiettivi: Mentre la sindrome post-acuta da COVID-19 è ben nota e ampiamente studiata, la sindrome post-acuta da vaccinazione COVID (PACVS) è un'entità nosologica più recente che è scarsamente definita a livello immunopatologico, sebbene condivida molti sintomi con le sequele delle infezioni virali. **Metodi:** Questo studio retrospettivo monocentrico riporta una serie di casi di 17 soggetti vaccinati con vaccini a mRNA o a vettori adenovirali che erano sani prima della vaccinazione e non erano mai stati infettati da SARS-CoV-2, ma che presentavano sintomi simili alla PACVS per un tempo mediano di 20 mesi (min 4, max 32). Le cartelle cliniche di tutti i pazienti indirizzati al nostro ambulatorio in un periodo di un anno sono state analizzate retrospettivamente. **Risultati:** In questo gruppo, i test sierologici hanno mostrato che, oltre alla positività per gli anticorpi anti-proteina spike, un'alta percentuale di soggetti era positiva per gli



Copyright: © 2024 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

anticorpi contro i recettori accoppiati alle proteine G e le molecole coinvolte nella risposta al SARS-CoV-2. In un pannello di 16 autoanticorpi testati, alcuni erano positivamente associati ad alcuni dei sintomi riferiti dai pazienti: anti-ATR1 con linfadenopatia e/o tonsillite, anti-ACE2 con sintomi cutanei come ecchimosi, edema cutaneo e rash, anti-MAS1 con sensazione di bruciore diffuso e anti-STAB1 con edema cutaneo e rash. Gli anti-ADRA2A erano negativamente associati a perdita di memoria e/o annebbiamento mentale. ACE2 era correlato con i livelli sierici di anticorpi anti-S, supportando l'ipotesi di un meccanismo anti-idiotipo nell'immunopatogenesi della PACVS. **Conclusioni:** Questa analisi esplorativa suggerisce che i livelli di autoanticorpi diretti contro ACE2, e probabilmente anche MAS1 e STAB1, possono servire come biomarcatori per PACVS.

Parole-chiave: post-acute covid vaccination syndrome; PACVS; COVID-19 vaccine; adverse events; autoimmunity; autoantibodies; ACE2; G protein-coupled receptors; spike protein.

1. Introduzione

Il COVID-19 può portare a complicazioni che prolungano il decorso della malattia e ne rendono più difficile il trattamento (“covid lungo” o “sindrome post-acuta da COVID-19”, PACS), soprattutto in relazione alla gravità della malattia [1-4]. Queste complicazioni sono segnalate nel 10-20% dei pazienti [5, 6] e sono più comuni nei pazienti ospedalizzati [7]. La PACS si verifica anche in individui vaccinati a seguito di infezioni da sindrome respiratoria acuta grave coronavirus 2 (SARS-CoV-2) [8], sebbene con un'incidenza leggermente inferiore negli individui vaccinati rispetto a quelli non vaccinati (9,5% contro 14,2%) [9]. Sta diventando chiaro che anche le vaccinazioni contro SARS-CoV-2 possono essere seguite da una condizione patologica subacuta o cronica, la cosiddetta sindrome post-vaccinazione (PVS) [10], o sindrome post-vaccinazione COVID prolungata (LPCVS) [11-14], o infine sindrome post-acuta da vaccinazione anti-covid (PACVS) [13, 15, 16].

Questa condizione può essere associata a una varietà di sintomi che possono colpire tutto il corpo e persino la psiche: stanchezza cronica generale, dolori muscolari e articolari, dispnea, intorpidimento delle estremità, tachicardia ortostatica, ipertensione, insonnia, ansia, vertigini, disturbi neurologici e neuropsichiatrici. Alcuni di questi sintomi di disautonomia sono anche tipici della sindrome da tachicardia ortostatica posturale (POTS) e della sindrome da stanchezza cronica (CFS), entrambe le quali sono state suggerite come aventi un meccanismo autoimmune con il riscontro di vari autoanticorpi, inclusi quelli diretti contro vari tipi di recettori dell'acetilcolina, contro le proteine cardiache, i recettori β 1/2-adrenergici, i recettori muscarinici M2/3 [17]. La distinzione tra PACVS e PACS è anche difficile perché la maggior parte dei pazienti ha sia un'infezione virale che una vaccinazione nella propria storia clinica negli ultimi anni.

Molti segni e sintomi della PACVS, che caratterizzano un disturbo del sistema autonomo e delle risposte immunoendocrine alla vaccinazione, sono simili a quelli della PACS, suggerendo una patogenesi almeno parzialmente comune [13, 18, 19]. Anche i meccanismi autoimmuni sono stati coinvolti negli effetti avversi della vaccinazione [20-24], ma non è chiaro quale tipo di antigeni e anticorpi siano coinvolti. Il rischio di sviluppare una malattia epatica autoimmune [25] o una malattia renale [26] aumenta dopo la vaccinazione contro il COVID-19. Inoltre, il rischio di sviluppare il lupus eritematoso sistemico è 1,16 volte più alto negli individui vaccinati rispetto ai controlli e una vaccinazione di richiamo è stata associata a un aumento del rischio di alcune malattie autoimmuni tra cui alopecia areata, psoriasi e artrite reumatoide [27]. Sintomi neurologici come stato mentale alterato, disturbi del movimento e del linguaggio, convulsioni e disturbi comportamentali sono stati descritti come sequele di encefalite autoimmune, sia a seguito del COVID-19 che dei suoi vaccini [28]. Nell'ultima revisione della letteratura, sono state segnalate

sequele nel 36,7% dei casi associati al COVID-19 e nel 76,9% dei casi associati al vaccino. Sono stati segnalati anche sintomi infiammatori cutanei come sequele a lungo termine dei vaccini COVID-19 [29-33]. Si stima che la prevalenza di PACVS sia intorno allo 0,02% [15].

Sebbene i meccanismi possano differire significativamente a causa della complessa composizione delle nanoparticelle lipidiche o dei vaccini adenovirali, il principale responsabile nel determinare gli eventi avversi è la proteina spike, che in qualche modo simula l'azione patogena del virus e innesca risposte immunitarie disregolate, probabilmente con un meccanismo di mimetismo molecolare [23, 24, 34-39]. Sia il SARS-CoV-2 che la proteina spike sintetizzata dai vaccini condividono una notevole omologia con proteine o peptidi umani, con un evidente potenziale di indurre malattie autoimmuni [5, 40-43]. È inoltre importante ricordare il contributo delle nanoparticelle lipidiche (LNP) e di altri elementi caratterizzanti questi vaccini, come il polietilenglicole, i lipidi cationici (rispettivamente ALC 0315 e SM-102 per Comirnaty di Pfizer/Biontech e per mRNA 1273 di Moderna), i fosfolipidi e il colesterolo, che possono agire come adiuvanti e quindi promuovere reazioni autoimmuni. Le molecole ALC-0315, una volta penetrate e rilasciate nel citosol, dopo lo smontaggio dell'involucro LNP, stimolano la secrezione di citochine proinfiammatorie (come IL-1 beta e IL-8) e specie reattive dell'ossigeno, che a loro volta possono anche avere effetti genotossici [44, 45].

Lo scopo di questo studio è presentare le storie cliniche di 17 pazienti che avevano ricevuto una o più dosi di vaccino, non avevano una storia precedente di infezione da SARS-CoV-2 e avevano sviluppato sintomi compatibili con PACVS dopo la vaccinazione. Le indagini diagnostiche includevano analisi anticorpali specializzate, che non vengono comunemente eseguite per questo tipo di patologia. Dopo aver segnalato l'interessante caso di un paziente con trombosi post-vaccinazione e anomalie maggiori nella struttura degli autoanticorpi [46], è stata eseguita un'analisi retrospettiva di altri casi successivi. Data la piccola dimensione del campione, le analisi statistiche presentate sono essenzialmente descrittive. D'altra parte, si tratta di casi di sindrome post-vaccinazione in pazienti che non sembrano aver avuto COVID-19 e che sono negativi per anticorpi anti-nucleocapside, raramente osservati nel nostro centro clinico, e per l'importanza dell'argomento, abbiamo deciso di comunicare in via preliminare i risultati di questo studio di caso.

2. Casi e Metodi

2.1. Coorte di Pazienti

Questo studio ha incluso tutti i pazienti consecutivi con sintomi compatibili con PACVS e/o probabile sindrome da disautonomia autoimmune verificatisi dopo la vaccinazione COVID-19 e che non erano stati precedentemente infettati da SARS-CoV-2, che hanno frequentato l'ambulatorio dell'Istituto Medico IMBIO di Milano (Via Giacinto Galina, 10, 20129 Milano, +39 02 5830 0445, info@imbio.it). Questo ambulatorio dispone anche di un laboratorio di analisi cliniche e di un centro di campionamento specialistico (vedi Analisi di Laboratorio).

Si tratta di uno studio osservazionale retrospettivo, su un campione di convenienza costituito da tutti i pazienti con le caratteristiche di cui sopra, che sono stati esaminati nel 2023. I pazienti avevano ricevuto da una a tre dosi dei vaccini Comirnaty di BioNTech/Pfizer (P) o Spikevax (mRNA-1273) di Moderna (M), o Vaxzevria di AstraZeneca (AZ). I pazienti sono stati diagnosticati e trattati in modo completamente indipendente dal progetto di raccolta dati. Nessuno di loro aveva presentato sintomi correlati al COVID 19, né erano positivi al tampone antigenico o molecolare per l'infezione da SARS-CoV-2 e hanno dichiarato di non aver mai sofferto in precedenza dei sintomi presentati, che si sono verificati giorni o settimane dopo la vaccinazione anti-COVID-19 (vedere Risultati). Tutti i soggetti della nostra serie di casi avevano ricevuto da 1 a 3 dosi di vaccini anti-COVID 19, sia basati su vettori adenovirali che su mRNA. I pazienti sono stati visitati regolarmente

presso l'ambulatorio medico, dove è stata compilata una storia medica dettagliata per ciascun paziente. Le cartelle cliniche dei pazienti idonei sono state riviste per estrarre retrospettivamente dati clinici e di laboratorio rilevanti, che sono stati codificati e inviati in forma anonima al Dipartimento di Diagnostica e Sanità Pubblica dell'Università di Verona, Unità di Epidemiologia e Statistica Medica, per l'analisi statistica. Il ricercatore principale (A.M.) e il team di ricerca dello studio hanno garantito la riservatezza dei partecipanti. I dati sensibili dei soggetti reclutati sono stati trattati in conformità al Regolamento UE 2016/679 (GDPR) e al Decreto Legislativo 30/6/2003, n. 196 (Codice in materia di protezione dei dati personali). In tutte le fasi dello studio, solo i ricercatori direttamente coinvolti nell'analisi hanno avuto accesso ai dati, che sono stati archiviati elettronicamente su un computer con accesso crittografato. Tutti i pazienti hanno dato il consenso scritto all'uso di dati anonimi per scopi di studio. Lo studio è stato condotto in conformità ai principi della Dichiarazione di Helsinki del 1964 (e successive modifiche) ed è stato approvato dall'IMBIO Institutional Review Board. Inoltre, questo studio ha seguito le linee guida Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE).

2.2. Analisi di Laboratorio

Durante le attività diagnostiche sono stati misurati gli autoanticorpi associati alle classiche malattie autoimmuni (ANA: antinucleari; ENA: antinucleari estraibili; ANCA: anti-citoplasma dei neutrofili; APCA: anti-cellula parietale; ASMA: anti-muscolo liscio; CMA: anti-muscolo cardiaco) utilizzando kit commerciali secondo le istruzioni del produttore (Inova Diagnostics, San Diego, CA, USA). ANA, ANCA, APCA e ASMA sierici sono stati misurati con il metodo del test IF (immunofluorescenza indiretta) utilizzando l'analizzatore QUANTALYZER 3000 WERFEN. ENA e CMA sono stati misurati con il metodo della chemiluminescenza utilizzando l'analizzatore BIOFLASH WERFEN (per ENA) e con BIOFLASH (CMA) (Instrumentation Laboratory S.p.A. – Werfen - Milano MI – Italia). Interleuchina-1 beta (IL-1 β) e Interleuchina-8 (IL-8), raccolte dalla saliva secondo le linee guida standard [47], sono state misurate con un kit ELISA commerciale di IBL International GmbH (Flughafenstrasse 52a D-22335 Amburgo, Germania). La quantificazione dell'angiotensina 1-7 (Ang1-7) nel siero è stata eseguita con ELISA a inibizione competitiva utilizzando un kit commerciale commercializzato e prodotto da Cloud-Clone Corp. (23603 W. Fernhurst Unit 2201, Katy, TX 77494). Per misurare gli anticorpi totali contro il nucleocapside IgG e IgM SARS-CoV2 (AN-TI-N) e le IgG contro la proteina spike S-RBD (ANTI-S) SARS-CoV-2, viene utilizzato il metodo della chemiluminescenza utilizzando l'analizzatore COBAS 602 (per ANTI-N) prodotto da ROCHE (Roche Diagnostics (Schweiz) AG - Forrenstrasse 2, 6343 Rotkreuz, Svizzera) e MAGLUMI 4000 Plus (per ANTI-S) prodotto da SNIBE (Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., Ltd. Guangdong Province, Shenzhen, Nanshan, 518057 - Cina) [48]. I valori di cut-off per anti-S e anti-N erano rispettivamente 4,3 unità anticorpali leganti (BAU)/ml e 1,1 BAU/ml. Un campione uguale o superiore al valore limite è stato interpretato come positivo e un campione che mostrava un valore inferiore al valore limite è stato interpretato come negativo.

Inoltre, è stato utilizzato un pannello commerciale di 16 anticorpi, tra cui una serie di 14 anticorpi contro i recettori GPCR (ATR1: recettore dell'angiotensina II di tipo 1; ETAR: recettore dell'endotelina A; ADRA1A: recettore adrenergico alfa-1A; ADRA2A: recettore adrenergico alfa-2A; ADRB1: recettore adrenergico beta-1; ADRB2: recettore adrenergico beta-2; CHRM1 a CHRM5: recettori colinergici muscarinici da 1 a 5; MAS1: recettore per l'angiotensina-(1-7); PAR1: recettore attivato dalla proteasi-1, recettore della trombina; CXCR3: recettore della chemioquina CXCR3) e contro altri due recettori correlati al sistema renina-angiotensina (RAS) e potenzialmente coinvolti nelle risposte al COVID-19 e al vaccino (ACE2: enzima 2 di conversione dell'angiotensina recettore, il recettore della spike del coronavirus; STAB1: stabilina-1, recettore scavenger multifunzionale) [49]. Il pannello di 16 anticorpi è stato testato da siero congelato utilizzando kit ELISA commerciali dal Prof. Dr. Kai Schulze-Forster e dal Dr. Harald Heidecke presso CellTrend GmbH – ImBio technolo-giepark, Luckenwalde - secondo le istruzioni del produttore

(<https://www.celltrend.de/>). In breve, campioni duplicati di una diluizione del siero 1:100 sono stati incubati per 2 ore a 4° C. I kit ELISA sono stati convalidati secondo la Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation della Food and Drug Administration. Le concentrazioni di autoanticorpi sono state calcolate come unità arbitrarie (U) tramite estrapolazione da una curva standard di cinque standard che vanno da 2,5 a 40 U/ml. La positività del test anticorpale è stata stabilita utilizzando un valore di cut-off determinato su 77 soggetti sani abbinati per sesso ed età nello stesso laboratorio precedentemente descritto [50].

2.3. Statistiche

I dati continui sono stati descritti da media e deviazioni standard (DS) o mediana e intervallo se non distribuiti normalmente. La normalità è stata valutata utilizzando il test di Shapiro-Wilk. Le variabili qualitative sono state riassunte utilizzando conteggi e percentuali. Poiché la maggior parte degli autoanticorpi non era distribuita normalmente, la correlazione tra loro è stata calcolata tramite rho di Spearman: valori di rho tra 0-0,25 sono considerati da assente a bassa associazione, 0,25-0,50 discreta, 0,50-0,75 da moderata a buona, 0,75-1 da molto buona a eccellente [51].

L'associazione tra i livelli delle variabili di laboratorio (codificate come variabili binarie: positivo/negativo) e la presenza/assenza di ciascun sintomo è stata analizzata utilizzando il test esatto di Fisher. Il test di Fisher non parametrico è utilizzato nell'analisi delle tabelle di contingenza quando le dimensioni del campione sono piccole. L'associazione tra le variabili di laboratorio e la presenza/assenza di ciascun sintomo è stata analizzata anche tramite il test di Mann-Whitney, utilizzando i dati di laboratorio come valori continui.

Sono stati scelti tre anticorpi rappresentativi per indagare se i sintomi fossero più diffusi nei soggetti con sieri autoanticorpi-positivi rispetto a quelli negativi, o viceversa. È stato costruito un modello di regressione logistica multilivello a effetto misto, con qualsiasi presenza di sintomi come variabile dipendente e la positività/negatività di ciascuno degli anticorpi scelti come variabili indipendenti; un'intercetta casuale è stata inclusa nel modello per tenere conto della probabilità specifica del paziente di sviluppare sintomi.

Il livello di significatività statistica è stato impostato a $p < 0,05$. Le analisi sono state eseguite utilizzando Stata18.0 (www.stata.com).

3. Risultati

3.1. Caratteristiche dei Pazienti e Sintomi

Analizzando i dati di tutti i pazienti che soddisfacevano i criteri indicati nei Metodi, sono stati inclusi 17 adulti provenienti da tutta Italia, diagnosticati e trattati presso IMBIO tra il 2022 e il 2023. Nella Tabella 1 sono riportati i dati principali dei casi raccolti.

I pazienti erano 13 donne e 4 uomini con un'età media di 44 anni (min 36, max 54) che avevano ricevuto diverse dosi (min 1, max 3) di vaccinazioni mRNA ($n = 15$) o vettore adenovirale ($n = 2$) tra aprile 2021 e febbraio 2022. Tutti i pazienti hanno riferito che i sintomi si erano manifestati dopo le vaccinazioni e che non avevano sofferto in precedenza di malattie simili. L'insorgenza dei sintomi si è verificata pochi giorni o al massimo poche settimane dopo la vaccinazione (mediana 10 giorni, minimo 1 giorno, massimo 90 giorni). 12 pazienti hanno riferito l'insorgenza dei sintomi dopo la prima dose, 4 dopo la seconda dose e uno dopo la terza dose. 14 pazienti su 17 hanno dichiarato di essere in buona salute prima della vaccinazione, mentre tre hanno dichiarato di aver sofferto in precedenza di celiachia (paziente n. 4) o febbre da virus West Nile (paziente n. 12), o endometriosi (paziente n. 15). I pazienti da noi valutati e presi in considerazione nel nostro studio non presentavano patologie o sindromi associate al metabolismo (diabete di tipo 2 e/o epatopatia clinicamente diagnosticata o fegato grasso) e non presentavano patologie associate

a infezioni e/o riattivazioni da citomegalovirus (CMV) o papillomavirus umano. Alcuni presentavano IgG circolanti correlate al CMV ma non come segno di patologia. Le IgG rappresentano un segnale di infezione precedente ma non necessariamente di particolari condizioni cliniche correlate all'infezione stessa.

Tabella 1. Caratteristiche dei pazienti. Sono sottolineati in grassetto i valori superiori alla soglia normale, che è indicata vicino al nome dell'anticorpo in cima a ogni colonna.

Codice Paziente	Età	Genere	Dosi e tipo di vaccino*	Data dell'ultima vaccinazione	Inizio dei sintomi (giorni dopo vacc.)	Inizio dei sintomi (dopo dose n.)	Intervallo (mesi)**	Anti-S (4.3 BAU)	Anti-N (1.1 BAU)	IL-1b (143 ng/ml)	IL-8 (110 ng/ml)	ANG1,7 (226 ng/ml)
1	48	M	2 P	Jan-22	14	1	18	40,000	0.74	46.4	146.6	nd
2	49	M	1 P	Jan-22	90	1	16	32.62	0.12	323.1	81	239
3	44	F	1 P	Nov-21	14	1	19	27	1	234.7	152.6	210
4	45	F	3 P	Dec-21	1	2	19	1,764	0.43	272.2	84	332.9
5	53	M	3 P	Feb-22	1	1	15	873	0.07	557.2	228.4	nd
6	37	F	3 P	Jan-22	15	3	14	446	0.67	364.8	66.8	229.4
7	40	M	2 P, 1 M	Dec-21	10	2	16	115	0.08	46.4	146.6	279.8
8	38	F	1 P	Jun-21	7	1	24	434	0.05	318.3	79.8	310.2
9	46	F	2 P	Dec-21	20	1	20	8.24	0.92	158.9	49	217.4
10	37	F	1 AZ	Dec-21	7	1	20	147	0.58	164	49	167
11	50	F	2 P	Dec-21	10	1	21	103	0.1	216.9	200	292.2
12	42	F	2 P, 1 M	Feb-22	7	1	18	220.2	0.09	51.6	1,402	214.9
13	51	F	2 P, 1 M	Feb-22	10	2	21	297	0.03	1052	200	360.4
14	36	F	1 AZ	Lug-21	7	1	27	400	0.88	574.1	144.5	155.3
15	54	F	3 P	Jan-22	10	2	21	3,732	0.34	364.4	283	374.3
16	41	F	1 P	Apr-21	1	1	32	758	0.94	30	303.2	365.7
17	38	F	1 P	Feb-22	10	1	22	1,834	0.45	595.9	488	387.5
Mean	44.1				13.8	1.4	20.2	3,011.2	0.4	315.9	241.4	275.7
SD	6.0				20.3	0.6	4.5	9,579.7	0.4	263.7	319.5	77.2
Median	44				10	1	20	400	0.43	272.2	146.6	279.8
Min	36				1	1	14	8.24	0.03	30	49	155.3
Max	54				90	3	32	40,000	1	1,052	1,402	387.5

* P: Comirnaty/BioNTech/Pfizer, M: Spikevax (mRNA-1273)/Moderna, AZ: Vaxzevria/AstraZeneca.

** Intervallo di tempo dalla data dell'ultima vaccinazione alla data del test sierologico. BAU: binding antibody units; ANG1,7: Angiotensin 1-7.

L'intervallo medio tra l'ultima vaccinazione e l'esecuzione del test autoanticorpale è stato di 20,1 mesi \pm 4,5 (min 14, max 32). La tabella 2 mostra i sintomi estratti dalla cartella clinica di ciascun paziente, dalla frequenza più alta (sinistra) a quella più bassa.

I pazienti hanno riportato un minimo di 4 (paziente n. 8) e un massimo di 15 (paziente n. 5) sintomi, con una media di $9,1 \pm 3,5$ (DS) sintomi per paziente. I sintomi più comuni erano astenia, problemi di memoria o concentrazione e mal di testa, alterazioni funzionali del sistema cardiovascolare come tachicardia e ipertensione, altri sintomi neurologici come nevralgia, parestesia, fascicolazioni, diffuse sensazioni di bruciore, svenimento o vertigini e disturbi della vista. Alterazioni cutanee, come edema, rash, lividi, sono state

riportate in circa un terzo dei pazienti. Va notato che i sintomi riportati erano gravi e persistenti o ricorrenti per mesi o anni.

Per quanto riguarda i due pazienti con tumori (n. 2 e 15), va notato che il paziente n. 2 è un uomo di 49 anni che, dopo la prima e unica dose del vaccino, ha scoperto linfonodi sottomandibolari gonfi e dolenti. La biopsia e l'aspirazione con ago sottile sono state eseguite 3 mesi dopo e gli è stato diagnosticato un linfoma non-Hodgkin. Non aveva una storia familiare ed era sempre stato in ottima salute. La paziente n. 15 è una donna di 54 anni che ha sviluppato sintomi di stanchezza cronica e positività all'EBV subito dopo la seconda dose, poi è peggiorata dopo la terza dose del vaccino con l'insorgenza di sintomi neurologici ed è stata infine diagnosticata con linfoma cerebrale a grandi cellule B. Non aveva una storia familiare di tumori del sangue ed era in buona salute prima della vaccinazione, fatta eccezione per l'endometriosi.

Tabella 2. Sintomi riferiti da ciascun paziente, totale e percentuale di pazienti con sintomi nell'intera serie di casi.

Sintomi (in ordine di frequenza)	Paziente n.																	Totale paz. con sintomo
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
Astenia, stanchezza cronica	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	16
Perdita memoria, nebbia mentale	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+		+	+	+	+	15
Nevralgie, parestesie, disestesie	+	+	+	+		+	+		+		+	+	+	+	+	+	+	14
Tachicardia a riposo o ortostatica	+		+	+	+	+	+		+	+		+		+	+	+	+	13
Dolori osteoarticolari e muscolari		+		+	+	+	+	+		+		+	+	+	+		+	12
Brucciori diffusi	+			+	+	+	+	+		+		+	+	+	+	+	+	12
Ipertensione				+		+	+		+	+		+		+	+	+	+	10
Cefalea ricorrente	+			+		+	+		+	+	+	+				+	+	10
Edemi cutanei o ecchimosi		+		+		+					+	+		+	+	+		8
Svenimenti o vertigini			+			+			+	+		+		+	+		+	8
Gastrite o enterite o disbiosi	+			+		+	+			+		+		+			+	8
Ecchimosi		+		+		+					+	+		+				6
Fascicolazioni	+					+	+					+		+				5
Edemi cutanei, "sfoghi" cutanei				+		+					+				+	+		5
Dismenorrea/ amenorrea									+		+		+		+		+	5
Trombosi, Embolia		+		+						+							+	4
Abbassamento della vista						+				+						+	+	4
Linfoadenopatia o tonsillite	+	+												+	+			4
Acufeni						+						+						2
Tumori (Non-H linfoma e B-c-linfoma)		+														+		2

3.2. Autoanticorpi

La tabella 3 mostra i livelli di una gamma di autoanticorpi in ciascun paziente.

Gli anticorpi più frequentemente alterati nella maggior parte dei pazienti erano quelli contro MAS1, ACE2, CHRM4, ADRA1A e ADRB2, presenti rispettivamente in 16 (94,1%), 11 (64,7%), 10 (58,8%), 9 (52,9%) e 9 (52,9%) pazienti. Altri anticorpi comunemente alterati erano ADRB1, CHRM3 e PAR1, che erano presenti ad alti livelli in 8 su 17 pazienti (47,1%). Gli anticorpi antinucleari (ANA), gli anticorpi antinucleari estraibili (ENA), gli anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili (ANCA), gli anticorpi anti-cellule parietali (APCA), gli anticorpi anti-muscolo liscio (ASMA) e gli anticorpi anti-muscolo cardiaco (CMA) erano negativi in tutti i casi testati (n= 15, dati mancanti per i casi n. 1 e 5).

Tabella 3. Risultati del pannello di autoanticorpi utilizzato nei test sierologici della serie di casi. Sono sottolineati in grassetto i valori superiori alla soglia normale, che è indicata vicino al nome dell'anticorpo in cima a ogni colonna.

Codice Paziente	ATR1 (17 U/ml)	ETAR (17 U/ml)	ADRA1A (11 U/ml)	ADRA2A (15 U/ml)	ADRB1 (15 U/ml)	ADRB2 (14 U/ml)	CHRM1 (9 U/ml)	CHRM2 (9 U/ml)	CHRM3 (10 U/ml)	CHRM4 (10.7 U/ml)	CHRM5 (14.2 U/ml)	ACE2 (9.8 U/ml)	MAS1 (25 U/ml)	PAR1 (4.2 U/ml)	CXCR3 (40 U/ml)	STAB1 (40 U/ml)	Totale positivi	% positivi
1	55.7	56.1	53.4	10.7	70.8	83.8	7.0	6.4	69.3	61.8	12.2	36.0	52.3	3.1	11.3	24.0	9	56.3
2	3.8	6.7	6.5	7.4	3.7	4.2	2.3	6.0	5.8	7.4	7.9	21.0	30.9	4.0	7.1	11.6	2	12.5
3	4.2	6.5	7.5	5.7	5.3	5.0	2.2	3.6	4.0	6.6	6.9	4.7	28.7	3.1	9.7	16.5	1	6.3
4	7.4	8.7	11.2	15.0	10.9	9.8	7.5	9.9	8.8	11.8	13.4	31.5	48.8	3.5	17.8	95.1	6	37.5
5	13.6	14.8	19.7	6.7	27.9	34.5	2.1	5.7	27.6	25.9	7.2	9.7	53.1	7.2	13.1	17.2	7	43.8
6	12.6	6.7	7.1	10.1	9.7	9.0	5.1	7.0	4.5	5.9	11.1	19.3	38.4	10.3	9.2	11.6	3	18.8
7	9.3	9.9	8.9	10.3	12.0	12.7	4.1	4.7	8.9	9.6	6.6	7.5	54.1	10.8	15.4	11.6	2	12.5
8	7.0	8.2	10.6	8.6	11.0	11.6	3.8	6.0	7.5	9.5	9.0	8.2	48.0	4.7	21.5	15.6	2	12.5
9	8.7	15.6	6.4	15.1	21.1	18.2	8.2	8.3	15.2	15.4	15.8	6.8	47.0	3.2	20.1	17.0	7	43.8
10	14.9	28.9	15.2	15.3	30.0	38.1	5.4	9.5	21.1	27.9	15.9	24.7	65.7	3.8	83.6	33.4	12	75.0
11	13.0	15.8	22.8	26.6	26.1	27.2	9.8	36.2	19.4	35.1	19.6	32.3	11.0	55.8	128.7	125.9	13	81.3
12	9.8	10.1	9.4	12.1	14.0	15.8	3.8	6.0	8.9	14.5	11.3	20.3	42.2	1.5	13.5	24.8	4	25.0
13	13.1	15.1	12.5	18.4	26.1	29.1	6.6	11.6	12.7	13.8	13.5	8.4	51.5	5.6	15.4	22.2	9	56.3
14	17.3	21.3	18.8	17.3	32.7	46.2	10.2	13.9	19.0	19.7	10.1	17.4	75.3	3.8	15.4	32.6	12	75.0
15	7.6	7.8	11.5	11.0	9.7	6.1	4.0	4.6	4.3	10.5	7.1	36.4	38.2	2.2	8.1	10.5	3	18.8
16	11.5	12	11.2	12	19.2	33.2	9.4	11.8	12.6	18.5	12.6	35.7	51.8	6.4	42.3	45.7	12	75.0
17	8.1	10.4	6.4	10.9	12.1	11.7	3.8	10.2	7.1	8.7	24.7	15.6	44.6	5.6	10.0	12.1	5	31.3
Totale positivi	2	3	9	5	8	9	3	7	8	10	4	11	16	8	3	3		
% positivi	11.8	17.6	52.9	29.4	47.1	52.9	17.6	41.2	47.1	58.8	23.5	64.7	94.1	47.1	17.6	17.6		

Nella Tabella 3, alcuni anticorpi mostrano andamenti abbastanza simili tra i diversi pazienti: ad esempio, quelli contro ADRB1 e ADRB2 sono elevati sopra la soglia normale negli stessi pazienti tranne che in uno (paziente 12), CHRM3 e CHRM4 sono elevati negli stessi pazienti tranne che in 2 (n. 4 e 12), in cui solo quelli contro CHRM4 sono elevati). Abbiamo quindi indagato se ci fossero delle correlazioni tra i livelli di anticorpi nella nostra serie di casi (Tabella 4).

Il numero più elevato di correlazioni è stato trovato per ETAR (13 su 15), ADRB1 e ADRB2 (12 su 15), STAB1 e CHRM4 (11 su 15). Sono state trovate eccellenti correlazioni tra le risposte anticorpali per ADRB1/ADRB2 ($\rho=0,982$), CHRM3/CHRM4 ($\rho=0,927$), ETAR/ADRB1 ($\rho=0,968$), ETAR/ADRB2 ($\rho=0,936$), ADRB2/CHRM3 ($\rho=0,931$), ETAR/CHRM3 ($\rho=0,928$). D'altro canto, ACE2 era solo abbastanza correlato con ADRA1A ($\rho=0,485$) e PAR1 non era correlato con nessun altro anticorpo.

Tabella 4. Correlazioni (rho di Spearman) tra i livelli di diversi autoanticorpi. I valori statisticamente significativi ($p < 0,05$) sono sottolineati in grassetto.

	ATR1	ETAR	ADRA1A	ADRA2A	ADRB1	ADRB2	CHRM1	CHRM2	CHRM3	CHRM4	CHRM5	ACE2	MAS1	PAR1	CXCR3	STAB1
ATR1	1.000															
ETAR	<u>0.819</u>	1.000														
ADRA1A	<u>0.708</u>	<u>0.620</u>	1.000													
ADRA2A	0.449	<u>0.645</u>	0.360	1.000												
ADRB1	<u>0.890</u>	<u>0.968</u>	<u>0.689</u>	<u>0.536</u>	1.000											
ADRB2	<u>0.897</u>	<u>0.936</u>	<u>0.683</u>	<u>0.485</u>	<u>0.982</u>	1.000										
CHRM1	0.474	<u>0.602</u>	0.363	<u>0.791</u>	<u>0.501</u>	<u>0.514</u>	1.000									
CHRM2	0.445	<u>0.589</u>	0.261	<u>0.767</u>	<u>0.504</u>	<u>0.494</u>	<u>0.778</u>	1.000								
CHRM3	<u>0.818</u>	<u>0.928</u>	<u>0.691</u>	0.460	<u>0.943</u>	<u>0.931</u>	0.463	0.432	1.000							
CHRM4	<u>0.757</u>	<u>0.900</u>	<u>0.789</u>	<u>0.556</u>	<u>0.892</u>	<u>0.880</u>	<u>0.538</u>	0.430	<u>0.927</u>	1.000						
CHRM5	0.304	<u>0.575</u>	0.074	<u>0.689</u>	0.442	0.380	<u>0.521</u>	<u>0.794</u>	0.392	0.397	1.000					
ACE2	0.248	0.211	<u>0.485</u>	0.287	0.139	0.167	0.349	0.270	0.163	0.409	0.238	1.000				
MAS1	<u>0.608</u>	<u>0.584</u>	0.409	0.191	<u>0.656</u>	<u>0.728</u>	0.288	0.199	<u>0.624</u>	<u>0.483</u>	0.010	-0.059	1.000			
PAR1	0.198	0.052	0.049	-0.011	0.076	0.109	0.115	0.336	0.156	-0.030	0.108	-0.144	0.111	1.000		
CXCR3	0.300	<u>0.561</u>	0.341	<u>0.612</u>	<u>0.507</u>	<u>0.523</u>	<u>0.601</u>	<u>0.569</u>	<u>0.561</u>	<u>0.570</u>	<u>0.511</u>	0.012	0.366	0.272	1.000	
STAB1	0.474	<u>0.625</u>	<u>0.571</u>	<u>0.634</u>	<u>0.604</u>	<u>0.617</u>	<u>0.611</u>	<u>0.668</u>	<u>0.633</u>	<u>0.722</u>	<u>0.563</u>	0.329	0.285	0.003	<u>0.722</u>	1.000

3.3. Correlazioni coi sintomi

Per stabilire se un sintomo particolare fosse correlato a specifici autoanticorpi, abbiamo testato la possibile associazione tra gli anticorpi elencati nella Tabella 3 e la presenza/assenza di ciascun sintomo. Il test esatto di Fisher rileva la possibile presenza di una differenza statisticamente significativa nella percentuale di soggetti positivi per autoanticorpi tra quelli con e senza ciascun sintomo. Il test di Mann-Whitney è stato utilizzato per confrontare i valori mediani degli autoanticorpi nei due gruppi di soggetti con e senza ciascun sintomo. Quest'ultimo è indipendente dal valore di cut-off per la positività degli autoanticorpi.

I risultati statisticamente significativi del test esatto di Fisher e/o del test di Mann-Whitney sono mostrati nella Tabella 5.

Nella maggior parte dei confronti, non sono state trovate associazioni statisticamente significative tra sintomi e autoanticorpi. I 6 autoanticorpi mostrati nella Tabella 5, ovvero ATR1, PAR1, ADRA2A, ACE2, MAS1 e STAB1, erano correlati con alcuni sintomi secondo almeno uno dei due test.

Osservando il numero di casi positivi al test anticorpale, ovvero quelli che avevano dosi di anticorpi superiori alla soglia patologica, osserviamo che ATR1 è positivo in 2 pazienti (pazienti n. 1 e n. 14 nella Tabella 3) ed entrambi presentavano sintomi di linfadenopatia e/o tonsillite, mentre nessuno dei pazienti negativi per ATR1 li presentava (test esatto di Fisher: $p=0,007$). La differenza è statisticamente significativa con il test di Fisher ma non con il test di Mann-Whitney, probabilmente perché la dimensione del campione è piccola e il test è quindi sottodimensionato. L'anticorpo anti-PAR1 è risultato positivo in 8 pazienti, nessuno dei quali presentava il sintomo di linfadenopatia e/o tonsillite, ma era presente in 8 pazienti su 13 senza il sintomo (61,5%), suggerendo che in questo caso

l'anticorpo è significativamente associato all'assenza del sintomo (test esatto di Fisher: $p=0,031$).

Tabella 5. Associazioni statisticamente significative tra sintomi e anticorpi specifici in base alla positività degli autoanticorpi (variabile binaria, test esatto di Fisher) e al livello sierico (variabile continua, test di Mann-Whitney).

Anticorpo	Presenza di sintomi		Positività anticorpale			Anticorpi nel siero (U/ml)			
	Tipo di sintomo (Si/No)	N	-	+ (%)	p*	Mediana	Intervallo Interquartile	p**	
ATR1	Linfoadenopatia o tonsillite	No	13	13	0	0.007	9.8	8.1-13.0	0.784
		Yes	4	2	2 (50)		12.5	5.7-36.5	
PAR1	Linfoadenopatia o tonsillite	No	13	5	8 (61.5)	0.031	5.6	3.5-7.2	0.13
		Yes	4	4	0 (100)		3.5	2.7-3.9	
ADRA2A	Perdita di memoria o nebbia mentale	No	2	0	2 (100)	0.074	22.5	18.4-26.6	0.015
		Yes	15	12	3 (20)		10.9	8.6-15.0	
ACE2	Ecchimosi	No	11	6	5 (45.4)	0.043	9.7	7.5-35.7	0.301
		Yes	6	0	6 (100)		20.7	19.3-31.5	
ACE2	Edemi o sfoghi cutanei	No	12	6	6 (50)	0.102	12.7	7.9-20.7	0.014
		Yes	5	0	5 (100)		32.3	31.5-35.7	
ACE2	Ecchimosi o edemi e sfoghi cutanei	No	9	6	3 (33.3)	0.009	8.4	7.5-15.6	0.015
		Yes	8	0	8 (100)		26.3	19.8-34.0	
MAS1	Sensazione di bruciori diffusi	No	5	1	4 (80)	0.294	30.9	28.7-44.6	0.009
		Yes	12	0	12 (100)		51.6	45.1-53.6	
STAB1	Edemi o sfoghi cutanei	No	12	12	0	0.015	17.1	13.9-24.4	0.501
		Yes	5	2	3 (60)		45.7	11.6-95.1	

* Fisher exact test; **Mann-Whitney test

Un caso speciale è il confronto tra anti-ADRA2A e perdita di memoria/nebbia mentale, un sintomo molto comune in questi pazienti (15 su 17): la mediana di quelli con il sintomo (10,9 U/ml) era significativamente diversa da quella di quelli senza (22,5 U/ml; test di Mann-Whitney: $p=0,015$). Il test esatto di Fisher ha prodotto un valore p di 0,074 (Tabella 5).

Considerando l'anticorpo anti-ACE2, è risultato positivo in tutti i 6 pazienti con il sintomo di lividi e solo in 5 su 11 (45,4%) di quelli senza il sintomo (test esatto di Fisher: $p=0,043$). Quando l'anti-ACE2 è stato confrontato con sintomi cutanei come edema cutaneo e/o rash, la mediana di quelli con sintomi (32,3 U/ml) era significativamente diversa dalla mediana di quelli senza sintomi (12,5 U/ml; test di Mann-Whitney $p=0,014$). Quando si confrontano l'anti-ACE2 e i sintomi cutanei come edema cutaneo e/o rash, la mediana dei soggetti con sintomi (32,3 U/ml) era significativamente diversa dalla mediana dei soggetti senza sintomi (12,5 U/ml; test di Mann-Whitney $p=0,014$). Inoltre, 5 pazienti hanno

questo sintomo e tutti sono positivi per ACE2; la positività si riscontra anche in 6 pazienti su 12 senza questo sintomo (50%): il test esatto di Fisher mostra solo una tendenza verso la significatività statistica ($p = 0,102$).

Dopo aver osservato questi risultati per l'anti-ACE2, abbiamo anche suddiviso i pazienti in base al criterio di avere lividi e/o edema cutaneo e/o rash (8 pazienti) o meno (9 pazienti). Come mostrato nella Tabella 5, tutti gli 8 pazienti con questi sintomi erano positivi per l'anticorpo anti-ACE2 e solo 3/9 (33,3%) di quelli senza sintomi erano positivi (test esatto di Fisher: $p = 0,009$). Inoltre, i livelli mediani di ACE2 di quelli con questi sintomi cutanei (26,3 U/ml) e di quelli senza sintomi (8,4 U/ml) erano significativamente diversi (test di Mann-Whitney: $p = 0,015$). È interessante notare i dati rilevati dagli anticorpi anti-MAS1, che sono sopra la soglia in tutti i pazienti tranne uno (Tabella 3); inoltre, la sensazione di bruciore diffuso, un sintomo grave e comune, è presente in 12 pazienti. La mediana degli autoanticorpi nei pazienti con questo sintomo era di 51,6 U/ml, mentre la mediana in quelli senza questo sintomo era di 30,9 U/ml, una differenza statisticamente significativa (test di Mann-Whitney: $p=0,009$). Il test esatto di Fisher non era significativo, probabilmente perché quasi tutti i pazienti erano positivi per l'anticorpo.

L'ultimo confronto che ha mostrato alcune differenze significative è stato quello di anti-STAB1 nei pazienti con il sintomo edema cutaneo e/o rash, che è risultato positivo in 3 pazienti su 5 con sintomi e negativo in tutti quelli senza. La positività agli anticorpi era presente solo in 3 pazienti (n. 4, 11 e 6, vedere Tabella 3) e tutti e 3 avevano il sintomo, mentre nessuno dei pazienti senza sintomi era positivo (test esatto di Fisher: $p=0,009$). Sebbene i valori mediani mostrassero una differenza (17,1 U/ml contro 45,7 U/ml, rispettivamente nei pazienti senza e con sintomi), il test di Mann-Whitney non era statisticamente significativo.

Volevamo anche indagare se la percentuale di pazienti con un sintomo specifico differisce tra pazienti Ab-positivi e Ab-negativi. La Figura 1 mostra tre anticorpi che rappresentano tre situazioni immunologicamente diverse. Osservando i sintomi dei pazienti positivi agli anticorpi anti-ACE2 rispetto a quelli negativi (pannello A), vediamo che i primi (barre arancioni) hanno una percentuale maggiore di casi sintomatici in 17 dei 19 sintomi considerati, a parte due (astenia e disturbi mestruali). Utilizzando il modello logistico multilivello a effetti misti, abbiamo trovato un Odds Ratio (OR) statisticamente significativo di 4,00 (C.I. 95%=1,88-8,51, $p<0,001$), indicando che i pazienti ACE2 ab-positivi hanno un rischio quadruplo di avere più sintomi rispetto a quelli ACE2 ab-negativi. Questa tendenza differisce per gli altri anticorpi, due dei quali sono mostrati negli altri pannelli della Figura 1.

I pazienti che erano positivi per anti-ADRA2A rispetto ai pazienti negativi (pannello B) avevano percentuali più elevate per 9 dei 19 sintomi considerati. Gli altri 10 sintomi, tra cui astenia e perdita di memoria (prime barre blu a sinistra nel pannello B), hanno una percentuale più alta di casi nei soggetti ab-negativi. In questo caso, non è stata riscontrata alcuna differenza statisticamente significativa tra pazienti ADRA2A ab-positivi e ab-negativi (OR=1,44, C.I. 95%=0,52-3,99, $p=0,479$).

Un altro caso interessante è quello dell'anticorpo anti-CHRM3 (pannello C): dei 19 sintomi considerati, 14 sono meno frequenti nei pazienti positivi a questo anticorpo rispetto a quelli negativi. È stato ottenuto un OR di 0,41 (C.I. 95%=0,16-1,04, $p=0,062$), che indica che i pazienti CHRM3 ab-positivi hanno un rischio meno che dimezzato di avere più sintomi rispetto a quelli CHRM3 ab-negativi. La differenza ha raggiunto solo una significatività statistica borderline in questo caso.

Abbiamo anche cercato un'eventuale associazione tra sintomi, autoanticorpi e variabili sieriche (Anti-S, IL-1b, IL-8, ANG1,7). Gli unici confronti che hanno prodotto risultati statisticamente significativi, oltre a quelli già riportati sopra, sono stati una maggiore quantità di anticorpi anti-S nei soggetti con il sintomo "sensazione di bruciore diffusa" rispetto a quelli senza (mediana 440 BAU/ml vs 32,62 BAU/ml rispettivamente, test di Mann-Whitney: $p=0,036$); un livello più elevato di IL-1b nei soggetti con "dolore osteoarticolare e/o muscolare" rispetto a quelli senza (mediana 347,8 ng/ml vs 158,9 ng/ml

rispettivamente, test di Mann-Whitney: $p=0,021$). Infine, è stata trovata una correlazione tra i livelli di anticorpi anti-S e di anticorpi anti-ACE2 (ρ di Spearman = 0,522, $p=0,032$).

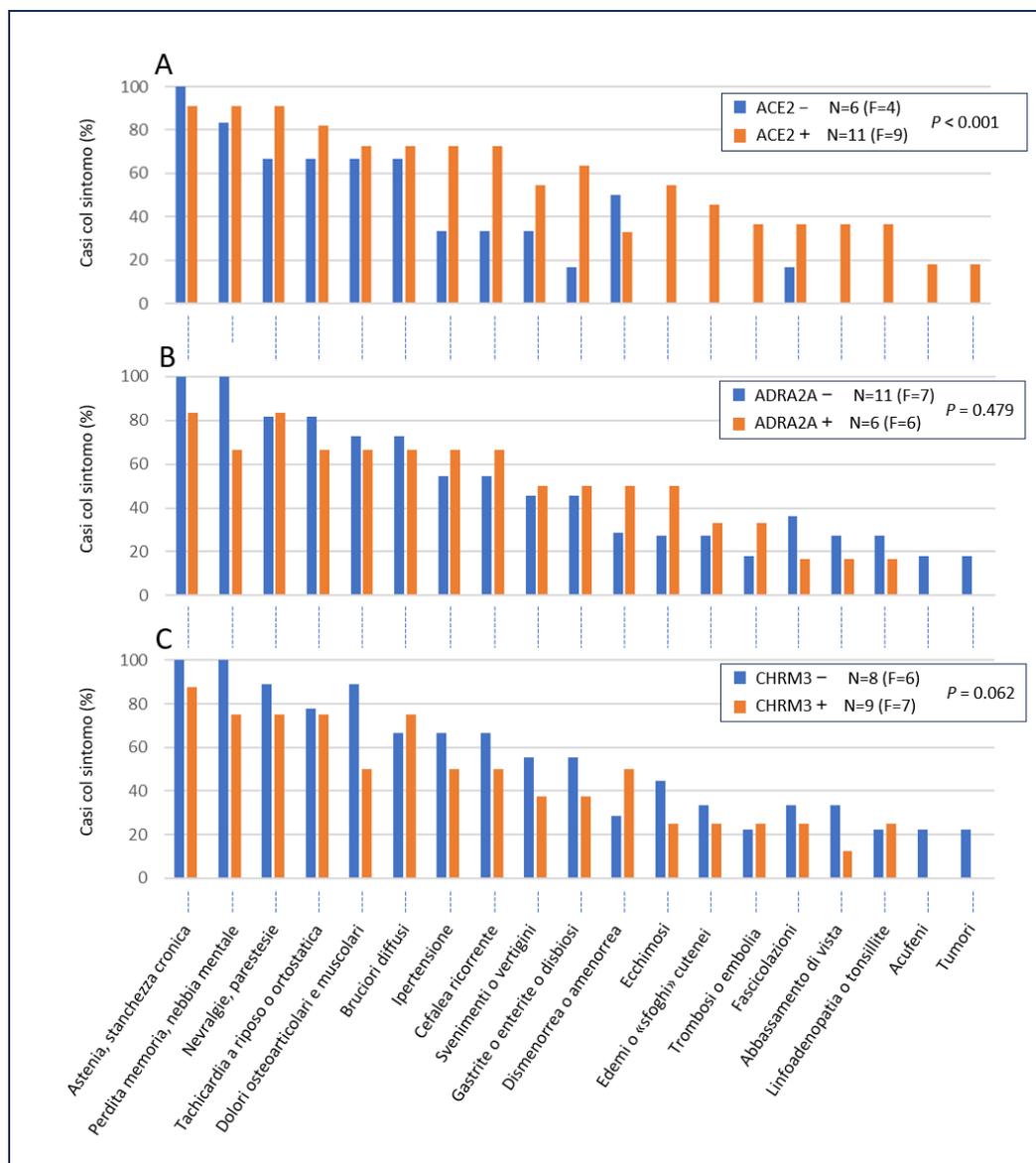


Figura 1. Presenza o assenza di sintomi in pazienti negativi o positivi per anticorpi anti-ACE2 (pannello A), an-ti-ADRA2A (pannello B) e anti-CHRM3 (pannello C). F è il numero di pazienti di sesso femminile che sono negative o positive per gli anticorpi indicati.

4. Discussione

Sebbene la vaccinazione contro il COVID-19 sia efficace nel proteggere dalla malattia e in particolare dalle sue conseguenze più gravi, la sua potenza biologica si riflette anche nel verificarsi di effetti avversi immediati e a lungo termine in alcuni individui. Senza considerare le reazioni nel sito di vaccinazione, le reazioni avverse sistemiche possono essere interpretate nel contesto di reazioni allergiche (ad esempio anafilassi) o reazioni iperinflammatorie (ad esempio ipertermia), disturbi trombotici o coagulopatie e disautonomia autoimmune. Recentemente, sono stati descritti fenomeni autoimmuni di nuova insorgenza a seguito della vaccinazione contro il COVID-19 [36], come la sindrome da trombocitopenia trombotica immune (VITT) indotta dal vaccino [35, 52-54], malattie neurologiche autoimmuni [18, 55, 56], miocardite e pericardite [57], vasculite cutanea o

sistemica [29, 30] e/o dermatomiosite [31-33]. Mentre è ormai noto che nel caso della VITT la patologia è associata alla produzione di anticorpi che riconoscono il fattore piastrinico 4 (PF4) [58], in altre malattie il meccanismo molecolare o patofisiologico delle sequele post-acute della vaccinazione rimane sconosciuto.

Gli eventi avversi post-vaccinazione possono manifestarsi anche in forma subacuta o cronica, come patologie ben definite e facilmente diagnosticabili (ad esempio miocardite, pericardite, sindrome di Guillain-Barré), ma anche sotto forma di sindromi disautonomiche dolorose e sistemiche che non corrispondono a patologie ben definite o che condividono diversi sintomi di patologie già note ma con una patogenesi oscura, come la fibromialgia o la sindrome da stanchezza cronica. Finora non esiste una definizione chiara di questa sindrome, anche se alcuni autori hanno iniziato a utilizzare l'acronimo Post Acute Covid Vaccination Syndrome (PACVS) [15] o Long Post-COVID Vaccination Syndrome (LPCVS) [14]. In questo studio abbiamo utilizzato il termine PACVS, che è il più recente e sembra interessante perché richiama la distinzione lessicale rispetto al PACS che si verifica dopo l'infezione con il virus SARS-CoV-2 non completamente guarita. Qui presentiamo dati raccolti nella nostra pratica medica in un periodo di due anni, inclusi casi mai infettati da SARS-CoV-2, ovvero casi in cui possiamo supporre che i sintomi siano dovuti al vaccino e non ad altre cause come l'infezione virale.

Per quanto ne sappiamo, questo è il primo studio in cui è stata osservata un'elevata prevalenza di autoanticorpi contro numerosi antigeni coinvolti nella regolazione del sistema nervoso autonomo e del sistema renina-angiotensina nel PACVS. La sindrome che colpisce i pazienti della nostra serie non è dovuta ad un'autoimmunità del tipo già noto, tanto che gli autoanticorpi classici (ANA, ENA, ANCA: anti-citoplasma neutrofilo; APCA: anti-cellula parietale; ASMA: anti-muscolo liscio; CMA: anti-muscolo cardiaco) sono tutti negativi nei 15 pazienti per i quali avevamo a disposizione i test. In un recente lavoro [59] è stato riscontrato che negli operatori sanitari solo l'11% dei soggetti aveva almeno una positività in un ampio pannello di autoanticorpi dopo vaccinazione anti-COVID-19, ma quelli qui descritti non sono stati valutati. Nell'ambito delle indagini diagnostiche abbiamo introdotto la misurazione di un pannello di anticorpi contro i recettori GPCR e altre 2 molecole potenzialmente coinvolte nelle reazioni al COVID-19 e ai vaccini: ACE2 e STAB1. Da questo punto di vista, il nostro studio ha rivelato un ulteriore modo di discriminare i casi, utilizzando il dosaggio di autoanticorpi del tipo da noi identificato come più importante e correlato alla sindrome sintomatica.

Nonostante il numero oggettivamente limitato di casi, abbiamo deciso di presentarli e di effettuare alcune elaborazioni statistiche per due motivi: in primo luogo perché il nostro è un centro medico relativamente piccolo e non riceve molti casi con queste caratteristiche; in secondo luogo perché i casi di pazienti vaccinati che non avevano anche la malattia, magari in forma lieve, stanno diventando sempre più rari e quindi aumentare la dimensione del campione avrebbe richiesto molto più tempo. Riteniamo che il risultato dello studio, ovvero l'elevata prevalenza di autoanticorpi insoliti e raramente rilevati, sia nuovo e meritevole di essere riportato. Questo lavoro su 17 casi segue una comunicazione di case report del nostro stesso gruppo [46] in cui lo studio immunologico è stato eseguito grazie al pannello di 16 anticorpi qui utilizzato, che è servito anche a guidare la terapia e il follow-up del paziente.

Uno degli aspetti più oscuri di questo tipo di reazione post-vaccinazione, che persiste nel tempo, è la mancanza di conoscenza sulla sua patogenesi, che a sua volta rende difficile l'approccio terapeutico. Infatti, tutti i pazienti che si sono rivolti al nostro centro medico erano stati visitati da altri medici che non avevano riscontrato alcun beneficio terapeutico in nessuno dei farmaci somministrati (ad esempio antistaminici, corticosteroidi, farmaci antinfiammatori non steroidei). Inoltre, poiché molti dei sintomi lamentati dai pazienti sono di natura psicologica ed emotiva, è possibile che in alcuni casi le sindromi croniche post-vaccinazione, se non ben indagate nel processo diagnostico con opportune analisi strumentali, possano essere di origine psicologica piuttosto che organica. Da questo punto di vista, la positività agli autoanticorpi qui descritti e statisticamente associata

alla malattia sarebbe di notevole aiuto per la valutazione della causalità delle reazioni avverse conseguenti all'immunizzazione con vaccini anti-COVID. Nella nostra serie di casi vengono rispettati i principali criteri di causalità stabiliti dal manuale dell'OMS [60], quali l'assenza di altre cause non correlate alla vaccinazione, la comparsa successiva all'iniezione, una finestra temporale compatibile con reazioni immunologiche, la similarità con altri casi di PACVS già descritti in letteratura e la plausibilità biologica, considerando la natura multiforme e pleiotropica delle possibili azioni della proteina spike nell'organismo [23, 39, 61-64].

Tutti i pazienti da noi osservati avevano lamentato l'insorgenza di sintomi settimane o al massimo tre mesi dopo la somministrazione dei vaccini biogenetici anti-COVID-19 e questi sintomi erano ancora presenti quando hanno contattato il nostro centro medico. Tra l'ultima vaccinazione e l'esecuzione del test anticorpale erano trascorsi in media 20 mesi. Si tratta quindi di una sindrome di lunga durata con alcuni sintomi presenti nella maggior parte dei pazienti: astenia o stanchezza cronica, perdita di memoria, annebbiamento mentale, nevralgia o parestesia, tachicardia, dolore osteoarticolare o muscolare, sensazione di bruciore, ipertensione, mal di testa. Altri sintomi comunemente segnalati erano svenimento, vertigini, gastrite o enterite, lividi cutanei ed edema o rash. Dismenorrea o amenorrea sono state segnalate da più di un terzo delle pazienti di sesso femminile. Questi sintomi sono coerenti con quanto riportato da altri per PACVS [11-16]. Quasi tutti i pazienti della nostra serie hanno manifestato grave affaticamento e sintomi cardiovascolari come palpitazioni, tachicardia o ipertensione, sintomi neurologici come mal di testa, vertigini e parestesia, o persino sintomi psichiatrici come la nebbia mentale, che sono stati descritti da altri sia per PACS che per PACVS [19].

Mundorf et al. [15], che hanno studiato le storie cliniche di 191 pazienti con PACVS, hanno riscontrato una prevalenza di malessere e stanchezza cronica in oltre l'80% dei casi e frequenti sintomi di deterioramento cognitivo, cefalea e disfunzione visiva e uditiva, dolore muscolare, disfunzione dei nervi periferici, parestesia, deterioramento cardiovascolare, tutti sintomi riferiti anche da una larga percentuale dei nostri pazienti. Interessante è anche la netta prevalenza del genere femminile in quella storia clinica (159 donne e 32 uomini) [15], con cui le nostre distribuzioni concordano.

Nel complesso, il nostro studio suggerisce fortemente che l'analisi del pannello di autoanticorpi da noi utilizzato e in particolare la dose di anti-ACE2 possono avere un'utilità diagnostica e forse predittiva per questo tipo di patologia post-vaccinazione. Questa ipotesi è in accordo con quanto recentemente riportato da altri autori [14, 15], secondo cui la PACVS si distingue dal normale stato post-vaccinazione per anticorpi recettoriali alterati (in particolare anticorpi recettoriali ATR1 aumentati e anticorpi recettoriali adrenergici alfa-2B diminuiti) e IL6 e IL-8 aumentati. Nella nostra serie di casi, abbiamo anche riscontrato un aumento di ATR1 in 2 pazienti su 17. Inoltre, abbiamo osservato aumenti in molti degli altri anticorpi qui riportati, di cui l'anti-ACE2 era particolarmente importante, in accordo con un precedente rapporto [65]. Questi ultimi autori hanno anche notato un aumento significativo di anti-ACE2 dalla prima alla seconda dose.

Tutti i pazienti della nostra serie hanno mostrato uno o più autoanticorpi positivi, ma il quadro ottenuto dal pannello immunologico utilizzato era molto eterogeneo nei diversi pazienti. Per la maggior parte degli anticorpi non c'era correlazione con i sintomi, il che suggerisce che il loro ruolo non è implicato o che sono epifenomeni. Solo i 6 autoanticorpi riportati nella Tabella 5, ovvero quelli contro ATR1, PAR1, ADRA2A, ACE2, MAS1 e STAB1, sono correlati positivamente con alcuni sintomi. Il risultato che appare statisticamente robusto, nonostante le piccole dimensioni del campione, è che l'anti-ACE2 è correlato positivamente con sintomi cutanei come lividi, edema ed eruzione cutanea. Questa osservazione è coerente con quanto riportato da altri, secondo cui le principali caratteristiche cutanee nei pazienti con vasculite autoimmune dopo la vaccinazione contro il covid-19 erano eruzioni cutanee e placche maculopapulari [30], o eruzioni cutanee ed eritema multiforme [66]. Inoltre, da quanto mostrato nella Figura 1, l'anti-ACE2 è positivo anche nella maggior parte dei pazienti che hanno lamentato ipertensione, cefalea, disturbi

visivi, gastrite o gastroenterite, e in tutti i pazienti che hanno lamentato trombosi, linfadenopatia e/o tonsillite.

La correlazione dell'anti-ACE2 con i sintomi cutanei e con gli anticorpi anti-S è la scoperta più intrigante, perché la molecola/enzima ACE2 contro cui è diretto quest'ultimo anticorpo è sia il recettore per la proteina spike sia l'enzima che converte l'angiotensina 2. Ciò implica, in termini di conseguenze fisiopatologiche, che un anticorpo diretto contro ACE2 possa avere conseguenze funzionali simili a quelle della proteina spike stessa. Per analogia con quanto già ipotizzato per le proteine spike di virus o vaccini [23, 67], l'interazione con ACE2 potrebbe portare alla trasduzione del segnale nelle cellule infiammatorie o nelle piastrine, con attivazione e rilascio di mediatori infiammatori. In alternativa, la stessa interazione potrebbe portare al blocco della funzione enzimatica e quindi all'accumulo di angiotensina 2, all'ipertensione e all'attivazione dell'infiammazione tramite il recettore AT1. È stato osservato che i livelli di autoanticorpi ACE2 sono aumentati negli individui con COVID-19 grave rispetto a quelli con infezione lieve, suggerendo un ruolo patogeno [49, 50, 68-70] ed è stata segnalata una correlazione positiva tra i livelli di anticorpi alla proteina spike (S1-RBD) e autoanticorpi anti-ACE2 nei pazienti con COVID-19 [71]. Per quanto riguarda l'origine dell'anti-ACE2, i nostri dati, che mostrano una correlazione positiva con gli anticorpi anti-S, sembrano confermare l'ipotesi che siano formati dal meccanismo anti-idiotipo, in accordo con quanto ipotizzato da altri autori [62, 72-74]. Alcuni autori hanno suggerito una cross-reattività antigenica tra S1-RBD e il suo recettore ACE2 [71]

In generale, la genesi del PACVS può essere attribuita a una reazione eccessiva e, soprattutto, distorta al prodotto inoculato. In condizioni normali, i vaccini inducono la sintesi della proteina spike e, di conseguenza, la produzione di anticorpi anti-S, che dovrebbero esercitare un effetto neutralizzante sul virus. Tuttavia, in alcuni individui può verificarsi la produzione di autoanticorpi contro epitopi della proteina spike che condividono somiglianze con proteine autologhe o persino contro alcuni idiotipi di anticorpi anti-S [23, 24, 37, 75]. Questo fenomeno può essere dovuto a una serie di fattori, come il background genetico (ad esempio l'aplotipo HLA [76], MTHFR [77], il genere [78, 79]), l'effetto adiuvante delle nanoparticelle lipidiche [80, 81], le impurità del vaccino [82, 83] o l'eterogeneità dipendente dal lotto [84], o la produzione di proteine spike ricombinanti frame-shifted [85]. Il repertorio di anticorpi risultante può essere ulteriormente amplificato attraverso la rete idiotipica di Jerne [74, 86], producendo autoanticorpi che possono essere classificati nelle seguenti classi: a) molecole irrilevanti senza funzione degna di nota, b) anticorpi immunoregolatori che modulano l'attività del sistema immunitario, c) anticorpi anti-recettore che causano sintomi di disautonomia sui sistemi cardiovascolare, endocrino o nervoso e d) autoanticorpi che stimolano reazioni infiammatorie attraverso la formazione di complessi immunitari, l'attivazione del complemento, il rilascio di citochine e l'immunità cellulare di tipo ritardato.

Nel nostro studio, abbiamo identificato alcuni autoanticorpi come particolarmente implicati nell'insorgenza dei sintomi. ACE2 è il principale recettore della proteina spike del coronavirus e STAB1 è un recettore scavenger multifunzionale, espresso su macrofagi e cellule endoteliali e indotto durante l'infiammazione cronica [87]. ATR1, PAR1 e MAS1 sono recettori accoppiati a proteine G per l'angiotensina II, la trombina e l'angiotensina 1-7, rispettivamente. È interessante notare che i nostri dati suggeriscono anche una relazione inversa tra i sintomi e la presenza di anticorpi verso altri due recettori accoppiati a proteine G, vale a dire il recettore adrenergico alfa-2A (vedere Tabella 5) e il recettore colinergico muscarinico-3 (vedere Figura 1), suggerendo un potenziale ruolo protettivo o regolatore. Queste osservazioni, derivate dalla nostra piccola serie di casi, forniscono ipotesi intriganti che giustificano ulteriori indagini. La conferma attraverso studi epidemiologici più ampi ed esperimenti meccanicistici, come i test funzionali di questi anticorpi sui percorsi cellulari e recettoriali, sarà essenziale per convalidare questi risultati e chiarirne le implicazioni.

Alcuni autori hanno osservato una significativa associazione tra la gravità delle reazioni avverse sistemiche e livelli più elevati di anticorpi anti-S [88]. Altri autori hanno notato che i pazienti con manifestazioni neurologiche indotte sia dall'infezione che dalla vaccinazione con SARS-CoV-2 erano positivi per gli anticorpi contro ACE2 in assenza di altri marcatori classici di autoimmunità [18]. Indipendentemente dai problemi correlati al COVID, è stato osservato che gli autoanticorpi contro ACE2 sono associati a vasculopatie costrittive [89]. Un ruolo pro-infiammatorio degli anticorpi anti-ACE2 è suggerito anche dall'osservazione che questi anticorpi sono più alti nei pazienti con artrite reumatoide attiva rispetto ai pazienti in remissione [90]. In teoria, quando i recettori ACE2 diventano il bersaglio di un attacco anticorpale, possono verificarsi due potenziali esiti. In primo luogo, se gli anticorpi esercitano un effetto bloccante sull'attività della carbossipeptidasi del recettore, ciò potrebbe portare a un aumento dei livelli di angiotensina II e alla successiva attivazione del recettore ATR1. Tale attivazione può comportare conseguenze di ipertensione, pro-infiammatorie e disfunzione endoteliale [91]. In alternativa, se gli anticorpi esercitano una funzione stimolante sul recettore ACE2, questo potrebbe imitare l'attività della proteina spike stessa e trasmettere segnali di attivazione cellulare negli endoteli, nelle piastrine e nei leucociti, contribuendo alle cascate pro-infiammatorie [23].

Dei 16 autoanticorpi testati, alcuni sono fortemente correlati tra loro (Tabella 4) e con i sintomi (Tabella 5), mentre altri sono indipendenti. Presi insieme, questi risultati sembrano indicare che le sindromi post-vaccinazione riportate nella nostra serie di casi coinvolgono più autoanticorpi e non sono dovute a un singolo tipo di alterazione immunologica. Inoltre, la scarsa o assente correlazione di anti-ACE2 e PAR-1 con altri anticorpi suggerisce che la dose di questi due anticorpi abbia un significato diagnostico diverso e originale nella sindrome qui considerata. Se i dati del nostro lavoro fossero confermati in statistiche più ampie e indipendenti, mostrerebbero che l'autoimmunità indotta dai vaccini a mRNA contro SARS-CoV-2 è molto diversa da quelle già note e dovrebbe quindi essere studiata con pannelli di anticorpi appropriati.

4.1. Limiti dello Studio

Il presente studio presenta notevoli limitazioni, a partire dalla sua natura osservazionale e dalla mancanza di un gruppo di controllo di soggetti sani, il che è impossibile in uno studio retrospettivo come la nostra raccolta di casi clinici. Il campione è piccolo, per i motivi sopra menzionati, e quindi molte delle ipotesi che si possono trarre dal nostro studio non possono essere generalizzate. Abbiamo incluso nel nostro studio retrospettivo tutti i pazienti che hanno presentato consecutivamente questi sintomi, senza alcuna selezione, ma sono necessari ulteriori studi su serie di casi più ampie per valutare se l'elevata prevalenza di autoanticorpi del tipo da noi testato sia una caratteristica tipica della PACVS. Va anche notato che l'inclusione dei pazienti nel gruppo definito come affetto da PACVS era principalmente basata sui sintomi. La maggior parte dei sintomi riferiti dai pazienti non è stata confermata da esami neurologici, misure oggettive della funzione nervosa o altre indagini cliniche cardiovascolari. Un'altra limitazione del nostro studio è che la positività del test anticorpale è stata stabilita utilizzando un valore di cut-off che è stato determinato tra soggetti sani e pazienti COVID-19, non tra pazienti PACVS [50], le cui serie di casi sono ancora molto piccole. Tuttavia, per superare questo limite, il confronto dei livelli di Ab come variabile continua è stato eseguito in soggetti con e senza i sintomi considerati anche con il test di Mann-Whitney (vedi Tabella 5), un metodo indipendente dalla soglia. Infine, non abbiamo potuto misurare la proteina spike nel sangue dei vaccinati a causa di limitazioni tecniche legate alla complessità e al costo del metodo, che non è utilizzato nel nostro laboratorio. La spike ricombinante è stata trovata in pazienti con miocardite post-vaccinale fino a tre settimane dopo la vaccinazione [92] e in pazienti vaccinati senza correlazione con sintomi o titoli anticorpali fino a 180 giorni dopo la vaccinazione [93]. Pertanto, non possiamo escludere che alcuni dei sintomi riportati dai pazienti siano dovuti alla proteina spike piuttosto che all'effetto degli autoanticorpi. Infatti,

l'iperattività del recettore beta-adrenergico cardiaco è stata segnalata anche nei pazienti PASC con alti livelli plasmatici di proteina spike [64].

5. Conclusioni

Questo articolo sottolinea l'elevata prevalenza di anticorpi diretti contro i recettori accoppiati alle proteine G e le molecole correlate a RAS in una serie di pazienti con PACVS, nessuno dei quali aveva avuto una precedente infezione da COVID-19. La ricerca di una correlazione tra sintomi e livelli di anticorpi ha rivelato la potenziale importanza degli autoanticorpi contro ACE2, ATR1, PAR1, MAS1, ADRA2A, CHRM3 e STAB1 nella patogenesi della PACVS, una sindrome ancora poco definita. In particolare, è stato osservato che tutti i pazienti con PACVS riportano una varietà di sintomi, con astenia, perdita di memoria, nevralgia, tachicardia ortostatica o a riposo e dolore muscolare come i più diffusi. Inoltre, i pazienti positivi per autoanticorpi contro il recettore della proteina spike ACE2 presentano una maggiore frequenza di sintomi come ipertensione, mal di testa, gastrite, lividi cutanei, edema o eruzioni cutanee rispetto ai pazienti ACE2-negativi. Se confermati attraverso studi sistematici su coorti più ampie, questi anticorpi potrebbero diventare un prezioso biomarcatore per la diagnosi, la valutazione clinica e la gestione degli eventi avversi autoimmuni conseguenti alla vaccinazione contro il COVID-19.

Contributi degli autori: concettualizzazione, M.M., P.B. ed E.Z.; metodologia, M.M., M.T., D.B. e G.D.F.; convalida, S.F. ed E.Z.; analisi formale, P.B. ed E.Z.; indagine, M.M. e G.D.F.; cura dei dati, M.M., M.T., D.B., P.B. ed E.Z.; scrittura: preparazione della bozza originale, P.B. ed E.Z.; scrittura: revisione e modifica, tutti gli autori. Tutti gli autori hanno letto e accettato la versione pubblicata del manoscritto.

Finanziamento: Questa ricerca non ha ricevuto finanziamenti esterni

Etica: questo è uno studio osservazionale retrospettivo di una serie di pazienti diagnosticati e trattati in modo completamente indipendente dal progetto di raccolta dati. Lo studio è stato condotto in conformità con la Dichiarazione di Helsinki e i metodi sono stati approvati dal comitato etico istituzionale dell'IMBIO Medical Institute (codice protocollo 02/2024 in data 19 settembre 2024).

Dichiarazione di consenso informato: il consenso informato è stato ottenuto da tutti i soggetti coinvolti nello studio.

Conflitti di interesse: gli autori dichiarano di non avere conflitti di interesse.

Bibliografia

1. Dotan, A; Muller, S; Kanduc, D; David, P; Halpert, G; Shoenfeld, Y. The SARS-CoV-2 as an instrumental trigger of autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2021;20:102792.
2. Acosta-Ampudia, Y; Monsalve, DM; Rojas, M; Rodriguez, Y; Zapata, E; Ramirez-Santana, C, et al. Persistent Autoimmune Activation and Proinflammatory State in Post-Coronavirus Disease 2019 Syndrome. *J Infect Dis* 2022;225:2155-2162.
3. Soriano, JB; Murthy, S; Marshall, JC; Relan, P; Diaz, JV; Condition, WHOCCDWGoP-C-. A clinical case definition of post-COVID-19 condition by a Delphi consensus. *Lancet Infect Dis* 2022;22:e102-e107.
4. Angeli, F; Verdecchia, P; Reboldi, G. Long COVID [post-acute sequelae of coronavirus disease 2019]: experimental drugs for cardiopulmonary complications. *Expert Opin Investig Drugs* 2023;32:567-570.
5. Sotzny, F; Filgueiras, IS; Kedor, C; Freitag, H; Wittke, K; Bauer, S, et al. Dysregulated autoantibodies targeting vaso- and immunoregulatory receptors in Post COVID Syndrome correlate with symptom severity. *Front Immunol* 2022;13:981532.
6. Davis, HE; McCorkell, L; Vogel, JM; Topol, EJ. Long COVID: major findings, mechanisms and recommendations. *Nat Rev Microbiol* 2023;21:133-146.
7. Ballering, AV; van Zon, SKR; Olde Hartman, TC; Rosmalen, JGM; Lifelines Corona Research, I. Persistence of somatic symptoms after COVID-19 in the Netherlands: an observational cohort study. *Lancet* 2022;400:452-461.
8. Al-Aly, Z; Bowe, B; Xie, Y. Long COVID after breakthrough SARS-CoV-2 infection. *Nat Med* 2022;28:1461-1467.
9. Ayoubkhani, D; Bosworth, ML; King, S; Pouwels, KB; Glickman, M; Nafilyan, V, et al. Risk of Long COVID in People Infected With Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 After 2 Doses of a Coronavirus Disease 2019 Vaccine: Community-Based, Matched Cohort Study. *Open Forum Infect Dis* 2022;9:ofac464.
10. Krumholz, HM; Wu, Y; Sawano, M; Shah, R; Zhou, T; Arun, AS, et al. Post-Vaccination Syndrome: A Descriptive Analysis of Reported Symptoms and Patient Experiences After Covid-19 Immunization. *medRxiv* 2023. 10.1101/2023.11.09.23298266.
11. Finsterer, J. A Case Report: Long Post-COVID Vaccination Syndrome During the Eleven Months After the Third Moderna Dose. *Cureus* 2022;14:e32433.
12. Finsterer, J; Scorza, FA. A retrospective analysis of clinically confirmed long post-COVID vaccination syndrome. *J Clin Transl Res* 2022;8:506-508.

13. Scholkmann, F; May, CA. COVID-19, post-acute COVID-19 syndrome (PACS, "long COVID") and post-COVID-19 vaccination syndrome (PCVS, "post-COVIDvac-syndrome"): Similarities and differences. *Pathol Res Pract* 2023;246:154497.
14. Semmler, A; Mundorf, AK; Kuechler, AS; Schulze-Bosse, K; Heidecke, H; Schulze-Forster, K, et al. Chronic Fatigue and Dysautonomia following COVID-19 Vaccination Is Distinguished from Normal Vaccination Response by Altered Blood Markers. *Vaccines (Basel)* 2023;11.
15. Mundorf, AK; Semmler, A; Heidecke, H; Schott, M; Steffen, F; Bittner, S, et al. Clinical and Diagnostic Features of Post-Acute COVID-19 Vaccination Syndrome (PACVS). *Vaccines (Basel)* 2024;12.
16. Finsterer, J. Myocarditis, Coagulopathy, and Small Fibre, Sensory, and Multiple Cranial Nerve Neuropathy Complicating BNT162b2 Vaccination: A Case Report. *Cureus* 2024;16:e55205.
17. Dahan, S; Tomljenovic, L; Shoenfeld, Y. Postural Orthostatic Tachycardia Syndrome (POTS)--A novel member of the autoimmune family. *Lupus* 2016;25:339-342.
18. Bellucci, M; Bozzano, FM; Castellano, C; Pesce, G; Beronio, A; Farshchi, AH, et al. Post-SARS-CoV-2 infection and post-vaccine-related neurological complications share clinical features and the same positivity to anti-ACE2 antibodies. *Front Immunol* 2024;15:1398028.
19. Hotz, JF; Kellerberger, S; Elea Jochlinger, S; Danielova, I; Temizsoy, H; Otsch, S, et al. Exploring cognitive impairments and the efficacy of phosphatidylcholine and computer-assisted cognitive training in post-acute COVID-19 and post-acute COVID-19 Vaccination Syndrome. *Front Neurol* 2024;15:1419134.
20. David, P; Dotan, A; Mahroum, N; Shoenfeld, Y. Immune Thrombocytopenic Purpura (ITP) Triggered by COVID-19 Infection and Vaccination. *Isr Med Assoc J* 2021;23:378-380.
21. Finsterer, J. Small fiber neuropathy as a complication of SARS-CoV-2 vaccinations. *J Family Med Prim Care* 2022;11:4071-4073.
22. Mingot-Castellano, ME; Butta, N; Canaro, M; Gomez Del Castillo Solano, MDC; Sanchez-Gonzalez, B; Jimenez-Barcenas, R, et al. COVID-19 Vaccines and Autoimmune Hematologic Disorders. *Vaccines (Basel)* 2022;10.
23. Bellavite, P; Ferraresi, A; Isidoro, C. Immune Response and Molecular Mechanisms of Cardiovascular Adverse Effects of Spike Proteins from SARS-CoV-2 and mRNA Vaccines. *Biomedicines* 2023;11.
24. Polykretis, P; Donzelli, A; Lindsay, JC; Wiseman, D; Kyriakopoulos, AM; Morz, M, et al. Autoimmune inflammatory reactions triggered by the COVID-19 genetic vaccines in terminally differentiated tissues. *Autoimmunity* 2023;56:2259123.
25. Ueno, M; Takabatake, H; Itakura, J; Fujita, R; Kayahara, T; Morimoto, Y, et al. Corticosteroid-refractory autoimmune hepatitis after COVID-19 vaccination: a case report and literature review. *Clin J Gastroenterol* 2023;16:554-558.
26. Fenoglio, R; Lalloni, S; Marchisio, M; Oddone, V; De Simone, E; Del Vecchio, G, et al. New Onset Biopsy-Proven Nephropathies after COVID Vaccination. *Am J Nephrol* 2022;53:325-330.
27. Jung, SW; Jeon, JJ; Kim, YH; Choe, SJ; Lee, S. Long-term risk of autoimmune diseases after mRNA-based SARS-CoV2 vaccination in a Korean, nationwide, population-based cohort study. *Nat Commun* 2024;15:6181.
28. Samim, MM; Dhar, D; Goyal, S; Dey, T; Parvin, N; Shah, RD, et al. AI-CoV Study: Autoimmune Encephalitis Associated With COVID-19 and Its Vaccines-A Systematic Review. *J Clin Neurol* 2022;18:692-710.
29. Liang, I; Swaminathan, S; Lee, AYS. Emergence of de novo cutaneous vasculitis post coronavirus disease (COVID-19) vaccination. *Clin Rheumatol* 2022;41:1611-1612.
30. Tang, X; Liu, F; Li, Q; Fu, H; Wang, J; Mao, J. De Novo Vasculitis after COVID-19 Vaccination. *Curr Rheumatol Rev* 2023;19:151-158.
31. Camargo Coronel, A; Jimenez Balderas, FJ; Quinones Moya, H; Hernandez Zavala, MR; Mandinabeitia Rodriguez, P; Hernandez Vazquez, JR, et al. Dermatomyositis post vaccine against SARS-COV2. *BMC Rheumatol* 2022;6:20.
32. Ryad, R; Osman, A; Almusa, A; Gerges, P; Sumbul-Yuksel, B. Dermatomyositis Flare-Up Following the SARS-CoV-2 Vaccine: A Case Report and Literature Review. *Cureus* 2023;15:e44324.
33. Diaz-Menendez, M; Sullivan, MM; Wang, B; Majithia, V; Abril, A; Butendieck, RR, Jr., et al. Dermatomyositis in Association With SARS-CoV-2 Infection or COVID-19 Vaccine. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2024;76:98-104.
34. Angeli, F; Reboldi, G; Trapasso, M; Zappa, M; Spanevello, A; Verdecchia, P. COVID-19, vaccines and deficiency of ACE2 and other angiotensinases. Closing the loop on the "Spike effect". *Eur J Intern Med* 2022;103:23-28.
35. Kowarz, E; Krutzke, L; Kulp, M; Streb, P; Larghero, P; Reis, J, et al. Vaccine-induced COVID-19 mimicry syndrome. *Elife* 2022;11.
36. Chen, Y; Xu, Z; Wang, P; Li, XM; Shuai, ZW; Ye, DQ, et al. New-onset autoimmune phenomena post-COVID-19 vaccination. *Immunology* 2022;165:386-401.
37. Trougakos, IP; Terpos, E; Alexopoulos, H; Politou, M; Paraskevis, D; Scorilas, A, et al. Adverse effects of COVID-19 mRNA vaccines: the spike hypothesis. *Trends Mol Med* 2022;28:542-554.
38. Devaux, CA; Camoin-Jau, L. Molecular Mimicry of the Viral Spike in the SARS-CoV-2 Vaccine Possibly Triggers Transient Dysregulation of ACE2, Leading to Vascular and Coagulation Dysfunction Similar to SARS-CoV-2 Infection. *Viruses* 2023;15.
39. Parry, PI; Lefringhausen, A; Turni, C; Neil, CJ; Cosford, R; Hudson, NJ, et al. 'Spikeopathy': COVID-19 Spike Protein Is Pathogenic, from Both Virus and Vaccine mRNA. *Biomedicines* 2023;11.
40. Kanduc, D; Shoenfeld, Y. Molecular mimicry between SARS-CoV-2 spike glycoprotein and mammalian proteomes: implications for the vaccine. *Immunol Res* 2020;68:310-313.
41. Kanduc, D. From Anti-SARS-CoV-2 Immune Response to the Cytokine Storm via Molecular Mimicry. *Antibodies (Basel)* 2021;10.
42. Lyons-Weiler, J. Pathogenic Priming Likely Contributes to Serious and Critical Illness and Mortality in COVID-19 via Autoimmunity. *J Transl Autoimmun* 2020. 10.1016/j.jtauto.2020.100051 [doi];S2589-9090(20)30018-6 [pii];100051 [pii];100051.
43. Vojdani, A; Kharrazian, D. Potential antigenic cross-reactivity between SARS-CoV-2 and human tissue with a possible link to an increase in autoimmune diseases. *Clin Immunol* 2020;217:108480.
44. Segalla, G. Chemical-physical criticality and toxicological potential of lipid nanomaterials contained in a COVID-19 mRNA vaccine. *International Journal of Vaccine Theory, Practice, and Research* 2023;3:787-817.
45. Segalla, G. Apparent Cytotoxicity and Intrinsic Cytotoxicity of Lipid Nanomaterials Contained in a COVID-19 mRNA Vaccine. *International Journal of Vaccine Theory, Practice, and Research* 2023;3:957-972.
46. Mantovani, M; Grossi, R; Di Fede, G; Bellavite, P. Thrombosis With Thrombocytopenia and Post-COVID-Vaccination Syndrome With Anti-G-Protein-Coupled Receptor (GPCR) Antibodies Treated With Therapeutic Plasma Exchange. *Cureus* 2024;16:e60019.
47. Riis, JL; Ahmadi, H; Hamilton, KR; Hand, T; Granger, DA. Best practice recommendations for the measurement and interpretation of salivary proinflammatory cytokines in biobehavioral research. *Brain Behav Immun* 2021;91:105-116.
48. Lee, N; Jeong, S; Lee, SK; Cho, EJ; Hyun, J; Park, MJ, et al. Quantitative Analysis of Anti-N and Anti-S Antibody Titers of SARS-CoV-2 Infection after the Third Dose of COVID-19 Vaccination. *Vaccines (Basel)* 2022;10.

49. Geanes, ES; McLennan, R; LeMaster, C; Bradley, T. Autoantibodies to ACE2 and immune molecules are associated with COVID-19 disease severity. *Commun Med (Lond)* 2024;4:47.
50. Cabral-Marques, O; Halpert, G; Schimke, LF; Ostrinski, Y; Vojdani, A; Baiocchi, GC, et al. Autoantibodies targeting GPCRs and RAS-related molecules associate with COVID-19 severity. *Nat Commun* 2022;13:1220.
51. Colton, T (1974) *Statistics in Medicine*, Little, Brown and Company, Boston (Mass).
52. Parums, DV. Editorial: SARS-CoV-2 mRNA Vaccines and the Possible Mechanism of Vaccine-Induced Immune Thrombotic Thrombocytopenia (VITT). *Med Sci Monit* 2021;27:e932899.
53. Chen, PW; Tsai, ZY; Chao, TH; Li, YH; Hou, CJ; Liu, PY. Addressing Vaccine-Induced Immune Thrombotic Thrombocytopenia (VITT) Following COVID-19 Vaccination: A Mini-Review of Practical Strategies. *Acta Cardiol Sin* 2021;37:355-364.
54. Franchini, M; Liembruno, GM; Pezzo, M. COVID-19 vaccine-associated immune thrombosis and thrombocytopenia (VITT): Diagnostic and therapeutic recommendations for a new syndrome. *Eur J Haematol* 2021;107:173-180.
55. Patone, M; Handunnetthi, L; Saatci, D; Pan, J; Katikireddi, SV; Razvi, S, et al. Neurological complications after first dose of COVID-19 vaccines and SARS-CoV-2 infection. *Nat Med* 2021;27:2144-2153.
56. Doubrovinskaia, S; Mooshage, CM; Seliger, C; Lorenz, HM; Nagel, S; Lehnert, P, et al. Neurological autoimmune diseases following vaccinations against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): A follow-up study. *Eur J Neurol* 2023;30:463-473.
57. Patel, S; Wu, E; Mundae, M; Lim, K. Myocarditis and pericarditis following mRNA vaccination in autoimmune inflammatory rheumatic disease patients: A single-center experience. *Rheumatol Autoimmun* 2022;2:92-97.
58. Nguyen, SN; Le, SH; Ivanov, DG; Ivetic, N; Nazy, I; Kaltashov, IA. Structural Characterization of a Pathogenic Antibody Underlying Vaccine-Induced Immune Thrombotic Thrombocytopenia (VITT). *Anal Chem* 2024;96:6209-6217.
59. Kalin, T; Passarin, K; Filipowic-Sinnreich, M; Semela, D; Seifert, T; Sallusto, F, et al. SARS-CoV-2 mRNA vaccines do not worsen autoimmunity in patients with autoimmune liver diseases. *J Autoimmun* 2024;149:103325.
60. WHO (2021) Causality assessment of an adverse event following immunization (AEFI): user manual for the revised WHO classification, 2nd ed., 2019 update in Pharmacovigilance (PVG) (Organization, WH, ed) pp. 74, World Health Organization, Geneva.
61. Suzuki, YJ; Gychka, SG. SARS-CoV-2 Spike Protein Elicits Cell Signaling in Human Host Cells: Implications for Possible Consequences of COVID-19 Vaccines. *Vaccines (Basel)* 2021;9.
62. Canas, CA; Posso-Osorio, I; Bedoya-Joaqui, V; Lopez, HE; Tobon, GJ. An idiotypic network dysregulation could be related to the pathogenesis of vaccine-induced immune thrombotic thrombocytopenia (VITT) following vaccination with vaccines expressing Spike protein of SARS CoV2. *Intern Emerg Med* 2022;17:1249-1250.
63. Geanes, ES; LeMaster, C; Fraley, ER; Khanal, S; McLennan, R; Grundberg, E, et al. Cross-reactive antibodies elicited to conserved epitopes on SARS-CoV-2 spike protein after infection and vaccination. *Sci Rep* 2022;12:6496.
64. Deng, X; Cui, H; Liang, H; Wang, X; Yu, H; Wang, J, et al. SARS-CoV-2 spike protein acts as a beta-adrenergic receptor agonist: A potential mechanism for cardiac sequelae of long COVID. *J Intern Med* 2024;296:291-297.
65. Chao, CH; Cheng, D; Huang, SW; Chuang, YC; Yeh, TM; Wang, JR. Serological responses triggered by different SARS-CoV-2 vaccines against SARS-CoV-2 variants in Taiwan. *Front Immunol* 2022;13:1023943.
66. Nakashima, C; Kato, M; Otsuka, A. Cutaneous manifestations of COVID-19 and COVID-19 vaccination. *J Dermatol* 2023;50:280-289.
67. Bellavite, P. Renin-Angiotensin System, SARS-CoV-2 and Hypotheses about Adverse Effects Following Vaccination. *EC Pharmacology and Toxicology* 2021;9:1-10.
68. Rodriguez-Perez, AI; Labandeira, CM; Pedrosa, MA; Valenzuela, R; Suarez-Quintanilla, JA; Cortes-Ayaso, M, et al. Autoantibodies against ACE2 and angiotensin type-1 receptors increase severity of COVID-19. *J Autoimmun* 2021;122:102683.
69. Tsoi, JYH; Cai, J; Situ, J; Lam, WJ; Shun, EHK; Leung, JKY, et al. Autoantibodies against angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) after COVID-19 infection or vaccination. *J Med Virol* 2023;95:e29313.
70. Lebedin, M; Garcia, CV; Spatt, L; Ratswohl, C; Thibeault, C; Ostendorf, L, et al. Discriminating promiscuous from target-specific autoantibodies in COVID-19. *Eur J Immunol* 2023;53:e2250210.
71. Lai, YC; Cheng, YW; Chao, CH; Chang, YY; Chen, CD; Tsai, WJ, et al. Antigenic Cross-Reactivity Between SARS-CoV-2 S1-RBD and Its Receptor ACE2. *Front Immunol* 2022;13:868724.
72. Naveed, A; Naz, D; Rahman, SU. Idiotype/anti-idiotype antibodies: as a glorious savior in COVID-19 pandemics. *Transl Med Commun* 2021;6:18.
73. Murphy, WJ; Longo, DL. A Possible Role for Anti-idiotype Antibodies in SARS-CoV-2 Infection and Vaccination. *N Engl J Med* 2022;386:394-396.
74. Kurbel, S. Jerne's "immune network theory", of interacting anti-idiotypic antibodies applied to immune responses during COVID-19 infection and after COVID-19 vaccination. *Bioessays* 2023;45:e2300071.
75. Cosentino, M; Marino, F. The spike hypothesis in vaccine-induced adverse effects: questions and answers. *Trends Mol Med* 2022;28:797-799.
76. Talotta, R. Molecular Mimicry and HLA Polymorphisms May Drive Autoimmunity in Recipients of the BNT-162b2 mRNA Vaccine: A Computational Analysis. *Microorganisms* 2023;11.
77. Lu, M; Peng, K; Song, L; Luo, L; Liang, P; Liang, Y. Association between Genetic Polymorphisms in Methylenetetrahydrofolate Reductase and Risk of Autoimmune Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Dis Markers* 2022;2022:4568145.
78. Quintero, OL; Amador-Patarroyo, MJ; Montoya-Ortiz, G; Rojas-Villarraga, A; Anaya, JM. Autoimmune disease and gender: plausible mechanisms for the female predominance of autoimmunity. *J Autoimmun* 2012;38:1109-19.
79. Lahita, RG. Sex and gender influence on immunity and autoimmunity. *Front Immunol* 2023;14:1142723.
80. Lee, Y; Jeong, M; Park, J; Jung, H; Lee, H. Immunogenicity of lipid nanoparticles and its impact on the efficacy of mRNA vaccines and therapeutics. *Exp Mol Med* 2023;55:2085-2096.
81. Xie, C; Yao, R; Xia, X. The advances of adjuvants in mRNA vaccines. *NPJ Vaccines* 2023;8:162.
82. Camperi, J; Lippold, S; Ayalew, L; Roper, B; Shao, S; Freund, E, et al. Comprehensive Impurity Profiling of mRNA: Evaluating Current Technologies and Advanced Analytical Techniques. *Anal Chem* 2024;96:3886-3897.
83. Konig, B; Kirchner, JO. Methodological Considerations Regarding the Quantification of DNA Impurities in the COVID-19 mRNA Vaccine Comirnaty((R)). *Methods Protoc* 2024;7.
84. Manniche, V; Schmeling, M; Gilthorpe, JD; Hansen, PR. Reports of Batch-Dependent Suspected Adverse Events of the BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine: Comparison of Results from Denmark and Sweden. *Medicina (Kaunas)* 2024;60.
85. Boros, LG; Kyriakopoulos, AM; Brogna, C; Piscopo, M; McCullough, PA; Seneff, S. Long-lasting, biochemically modified mRNA, and its frameshifted recombinant spike proteins in human tissues and circulation after COVID-19 vaccination. *Pharmacol Res Perspect* 2024;12:e1218.

86. Jerne, N.K. Idiotypic networks and other preconceived ideas. *Immunol Rev* 1984;79:5-24.
87. Kzhyshkowska, J; Gratchev, A; Goerd, S. Stabilin-1, a homeostatic scavenger receptor with multiple functions. *J Cell Mol Med* 2006;10:635-49.
88. Takahashi, W; Mizuno, T; Hara, K; Ara, Y; Hurutani, R; Agatsuma, T, et al. Association of Systemic Adverse Reactions and Serum SARS-CoV-2 Spike Protein Antibody Levels after Administration of BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine. *Intern Med* 2022. 10.2169/internalmedicine.9699-22.
89. Takahashi, Y; Haga, S; Ishizaka, Y; Mimori, A. Autoantibodies to angiotensin-converting enzyme 2 in patients with connective tissue diseases. *Arthritis Res Ther* 2010;12:R85.
90. Khajeh Pour, S; Scoville, C; Tavernier, SS; Aghazadeh-Habashi, A. Plasma angiotensin peptides as biomarkers of rheumatoid arthritis are correlated with anti-ACE2 auto-antibodies level and disease intensity. *Inflammopharmacology* 2022;30:1295-1302.
91. Skultetyova, D; Filipova, S; Rieicansky, I; Skultety, J. The role of angiotensin type 1 receptor in inflammation and endothelial dysfunction. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov* 2007;2:23-7.
92. Yonker, LM; Swank, Z; Bartsch, YC; Burns, MD; Kane, A; Boribong, BP, et al. Circulating Spike Protein Detected in Post-COVID-19 mRNA Vaccine Myocarditis. *Circulation* 2023. 10.1161/CIRCULATIONAHA.122.061025.
93. Brogna, C; Cristoni, S; Marino, G; Montano, L; Viduto, V; Fabrowski, M, et al. Detection of recombinant Spike protein in the blood of individuals vaccinated against SARS-CoV-2: Possible molecular mechanisms. *Proteomics Clin Appl* 2023. 10.1002/prca.202300048:e2300048.