

Inflammation intramiocardica dopo la vaccinazione COVID-19: una serie di casi comprovati da biopsia endomiocardica

presso

Cristiano Baumeier^{1,*},
Ganna Aleshcheva¹,
Dominik Harms¹,
Ulrich Gross¹,
Christian Hamm^{2,3},
Birgit Assmus³,
Ralf Westenfeld⁴,
Malte Kelm⁴,
Spyros Rammos⁵,
Filippo Wenzel⁶,
Thomas Münzel⁶,
Albrecht Elsässer⁷,
Mudather Gailani⁸,
Christian Perings⁹,
Alae Bourakkadi¹⁰,
Markus Flesch¹¹,
Tibor Kempf¹²,
Johann Bauersachs¹²,
Felicitas Escher^{1,13,14}
Heinz-Peter Schultheiss¹

¹ Istituto di diagnostica e terapia cardiaca, IKDT GmbH, 12203 Berlino, Germania

² Kerckhoff Heart Center, Dipartimento di Cardiologia, 61231 Bad Nauheim, Germania

³ Dipartimento di Cardiologia e Angiologia, Universitätsklinikum Gießen und Marburg, 35391 Gießen, Germania

⁴ Dipartimento di Cardiologia, Pneumologia e Medicina Vascolare, Università Heinrich Heine di Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germania

⁵ Onassis Cardiac Surgery Center, 176 74 Atene, Grecia

⁶ Dipartimento di Cardiologia, University Medical Center Mainz, 55131 Mainz, Germania

⁷ Dipartimento di Cardiologia, Klinikum Oldenburg, 26133 Oldenburg, Germania

⁸ Frankenwaldklinik, 96317 Kronach, Germania

⁹ Dipartimento di Cardiologia, St. Marien-Hospital, 44534 Lünen, Germania

¹⁰ Dipartimento di Medicina Interna, Cardiologia, Geriatria e Medicina Palliativa, Gemeinschaftsklinikum Mittelrhein gGmbH, 56727 Mayen, Germania

*

Autore a cui indirizzare la corrispondenza.

Redattori accademici: Loredana Frasca e Steven Fiering

Int. J. Mol. Sci. **2022**, *23*(13), 6940; <https://doi.org/10.3390/ijms23136940>

Ricevuto il: 8 aprile 2022 / Revisione: 20 maggio 2022 / Accettato: 21 giugno 2022 / Pubblicato: 22 Giugno 2022

(Questo articolo appartiene al numero speciale [T-regulatory Cells in Autoimmunity and Transplantation](#))

Astratto

La miocardite in risposta alla vaccinazione COVID-19 è stata segnalata dall'inizio del 2021. In particolare, sono stati identificati giovani individui di sesso maschile che presentano un aumentato rischio di infiammazione miocardica in seguito alla somministrazione di vaccini a base di mRNA. Anche se le prime analisi epidemiologiche e numerosi casi clinici hanno studiato potenziali relazioni, i casi di biopsia endomiocardica (EMB) provati sono limitati. Qui presentiamo un'analisi istopatologica completa degli EMB di 15 pazienti con frazione di eiezione ridotta (LVEF = 30 (14-39)%) e il sospetto clinico di miocardite dopo la vaccinazione con Comirnaty (Pfizer-BioNTech) ($n = 11$), Vaxzevria (AstraZenica) ($n = 2$) e Janssen (Johnson & Johnson) ($n = 2$). Le analisi immunoistochimiche EMB rivelano infiammazione miocardica in 14 pazienti su 15, con diagnosi istopatologica di miocardite attiva secondo i criteri di Dallas ($n = 2$), miocardite a cellule giganti grave ($n = 2$) e cardiomiopatia infiammatoria ($n = 10$). È importante sottolineare che le cause infettive sono state escluse in tutti i pazienti. La proteina spike SARS-CoV-2 è stata rilevata scarsamente sui cardiomiociti di nove pazienti e l'analisi differenziale di marcatori infiammatori come le cellule T CD4 e CD8 suggerisce che la risposta infiammatoria innescata dal vaccino potrebbe essere di origine autoimmunologica. Sebbene una relazione causale definitiva tra la vaccinazione COVID-19 e l'insorgenza di infiammazione miocardica non possa essere dimostrata in questo studio, i dati suggeriscono una connessione temporale. L'espressione della proteina spike SARS-CoV-2 all'interno del cuore e la dominanza degli infiltrati linfocitari CD4 indicano una risposta autoimmunologica alla vaccinazione. @@@+++

Parole chiavi: [COVID-19](#); [vaccinazione](#); [SARS-CoV-2](#); [Comirnaty](#); [Vaxzevria](#); [Janssen](#); [cardiomiopatia infiammatoria](#); [miocardite](#); [miocardite a cellule giganti](#)

1. Introduzione

Miocardite e pericardite sono state segnalate come una potenziale complicanza dei vaccini contro l'mRNA (RNA messaggero) COVID-19. Dalle prime osservazioni di miocardite in risposta al vaccino Pfizer-BioNTech nell'aprile 2021 [1], sono stati pubblicati numerosi casi clinici, che indicano una relazione tra la vaccinazione COVID-19 e l'insorgenza di miocardite/ pericardite [2,3,4,5,6,7,8].

Nel frattempo, ampi studi epidemiologici rivelano che la maggior parte della miocardite correlata al vaccino COVID-19 si verifica in giovani individui di sesso maschile (età mediana di 21 anni) dopo la seconda dose di vaccini a base di mRNA [9]. La maggior parte dei casi (76,8%) sono stati osservati in risposta al vaccino Pfizer-BioNTech (Comirnaty), mentre un quarto (23,2%) ha ricevuto il vaccino Moderna (Spikevax). Nonostante i numeri totali dei casi, l'incidenza generale di miocardite si è dimostrata più alta nei pazienti trattati con Spikevax (da 1,3 a 1,9 (Spikevax) e da 0,26 a 0,57 (Comirnaty) casi extra di miocardite per 10.000 soggetti) [10]. Di conseguenza, numerose autorità nazionali hanno raccomandato l'uso di Comirnaty al posto di Spikevax per le persone di età pari o inferiore a 30 anni. @@@@@@@

I segni di miocardite dopo la vaccinazione COVID-19 di solito si sviluppano entro 2 settimane [11,12] e i sintomi clinici generalmente si attenuano rapidamente senza compromissione della funzione cardiaca [13]. Sebbene la miocardite correlata al vaccino COVID-19 abbia un'incidenza marginale complessiva e i pazienti affetti mostrino un rapido recupero in assenza di complicanze a breve termine, la miocardite è un effetto collaterale allarmante, che deve essere monitorato attentamente.

Mentre la maggior parte dei casi pubblicati si basa sulla risonanza magnetica cardiaca (cMRI) e sulla valutazione di laboratorio [2,3,4,5,6,7], i casi di biopsia endomiocardica (EMB) sono limitati

[8,14,15]. Qui, presentiamo un'analisi completa degli EMB di 15 pazienti con sospetto di miocardite dopo la vaccinazione contro SARS-CoV-2 e riveliamo una relazione temporale tra la vaccinazione e l'insorgenza di infiammazione miocardica, che va dalla cardiomiopatia infiammatoria lieve alla miocardite attiva grave e alla miocardite a cellule giganti.

2. Risultati

Le caratteristiche dei pazienti, il quadro clinico e i risultati di laboratorio al momento del ricovero ospedaliero sono illustrati nella **Tabella 1**. È importante sottolineare che il sospetto di miocardite in risposta alla vaccinazione contro SARS-CoV-2 è stato espresso in tutti i casi. La frazione mediana di eiezione ventricolare sinistra (LVEF) è stata del 30 (14-39)%. La coorte analizzata varia dai 18 ai 68 anni di età ed è dominata dal sesso maschile (9/15, 60%). Tutti i pazienti erano caucasici. Il tipo di vaccino, l'insorgenza dei sintomi, il sospetto clinico e il decorso clinico differiscono molto nella coorte presentata (**Tabella 1**).

Tabella 1. Caratteristiche dei pazienti, dati sulla vaccinazione, risultati clinici e diagnosi basata sull'EMB.

Tutti gli EMB sono stati testati negativamente per SARS-CoV-2 utilizzando sequenze specifiche del gene E [16]. Oltre a 10 casi con infezione latente da parvovirus B19, nessun altro agente patogeno virale tra cui adenovirus, enterovirus, virus di Epstein-Barr e herpesvirus umano 6 è stato rilevato nelle biopsie mediante NESTED- e qRT-PCR (**Tabella 2**). Da 15 pazienti, due casi di miocardite attiva (AMC, pazienti 1 e 2), due casi di miocardite a cellule giganti (GCMC, pazienti 3 e 14), nove casi di cardiomiopatia infiammatoria (DCMi) e un caso di cardiomiopatia dilatativa (DCM, paziente 12) sono stati diagnosticati sulla base della diagnostica differenziale EMB. La maggior parte dei casi (11/15, 73%; AMC = 2; GCMC = 1; DCMi = 8) sono stati osservati in relazione al vaccino comirnaty mRNA e quattro casi (27%) erano correlati a Vaxzevria (DCMi = 1; DCM = 1) e Janssen (AMC = 1; DCMi = 1) vaccini vettoriali. L'insorgenza dei sintomi variava da 0 a 56 giorni (mediana 14 giorni) per La Comirnaty, da 1 a 14 giorni (mediana 7,5 giorni) per Vaxzevria e da 14 a 28 giorni (mediana 21 giorni) per i vaccini Janssen. ©©©©©©

Tabella 2. Risultati della biopsia. L'analisi virologica include il rilevamento di genomi da SARS-CoV-2, Parvovirus B19 (B19V), Enterovirus, Adenovirus, Herpesvirus umano 6 e virus Epstein-Barr. L'analisi immunocitochimica comprende il rilevamento di cellule T CD3, CD4 e CD8, cellule di memoria T CD45R0, linfociti LFA-1, macrofagi MAC-1, cellule citotossiche perforina, cellule presentanti HLA-DR, molecole di adesione cellulare endoteliale ICAM-1 e proteina spike SARS-CoV-2. Tutti i marcatori di infiammazione sono stati quantificati mediante analisi digitale dell'immagine e sono raffigurati come cellule/mm⁺⁺⁺⁺⁺⁺⁺² o area %, rispettivamente. La proteina Spike è stata valutata come non espressa (– o scarsamente espressa (+).

La maggior parte dei pazienti nel gruppo Comirnaty erano maschi (8/11, 73%), mentre il sospetto di miocardite dopo la vaccinazione con i vaccini vettori è stato effettuato principalmente in pazienti di sesso femminile (1/2 per Janssen; 2/2 per Vaxzevria). L'età media dei pazienti trattati con il vaccino Comirnaty era di 34 (28-46) anni, dei pazienti trattati con Vaxzevria di 64 (61-66) anni e dei pazienti trattati con i vaccini Janssen di 38 (35-42) anni (**Tabella 1**). ©©©©©©

Tutti i pazienti hanno rivelato un esordio improvviso di grave insufficienza ventricolare sinistra (LVEF ≤ 45%) e la maggior parte presentava sintomi aggiuntivi come dispnea, dolore toracico,

riduzione della frequenza respiratoria e diminuzione della capacità di esercizio (**Tabella 1**). I dati sulla risonanza magnetica cardiaca erano disponibili per sei pazienti, non mostrando segni di miocardite in quattro di essi (pazienti 2, 4, 5 e 11) e segni tipici di miocardite attiva in due pazienti (pazienti 8 e 9) (**Tabella 1**). Cinque pazienti hanno mostrato gravi complicanze tra cui scompenso cardiaco (pazienti 5 e 8, entrambi DCMi) e shock cardiogeno fulminante (paziente 14, GCMC), e due pazienti (pazienti 2 e 3, AMC e GCMC, rispettivamente) hanno dovuto essere rianimati prima del ricovero nell'unità di terapia intensiva (**Tabella 1**). I dati sui biomarcatori cardiaci e infiammatori di laboratorio tra cui troponina, peptide natriuretico cerebrale (BNP), creatinina chinasi (CK) e peptide C-reattivo (CRP) sono eterogenei e sono stati elevati in 12 pazienti su 15 (**Tabella 1**).

L'analisi immunocitochimica EMB ha rivelato un aumento della presenza di marcatori di infiammazione in 14/15 pazienti (**Figura 1, Tabella 2**). Solo 1 paziente è risultato avere livelli costantemente bassi di cellule infiammatorie, compatibili con la diagnosi di un DCM (paziente 12, **Figura 1, Tabella 2**). Tutti gli altri pazienti con infiammazione miocardica hanno mostrato un diverso modello di marcatori infiammatori, che vanno dal grado di infiammazione lieve a quello grave. Su 14 pazienti con prova di infiammazione, 9 (64%) hanno mostrato un'elevata infiltrazione di cellule T CD3, 12 (86%) hanno mostrato un aumento dei livelli di cellule di memoria T CD45RO e linfociti LFA-1, 11 (79%) hanno mostrato un aumento del numero di macrofagi MAC-1 e cellule che presentano HLA-DR e nessuno ha mostrato livelli aumentati di cellule citotossiche perforina (**Figura 1, Tabella 2**). Le molecole di adesione cellulare ICAM-1 e VCAM-1 sono risultate normali in tutti i pazienti, ad eccezione di due pazienti con AMC (paziente 2) e GCMC (paziente 14), rispettivamente (**Tabella 2**). Ulteriori analisi immunocitochimiche hanno rivelato il rilevamento positivo della proteina spike SARS-CoV-2 nel tessuto cardiaco in un paio di pazienti. In particolare, la proteina spike è stata trovata in cellule sparse (cardiomiociti) in 9 casi su 15 (**Figura 2, Tabella 2**). Inoltre, ad eccezione dei casi con miocardite attiva (pazienti 1 e 2), miocardite a cellule giganti (pazienti 3 e 14) e un caso di DCMi (paziente 9), il rapporto CD4-T-cell-to-CD8-T-cell è stato ≥ 1 , suggerendo un'origine prevalentemente autoimmunologica dell'infiammazione osservata (**Figura 3, Tabella 2**).+++++

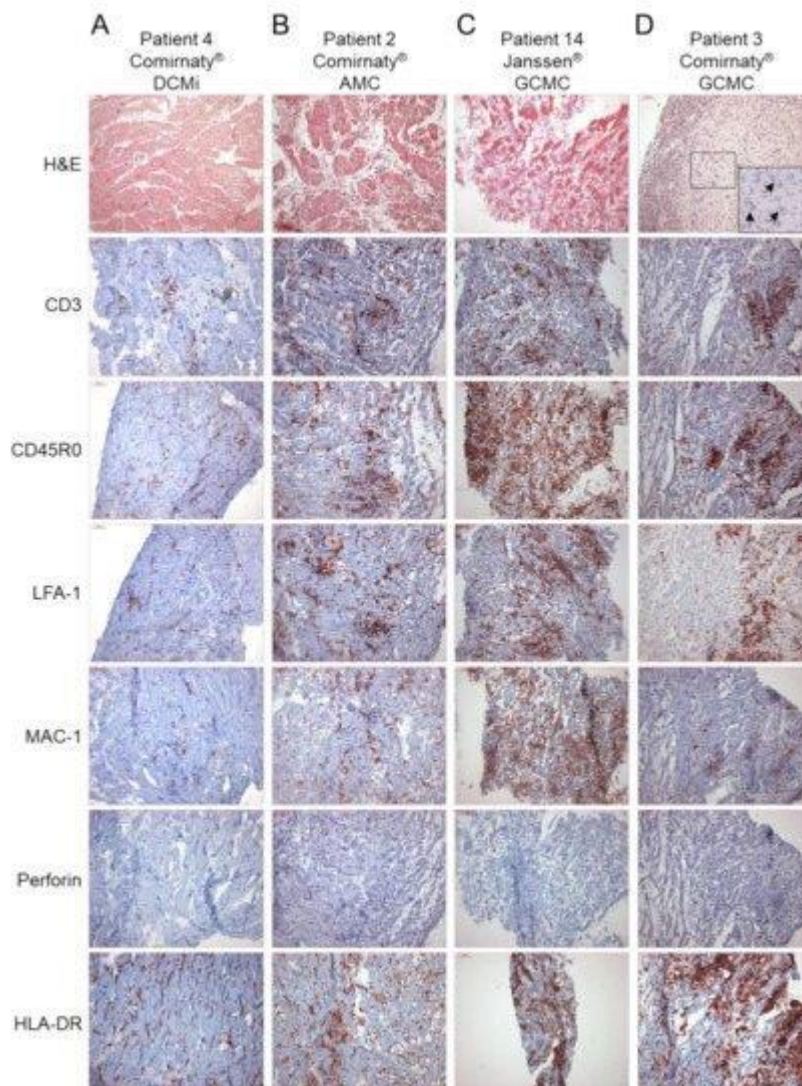


Figura 1. Immagini rappresentative della colorazione di ematossilina ed eosina (H & E) e colorazioni immunoistochimiche per la valutazione dell'infiammazione nelle biopsie endomiocardiche di pazienti con sospetto di miocardite dopo la vaccinazione COVID-19. Rilevazione immunoistochimica di cellule T CD3, cellule T-memory CD45R0, linfociti LFA-1, macrofagi MAC-1, cellule citotossiche di perforina e cellule T attivate da HLA-DR in pazienti con diagnosi di (A) cardiomiopatia infiammatoria (DCMi, paziente 4, vaccino Comirnaty), (B) miocardite acuta (AMC, paziente 2, vaccino Comirnaty) e (C,D) miocardite a cellule giganti (GCMC, paziente 14, vaccino Janssen; paziente 3, vaccino Cormirnaty; le cellule giganti sono contrassegnate da frecce nella colorazione H & E). La colorazione immunoistochimica è stata quantificata mediante analisi digitale delle immagini ed è raffigurata per ciascun paziente nella Tabella 2. Ingrandimento 200×. Barre di scala 50 µm. +++++@#@#@

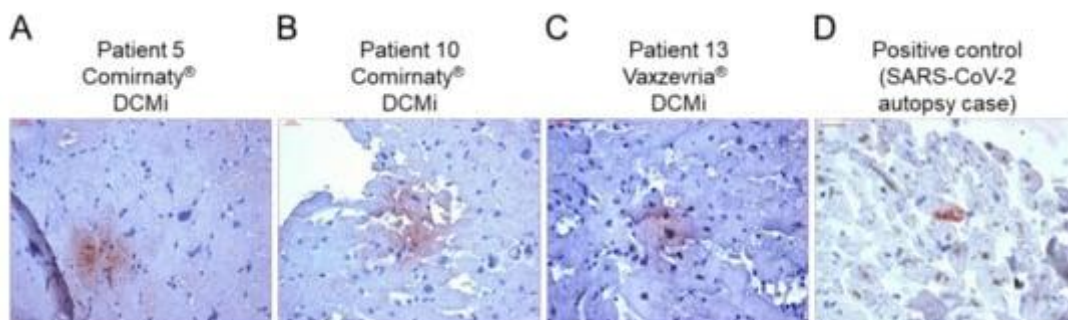


Figura 2. Evidenza di proteina spike SARS-CoV-2 nel tessuto cardiaco dopo la vaccinazione COVID-19. (A–C) Colorazioni immunoistochimiche rappresentative della proteina spike SARS-CoV-2 negli EMB di pazienti con diagnosi di DCMi dopo aver ricevuto Comirnaty (panel A e B, pazienti 5 e 10) o Vaxzevria (panel C, paziente 13). (D) Il tessuto cardiaco SARS-CoV-2-positivo fungeva da controllo positivo. Ingrandimento 400×. Barre di scala 20 µm. ®®

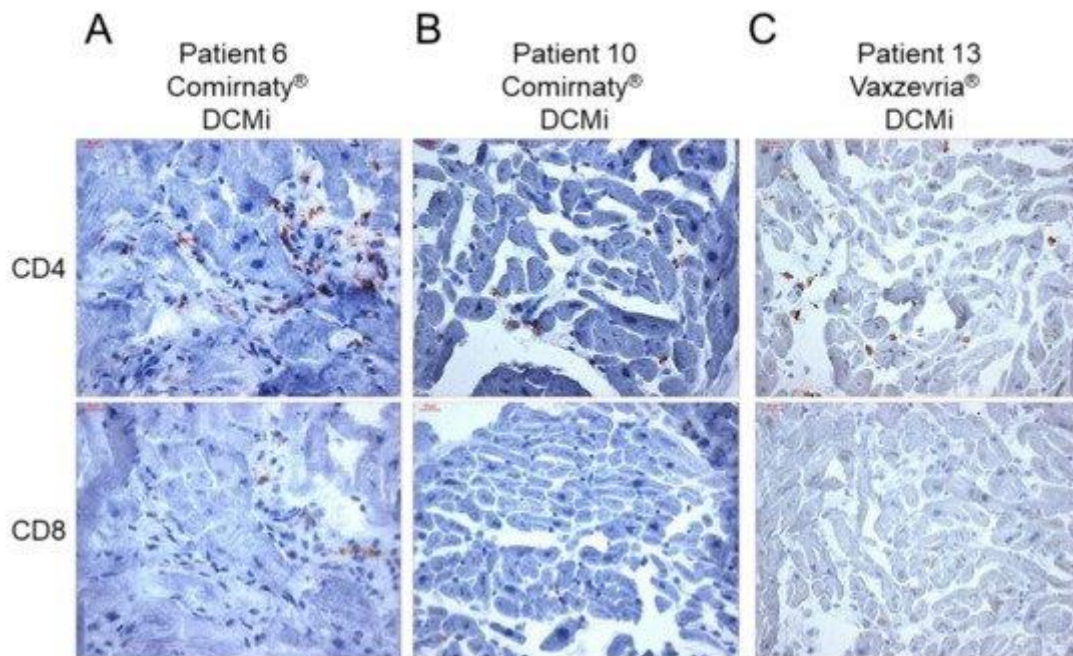


Figura 3. La cardiomiopatia infiammatoria in risposta alla vaccinazione COVID-19 è dominata dalle cellule T CD4. (A–C) Colorazioni immunoistochimiche rappresentative di cellule T CD4 e CD8 in biopsie endomiocardiche da pazienti diagnosticati per cardiomiopatia infiammatoria (DCMi) dopo aver ricevuto rispettivamente i vaccini Comirnaty (panel A e B, pazienti 6 e 10) o Vaxzevria (panel C, paziente 13). La colorazione immunoistochimica è stata quantificata mediante analisi di immagini digitali e il rapporto CD4-CD8 è rappresentato per ciascun paziente nella [Tabella 2](#). Ingrandimento 400×. Barre di scala 20 µm. +++®®

3. Discussione

Nel presente studio, abbiamo identificato 14/15 (93%) pazienti con sospetta miocardite dopo vaccinazione COVID-19, con infiammazione miocardica dimostrata da EMB. Quattro di loro avevano miocardite acuta (compresa miocardite attiva e miocardite a cellule giganti) e 10 sono stati diagnosticati per cardiomiopatia infiammatoria (DCMi). L'assenza di infiammazione negli EMB di un paziente potrebbe essere spiegata da un errore di campionamento. L'insorgenza dei sintomi variava da 0 a 56 giorni, che è nell'intervallo dei precedenti risultati epidemiologici [17]. Anche se non è possibile stabilire una relazione causale, le ragioni infettive della miocardite erano state escluse dalla diagnostica molecolare dei patogeni virali più rilevanti (incluso SARS-CoV-2). Sebbene i genomi virali latenti di B19V siano stati trovati in 10/15 (67%) casi, la trascrizione attiva di B19V non è stata confermata in questi pazienti. B19V è la specie virale più frequentemente rilevata nel cuore umano e il suo contributo all'infiammazione miocardica e quindi, all'esito a lungo termine del paziente, dipende fortemente dalla sua attività trascrizionale [18,19]. Pertanto, le infezioni latenti da B19V identificate sono improbabili causa dell'infiammazione miocardica in questi pazienti.

Poiché le infezioni virali sono state escluse come causa di miocardite / infiammazione miocardica, i meccanismi autoimmunologici potrebbero essere una spiegazione. La cross-reattività degli anticorpi della proteina spike con proteine contrattili miocardiche, la reattività immunitaria dell'mRNA e il coinvolgimento ormonale, sono stati discussi come potenziali meccanismi con cui i vaccini a mRNA COVID-19 inducono iperimmunità [20]. Nella presente coorte, la proteina spike

SARS-CoV-2 è risultata espressa sui cardiomiociti in 9 pazienti su 15. Pertanto, la proteina spike codificata con vaccino sembra raggiungere il cuore, dove potrebbe innescare una risposta infiammatoria, con conseguente sviluppo di miocardite o DCMi. Precedenti dati sui topi indicavano un'espressione intramiocardica della proteina spike dopo la vaccinazione con mRNA [21]; tuttavia, i dati umani sono scarsi. È interessante notare che, ad eccezione di cinque casi (AMC = 2, GCMC = 2 e DCMi = 1), il numero di linfociti T CD4 era uguale o superiore a quello delle cellule T CD8. Nella miocardite acuta, è noto uno spostamento del rapporto CD4-CD8 verso le cellule T CD8 [22], spiegando le cellule CD8 elevate nei pazienti AMC e GCMC. Tuttavia, poiché le cellule T CD4 sono considerate il principale driver della miocardite autoimmune [20], i nostri dati supportano l'idea che l'infiammazione miocardica indotta dal vaccino sia una conseguenza di un'eccessiva infiltrazione di cellule T CD4 e, quindi, un potenziale driver di danno miocardico autoimmunologico. Inoltre, l'espressione di HLA-DR è aumentata in 11 dei 14 (79%) pazienti con infiammazione evidente. A causa del fatto che le regioni HLA di classe II si associano fortemente a diverse malattie autoimmuni [20], l'induzione di HLA-DR in risposta alla vaccinazione supporta un contributo autoimmunologico all'infiammazione miocardica dopo la vaccinazione. L'espressione delle molecole di adesione ICAM-1 e VCAM-1 sull'endotelio (micro)vascolare cardiaco è sovraregolata in caso di infezione da virus associati alla miocardite [23]. Oltre a un paziente con AMC (paziente 2) e un paziente con GCMC (paziente 14), nessuno dei pazienti ha mostrato un aumento dei livelli di ICAM-1 e VCAM-1, sostenendo un'origine non infettiva dell'infiammazione osservata. Il danno cardiaco mediato dalla perforina è noto per essere coinvolto nella miocardite virale [24,25] e acuta idiopatica [26]. È interessante notare che nessuno dei pazienti ha mostrato una maggiore presenza di cellule di perforina, indicando nessun contributo di eventi citotossici a seguito della vaccinazione COVID-19. Inoltre, i dati sulle cellule di perforina in pazienti con LVEF ridotto mostrano che la mancanza di infiltrati cardiaci di perforina è associata a un miglioramento spontaneo della LVEF [23]. Pertanto, si potrebbe presumere un miglioramento della funzione cardiaca, come descritto per la maggior parte dei pazienti con miocardite correlata al vaccino [13].+++++

Tra la diagnostica EMB, sono state utilizzate tecniche di imaging non invasive per identificare la miocardite correlata al vaccino COVID-19 [2,3,4,5,6,7]. Oltre ai marcatori cMRI come il rapporto ponderato T2, il miglioramento precoce del gadolinio e il miglioramento tardivo del gadolinio all'interno dei criteri di Lake Louise e la tomografia a emissione di positroni / tomografia computerizzata (PET / CT) del recettore della somatostatina sono stati applicati per la diagnosi di miocardite dopo la vaccinazione COVID-19 [27]. Tuttavia, poiché le tecniche di imaging cardiaco forniscono informazioni utili, ma limitate sull'infiammazione miocardica grave, non sono in grado di correlarsi con un'infiammazione lieve e la persistenza virale. La presente serie di casi rivela che la cMRI è stata in grado di rilevare l'infiammazione miocardica solo nel 33,3% (2/6) dei casi (**Tabella 1**). Pertanto, l'EMB rimane lo standard definito nella diagnosi di cardiomiopatia virale e infiammatoria.

Limitazioni dello studio

Ci sono diversi limiti di questo studio che devono essere considerati quando si interpretano i risultati ottenuti. In primo luogo, nessuna causalità può essere assunta o stabilita a causa della mancanza di un gruppo di controllo e del carattere osservativo di una serie di casi. Sebbene siano state escluse altre cause di infiammazione miocardica, non vi è alcuna evidenza diretta di una risposta infiammatoria indotta dal vaccino nei casi presentati. In secondo luogo, non è possibile determinare un'incidenza di miocardite/cardiomiopatia infiammatoria mediata da vaccino a causa dell'approccio selettivo di scelta dei casi con sospetto di miocardite dopo la vaccinazione COVID-19 e della contemporanea disponibilità di EMB. In terzo luogo, vi è una mancanza di dati clinici estesi per tutti i pazienti trattati in questo studio multicentrico e i dati clinici e le valutazioni sono stati raccolti da diversi medici. Infine, il tipo di vaccino e l'insorgenza dei sintomi dopo la prima o la seconda dose differiscono tra i casi e sono quindi difficili da confrontare.

4. Materiali e metodi

4.1. Pazienti e indagini cliniche

In totale, 15 pazienti (età mediana 38 (31-52) anni; 9 uomini) provenienti da 11 diverse cliniche sono stati inclusi in questo studio multicentrico. Per tutti i pazienti, il sospetto clinico di miocardite dopo la vaccinazione COVID-19 è stato espresso dal medico responsabile a causa di una relazione temporale tra la vaccinazione e l'insorgenza dei sintomi della miocardite. Tutti i pazienti sono stati sottoposti a indagini cliniche chiave tra cui test di laboratorio, ecocardiografia ed elettrocardiogramma, e alcuni pazienti ($n = 6$) sono stati sottoposti a risonanza magnetica cardiaca aggiuntiva (cMRI) [28]. Inoltre, gli EMB sono stati ottenuti da ciascun paziente e inviati all'Istituto per la diagnostica e la terapia cardiaca (IKDT, Berlino, Germania), per il lavoro di routine tra cui istologia, immunoistochimica e virologia molecolare. La decisione di eseguire l'EMB è stata presa dal medico curante in base all'impostazione di insufficienza cardiaca inspiegabile e insorgenza improvvisa di grave insufficienza ventricolare sinistra [29]. La malattia coronarica e altre possibili cause di disfunzione miocardica sono state escluse dall'angiografia prima dell'EMB in tutti i pazienti. La frazione di eiezione ventricolare sinistra (LVEF) è stata determinata mediante ecocardiografia con il metodo Simpson. Tutti i dati numerici sono presentati con intervallo mediano e interquartile.

4.2. Virologia molecolare degli EMB

Immediatamente dopo il ritiro degli EMB, i campioni sono stati trasferiti alla soluzione RNAlater per la stabilizzazione degli acidi nucleici (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Il DNA totale è stato estratto da Genra Puregene Kits (Qiagen, Hilden, Germania) secondo le istruzioni del produttore [16]. L'isolamento totale dell'RNA è stato eseguito utilizzando il reagente TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), seguito dal trattamento con DNase (Promega, Walldorf, Germania) e dalla sintesi del cDNA utilizzando il kit di trascrizione inversa di cDNA ad alta capacità (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e primer esamerali casuali (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) [19]. Quindi, il rilevamento di genomi virali tra cui Parvovirus B19 (B19V), Enterovirus (inclusi Coxsackievirus B3 ed Echovirus), Adenovirus, virus epstein-Barr, Herpesvirus umano 6 e Sindrome respiratoria acuta grave Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) è stato effettuato utilizzando la reazione a catena della polimerasi nidificata (NESTED-PCR) e la trascrittasi inversa quantitativa (qRT)-PCR, come descritto prima [19,30].

4.3. Istologia, immunoistochimica e analisi di imaging digitale

Gli esami istologici sono stati effettuati su campioni fissati in formalina, incorporati in paraffina, colorati con ematossilina ed eosina (H & E) e macchie tricrome secondo procedure standard [31]. La miocardite attiva è stata diagnosticata secondo i criteri istomorfologici di Dallas [32]. Per la qualificazione e la quantificazione degli infiltrati infiammatori, la colorazione immunoistochimica è stata effettuata su EMB crio-incorporati fissati da RNAlater, come descritto prima [31]. L'infiammazione miocardica è stata diagnosticata dalla presenza di leucociti ≥ 14 con la presenza di cellule T CD3 secondo la dichiarazione di posizione della Società Europea di Cardiologia (ESC) [33]. Inoltre, il numero di linfociti CD11a/LFA-1 (soglia ≥ 14 cellule/mm⁺⁺²), macrofagi CD11b/MAC-1 (soglia ≥ 40 cellule/mm⁺⁺²), celle di memoria T CD45R0 (soglia ≥ 50 celle/mm⁺⁺²), cellule citotossiche di perforina (soglia $\geq 2,9$ cellule/mm⁺⁺²), e sono state determinate cellule che presentano HLA-DR (soglia \geq area 4,6%). Inoltre, è stato analizzato il rapporto tra cellule T CD4 e CD8. L'attivazione tissutale ed endoteliale è stata misurata mediante l'espressione della molecola di adesione intercellulare 1 (ICAM-1, soglia \geq area 2,8%) e della molecola di adesione cellulare vascolare 1 (VCAM-1, soglia \geq area 0,08%). Tutti i marcatori immunoistochimici sono stati quantificati utilizzando l'analisi di imaging digitale, come descritto in precedenza [23]. Il rilevamento della proteina spike SARS-CoV-2 è stato eseguito su EMB incorporati in paraffina utilizzando un anticorpo appropriato (GeneTex, 1A9, GTX632604; 1:100) [34]. Il tessuto cardiaco autoptico di un paziente confermato da SARS-CoV-2 qRT-PCR è stato utilizzato come controllo positivo.+++

5. Conclusioni

Il presente studio riassume la diagnostica basata su EMB di 15 pazienti con sospetto clinico di miocardite dopo la vaccinazione contro SARS-CoV-2. Identifica 14 su 15 pazienti con infiammazione

miocardica, che vanno dalla cardiomiopatia infiammatoria alla miocardite attiva e alla grave miocardite a cellule giganti. Sebbene una relazione causale tra la vaccinazione e l'insorgenza di infiammazione miocardica non possa essere stabilita sulla base dei risultati, il rilevamento cardiaco della proteina spike, l'infiammazione dominata dalle cellule T CD4 e la stretta relazione temporale sostengono una reazione autoimmune innescata dal vaccino.⁺

Contributi dell'autore

Concettualizzazione, C.B., F.E. e H.-P.S.; metodologia, C.B., G.A. e D.H.; analisi formale, C.B., G.A., D.H. e U.G.; indagine, C.B., G.A., D.H., U.G., C.H., B.A., R.W., M.K., S.R., P.W., T.M., A.E., M.G., C.P., A.B., M.F., T.K., J.B. e F.E.; scrittura: preparazione della bozza originale, C.B.; scrittura: revisione e modifica, C.B.; acquisizione di finanziamenti, G.A., F.E. e H.-P.S. Tutti gli autori hanno letto e accettato la versione pubblicata del manoscritto.

Finanziamento

Questa ricerca è stata finanziata da una sovvenzione ProFIT della INVESTITIONSBANK BERLIN (IBB)/cofondata dal Fondo europeo di sviluppo regionale (EFRE), numeri di sovvenzione 10169096, 10169098 10169028.

Dichiarazione del comitato di revisione istituzionale

Lo studio è stato condotto in conformità con la Dichiarazione di Helsinki e approvato dall'Institutional Review Board presso il Campus Benjamin Franklin, Charité, Berlino (EA4/236/20, 27 dicembre 2020).

Dichiarazione di consenso informato

Il consenso informato è stato ottenuto da tutti i soggetti coinvolti nello studio.

Dichiarazione sulla disponibilità dei dati

Tutti gli autori confermano che tutti i dati correlati a sostegno dei risultati di questo studio sono forniti nell'articolo.

Riconoscimenti

Gli autori ringraziano Susanne Ochmann, Kitty Winter, Jenny Klostermann, Katrin Errami (IKDT Berlin) e Hannes Jarmuth (Charite Berlin) per la loro abile assistenza tecnica. Inoltre, ringraziamo Dirk Westermann e Diana Lindner dell'University Heart and Vascular Center di Amburgo per aver fornito il controllo SARS-CoV-2-positivo.

Conflitti di interesse

Gli autori non dichiarano alcun conflitto di interessi. I finanziatori non hanno avuto alcun ruolo nella progettazione dello studio; nella raccolta, analisi o interpretazione dei dati; nella stesura del manoscritto, o nella decisione di pubblicare i risultati.

Referenze

1. Centri CDC per il controllo e la prevenzione delle malattie. Miocardite e pericardite a seguito della vaccinazione MRNA COVID-19. Disponibile online: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/vaccines/safety/myocarditis.html> (consultato il 6 aprile 2022).
2. Minocha, P.K.; Meglio, D.; Singh, R.K.; Hoque, T. Recidiva della miocardite acuta temporalmente associata alla ricezione del vaccino contro la malattia da coronavirus MRNA 2019 (COVID-19) in un adolescente maschio. *J. Pediatra.* **2021**, *238*, 321–323. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
3. Muthukumar, A.; Narasimhan, M.; Li, Q.-Z.; Mahimainathan, L.; Hitto, I.; Fuda, F.; Batra, K.; Jiang, X.; Zhu, C.; Schoggins, J.; et al. Valutazione approfondita di un caso di presunta miocardite dopo la seconda dose del vaccino MRNA COVID-19. *Circolazione* **2021**, *144*, 487–498. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. McLean, K.; Johnson, T.J. Miopericardite in un maschio adolescente precedentemente sano dopo la vaccinazione COVID-19: un caso clinico. *Emerg. Med.* **2021**, *28*, 918–921. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. D'Angelo, T.; Cattafi, A.; Carerj, M.L.; Booz, C.; Ascenti, G.; Cicerone, G.; Blandino, A.; Mazziotti, S. Miocardite dopo la vaccinazione SARS-CoV-2: una reazione indotta dal vaccino? *Can. J. Cardiol.* **2021**, *37*, 1665–1667. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
6. Alberto, E.; Aurigemma, G.; Saucedo, J.; Gerson, D.S. Miocardite a seguito della vaccinazione COVID-19. *Radiol.* **2021**, *16*, 2142–2145. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Bautista García, J.; Peña Ortega, P.; Bonilla Fernández, J.A.; Cárdenes León, A.; Ramírez Burgos, L.; Caballero Dorta, E. Miocardite acuta dopo la somministrazione del vaccino BNT162b2 contro COVID-19. *Rev. Española Cardiol.* **2021**, *74*, 812–814. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
8. Nagasaka, T.; Koitabashi, N.; Ishibashi, Y.; Aihara, K.; Takama, N.; Ohyama, Si; Yokoyama, T.; Kaneko, Y. Miocardite acuta associata alla vaccinazione COVID-19: un caso clinico. *J. Cardiol. Casi* **2021**, *25*, 285–288. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
9. Matta, A.; Kunadharaju, R.; Osman, M.; Jesme, C.; McMiller, Z.; Johnson, E.M.; Matta, D.; Kallamadi, R.; Bande, D. Presentazione clinica e risultati della miocardite dopo la vaccinazione MRNA: una meta-analisi e una revisione sistematica. *Cureus* **2021**, *13*, e19240. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
10. Punti salienti della riunione dell'Agenzia europea per i medicinali dal comitato di valutazione dei rischi per la farmacovigilanza (PRAC) 29 novembre-2 dicembre 2021. Disponibile online: <https://www.ema.europa.eu/en/news/meeting-highlights-pharmacovigilance-risk-assessment-committee-prac-29-november-2-december-2021> (consultato il 1° aprile 2022).
11. Verma, A.K.; Lavine, K.J.; Lin, C.-Y. Miocardite dopo vaccinazione MRNA COVID-19. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *385*, 1332–1334. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
12. Viskin, D.; Topilsky, Y.; Aviram, G.; Mann, T.; Sadon, S.; Hadad, Y.; Selce, N.; Shmilovich, H.; Banai, S.; Havakuk, O. Miocardite associata alla vaccinazione COVID-19: ecocardiografia, tomografia cardiaca e risultati di risonanza magnetica. *Circ. Cardiovasc. Imaging* **2021**, *14*, e013236. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
13. Salah, H.M.; Mehta, J.L. Vaccino COVID-19 e miocardite. *Am. J. Cardiol.* **2021**, *157*, 146–148. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Kadwalwala, M.; Chadha, B.; Ortoleva, J.; Joyce, M. Multimodality Imaging and Histopathology in a Young Man Presenting with Fulminant Lymphocytic Myocarditis and Cardiogenic Shock after MRNA-1273 Vaccination. *CASO BMJ Rep.* **2021**, *14*, e246059. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

15. Ehrlich, P.; Klingel, K.; Ohlmann-Knafo, S.; Hüttinger, S.; Sood, N.; Pickuth, D.; Kindermann, M. Miocardite linfocitica comprovata da biopsia dopo la prima vaccinazione MRNA COVID-19 in un maschio di 40 anni: caso clinico. *Clin. Res. Cardiol.* **2021**, *110*, 1855–1859. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
16. Escher, F.; Pietsch, H.; Aleshcheva, G.; Bock, T.; Baumeier, C.; Elsaesser, A.; Wenzel, P.; Hamm, C.; Westenfeld, R.; Schultheiss, M.; et al. Rilevazione di genomi virali SARS-CoV-2 e cambiamenti istopatologici nelle biopsie endomiocardiche. *ESC Ascolta. Fallire.* **2020**, *7*, 2440–2447. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Witberg, G.; Barda, N.; Hoss, S.; Richter, I.; Wiessman, M.; Aviv, Stati Uniti; Grinberg, T.; Auster, O.; Dagan, N.; Balicer, R.D.; et al. Miocardite dopo la vaccinazione COVID-19 in una grande organizzazione sanitaria. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *385*, 2132–2139. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Escher, F.; Aleshcheva, G.; Pietsch, H.; Baumeier, C.; Gross, Stati Uniti; Schrage, B.N.; Westermann, D.; Bock, C.-T.; Schultheiss, H.-P. L'infezione da parvovirus attivo trascrizionale B19 predice l'esito avverso a lungo termine nei pazienti con cardiomiopatia non ischemica. *Biomedicina* **2021**, *9*, 1898. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Pietsch, H.; Escher, F.; Aleshcheva, G.; Lassner, D.; Bock, C.-T.; Schultheiss, H.-P. Rilevamento di MRNA di parvovirus come marcatori per l'attività virale nella diagnosi basata sulla biopsia endomiocardica di pazienti con insufficienza cardiaca inspiegabile. *Rep. Sci.* **2020**, *10*, 22354. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Vdovenko, D.; Eriksson, U. Regulatory Role of CD4 T Cells in Myocarditis. *J. Immunol. Res.* **2018**, *2018*, 4396351. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Li, C.; Chen, Y.; Zhao, Y.; Lung, D.C.; Ye, Z.; Song, W.; Liu, F.-F.; Cai, J.-P.; Wong, W.-M.; Yip, C.C.-Y.; et al. Intravenous Injection of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) MRNA Vaccine Can Induce Acute Myopericarditis in Mouse Model. *Clin. Infect. Dis.* **2021**, *73*, 2372–2373. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
22. Jurcova, I.; Rocek, J.; Bracamonte-Baran, W.; Zelizko, M.; Netuka, I.; Maluskova, J.; Kautzner, J.; Cihakova, D.; Melenovsky, V.; Maly, J. Complete Recovery of Fulminant Cytotoxic CD8 T-cell-mediated Myocarditis after ECMELLA Unloading and Immunosuppression. *ESC Heart Failure* **2020**, *7*, 1976–1981. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
23. Escher, F.; Kühl, U.; Lassner, D.; Stroux, A.; Gross, U.; Westermann, D.; Pieske, B.; Poller, W.; Schultheiss, H. High Perforin-Positive Cardiac Cell Infiltration and Male Sex Predict Adverse Long-Term Mortality in Patients with Inflammatory Cardiomyopathy. *J. Am. Heart Assoc.* **2017**, *6*, e005352. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
24. Gebhard, J.R.; Perry, C.M.; Harkins, S.; Lane, T.; Mena, I.; Asensio, V.C.; Campbell, I.L.; Whitton, J.L. Coxsackievirus B3-Induced Myocarditis. *Am. J. Pathol.* **1998**, *153*, 417–428. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
25. Seko, S.; Shinkai, Y.; Kawasaki, A.; Yagita, H.; Okumura, K.; Takaku, F.; Yazaki, Y. Espressione di perforina nelle cellule infiltranti nei cuori murini con miocardite acuta causata da Coxsackievirus B3. *Circolazione* **1991**, *84*, 788–795. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Giovane, L.; Joag, S.; Zheng, L.; Giovane, J.; Lee, C.; Lee, Y. Danno miocardico mediato da perforin nella miocardite acuta. *Lancet* **1990**, *336*, 1019–1021. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
27. Bollano, E.; Bergh, N.; Dudás, A.; Bobbio, E.; Polte, C.L. Somatostatina Receptor Positron Emission Tomography/Computed Tomography in Myocarditis Following MRNA COVID-19 Vaccination. *Eur. Hear. J. Case Rep.* **2022**, *6*, ytac117. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

28. Lampejo, T.; Durkin, S.M.; Bhatt, N.; Guttmann, O. Miocardite acuta: eziologia, diagnosi e gestione. *Clin. Med.* **2021**, *21*, e505–e510. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Cooper, L.T.; Baughman, K.L.; Feldman, A.M.; Frustaci, A.; Jessup, M.; Kuhl, Stati Uniti; Levine, G.N.; Narula, J.; Storno, R.C.; Towbin, J.; et al. Il ruolo della biopsia endomiocardica nella gestione delle malattie cardiovascolari. *Circolazione* **2007**, *116*, 2216–2233. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
30. Pietsch, H.; Escher, F.; Aleshcheva, G.; Baumeier, C.; Morawietz, L.; Elsaesser, A.; Schultheiss, H.-P. Prova dei genomi SARS-CoV-2 nella biopsia endomiocardica con latenza dopo infezione acuta. *Int. J. Infettare. Dis.* **2021**, *102*, 70–72. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
31. Baumeier, C.; Escher, F.; Aleshcheva, G.; Pietsch, H.; Schultheiss, H.-P. L'inibitore dell'attivatore del plasminogeno-1 riduce la fibrosi cardiaca e promuove la polarizzazione dei macrofagi M2 nella cardiomiopatia infiammatoria. *Cardiol.* **2021**, *116*, 1. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
32. Aretz, H.T. Miocardite: i criteri di Dallas. *Colmo. Pathol.* **1987**, *18*, 619–624. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
33. Caforio, A.L.P.; Pankuweit, S.; Arbustini, E.; Basso, C.; Gimeno-Blanes, J.; Felix, S.B.; Fu, M.; Heliö, T.; Heymans, S.; Jahns, R.; et al. Stato attuale delle conoscenze su eziologia, diagnosi, gestione e terapia della miocardite: una dichiarazione di posizione del gruppo di lavoro della Società europea di cardiologia sulle malattie miocardiche e pericardiche. *Eur. Cuore J.* **2013**, *34*, 2636–2648. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Dal Ferro, M.; Bussani, R.; Paldino, A.; Nuzzi, V.; Collesi, C.; Zentilin, L.; Schneider, E.; Correa, R.; Silvestri, F.; Zacchigna, S.; ET al. SARS-CoV-2, Lesioni miocardiche e infiammazione: approfondimenti da un ampio studio clinico e autoptico. *Clin. Res. Cardiol.* **2021**, *110*, 1822–1831. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]