

Immunvermittelte Sinus- und Hirnvenenthrombosen: VITT und prä-VITT als Modellerkrankung

Cerebral Venous and Sinus Thrombosis with Immunological Pathogenesis: VITT and Pre-VITT

Autoren

Farid Salih¹, Linda Schönborn², Matthias Endres¹, Andreas Greinacher²

Institute

- 1 Klinik für Neurologie mit Experimenteller Neurologie, Charité Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany
- 2 Institut für Transfusionsmedizin, Universitätsmedizin Greifswald, Greifswald, Germany

Schlüsselwörter

VITT, prä-VITT, Sinusvenenthrombose

Key words

VITT, pre-VITT, cerebral venous sinus thrombosis

online publiziert 02.11.2022

Bibliografie

Akt Rheumatol 2022; 47: 490–501

DOI 10.1055/a-1936-3123

ISSN 0341-051X

© 2022. Thieme. All rights reserved.

Georg Thieme Verlag, Rüdigerstraße 14,
70469 Stuttgart, Germany

Korrespondenzadresse

Dr. Farid Salih
Charité Universitätsmedizin Berlin
Klinik für Neurologie mit Experimenteller Neurologie
Augustenburger Platz 1
13353 Berlin
Germany
Tel.: +4930450660188,
farid.salih@charite.de

ZUSAMMENFASSUNG

In diesem Übersichtsartikel beschreiben wir die klinischen und paraklinischen Charakteristika der Vakzin-induzierten immunthrombotischen Thrombozytopenie (VITT) und fassen den gegenwärtigen Kenntnisstand zur Pathogenese zusammen. Bei der VITT bilden sich 5–20 Tage nach einer Impfung mit einem Adenovirus-vektorbasiertem SARS-CoV-2-Vakzin (AstraZeneca oder Johnson & Johnson) lebensbedrohliche Thrombosen aus, vor allem in den zerebralen Sinus und Hirnvenen.

Laborchemisch zeigt sich eine typische Thrombozytopenie mit erhöhten D-Dimeren. Der Pathogenese liegen immunologische Prozesse zugrunde, die Ähnlichkeiten mit der Heparin-induzierten Thrombozytopenie aufweisen: so geht die VITT mit hochtitrigem Immunglobulin G gegen das thrombozytäre Protein Plättchenfaktor 4 (PF4) einher. Durch die Interaktion mit dem Impfstoff wird PF4 so verändert, dass es von Antikörper-produzierenden Zellen des Immunsystems erkannt wird. Die so produzierten Anti-PF4-Antikörper führen über thrombozytäre Fcγ1-Rezeptoren zu einer Plättchenaktivierung. Der Nachweis plättchenaktivierender Anti-PF4-Antikörper bestätigt die Diagnose einer VITT. Antikoagulanzen, die die Bildung von Thrombin oder Thrombin selbst blockieren und hochdosiertes i. v.-Immunglobulin G, das die Fcγ-Rezeptor-vermittelte Zellaktivierung inhibiert, stellen die wirksame und kausale Behandlung der VITT dar. Bei Patienten mit katastrophalem Verlauf kann ein Plasmaaustausch versucht werden. Bei einigen Patienten ist ein prä-VITT Syndrom als Prodromalstadium zu beobachten, das sich typischerweise mit Kopfschmerzen manifestieren kann und dessen frühe Behandlung hilft, thrombotische Komplikationen zu vermeiden. Die spezifische Dynamik der VITT-assoziierten Immunreaktion entspricht einer transienten, sekundären Immunantwort. Aktuelle Studien gehen der Frage nach, wie PF4 an unterschiedliche adenovirale Proteine bindet und beleuchten die Rolle von anderen Impfstoff-Bestandteilen als potentielle Liganden für die PF4-Bindung. Einige dieser Faktoren sind auch an der Etablierung eines proinflammatorischen Milieus („danger signal“) beteiligt, das unmittelbar nach der Impfung die 1. Phase der VITT-Pathogenese triggert. Sobald in der 2. Phase der VITT-Pathogenese hohe Titer von Anti-PF4-Antikörper gebildet sind, aktivieren diese neben Thrombozyten auch Granulozyten. In einem als NETose (von „neutrophil extracellular traps“) bezeichneten Prozess setzen aktivierte Granulozyten dabei DNA frei, mit der PF4 weitere Komplexe bildet, an die Anti-PF4-Antikörper binden. Dies verstärkt die Fcγ-Rezeptor-vermittelte Zellaktivierung weiter mit der Folge einer ausgeprägten Thrombin-Bildung. Zum Ende des Artikels geben wir einen Ausblick, welchen Einfluss die bisherigen Erkenntnisse zur VITT auf weitere globale Impfkampagnen gegen SARS-CoV-2 haben und beleuchten, wie Anti-PF4-Antikörper jenseits von VITT und HIT auch

eine Rolle bei seltenen Erkrankungen spielen, die mit rezidivierenden venösen und arteriellen Thrombosen einhergehen.

ABSTRACT

In this review, we summarise the current knowledge on vaccine-induced immune thrombotic thrombocytopenia (VITT) and new insights into its underlying pathogenesis. VITT is characterised by severe thromboses occurring 5–20 days after vaccination with an adenoviral vector-based SARS-CoV-2 vaccine (AstraZeneca or Johnson & Johnson). Thromboses typically involve the cerebral sinus and venous system. Routine laboratory analyses show thrombocytopenia and high D-dimer levels. The pathogenesis is based on immunological processes similar to those in heparin-induced thrombocytopenia. Accordingly, VITT is associated with high-titre immunoglobulin G directed against platelet factor 4 (PF4). Interaction with adenoviral vector-based vaccines leads to modifications of PF4 allowing antibody-producing cells to identify PF4. Anti-PF4 antibodies activate platelets through FcγIIa receptors. The detection of platelet-activating anti-PF4 antibodies confirms the diagnosis of VITT. Treatment is based on anticoagulation, which inhibits thrombin itself or thrombin formation, and high-dose intrave-

nous immunoglobulin G, which inhibits cell activation via FcγIIa receptors. In severe cases, plasma exchange could also be an option. In some patients, a pre-VITT syndrome precedes VITT. Pre-VITT patients typically present with severe headache before thromboses are manifest. The early identification of a pre-VITT syndrome allows for the prevention of thrombotic complications. The specific dynamics of the immune reaction in VITT correspond to a transient, secondary immune response. Current studies address how PF4 binds to different adenoviral proteins and investigate the functional role of other vaccine components. Some of these factors contribute to the induction of a pro-inflammatory “danger signal” that triggers the first stage of VITT pathogenesis. In the second stage, high-titre anti-PF4 antibodies activate platelets and granulocytes. In a process called NETosis (“neutrophil extracellular traps”), activated granulocytes release DNA. Anti-PF4 antibodies then bind to complexes of PF4 and DNA. This enhances further cell activation via Fcγ receptors and consequently also the formation of thrombin. At the end of the article, we comment on how the current knowledge on VITT may influence global vaccination campaigns against SARS-CoV-2 and we address how anti-PF4 antibodies may be involved in recurrent arterial and venous thromboses not associated with VITT and HIT.

Klinische Präsentation

Mit der Zulassung der ersten Impfstoffe gegen das *severe acute respiratory syndrome coronavirus-2* (SARS-CoV-2) durch die Europäische Arzneimittelagentur (EMA) verband sich Ende des Jahres 2020 die Aussicht, ein wirksames Mittel zur Eindämmung der *coronavirus infection disease 2019* (COVID-19) Pandemie zur Verfügung zu haben. Nur wenige Wochen nach dem Start der Impfkampagne kam es im März 2021 allerdings zu ersten Meldungen über schwere post-vakzinale Komplikationen. Betroffen waren Personen, die einen der Adenovirus-vektorbasierten Impfstoffe der beiden Firmen AstraZeneca (ChAdOx1 nCoV-19) oder später Johnson & Johnson (AD26.COVS.2) erhielten [1, 2]. ChAdOx1 nCoV-19 basiert auf einem rekombinanten Schimpansen-Adenovirus-Vektor, bei AD26.COVS.2 handelt es sich um einen rekombinanten humanen Adenovirus Typ 26 Vektor [1]. Beide übertragen DNA in die humane Muskelzelle, die das Spike-Glykoprotein von SARS-CoV-2 enkodiert. Die Produktion der Adenovirus-Vektoren erfolgt in humanen Zellkulturen (T-REx-293 Zellen [humane embryonale Nierenzellen], ein HEK293 Derivat und PER.C6 TetR Zellen [humane embryonale Retinazellen]) [3–5].

Das klinische Bild dieser Impfkomplication ist geprägt von ungewöhnlichen Thrombosen, vor allem in den Hirn- und Sinusvenen. In einer größeren Fallserie (n = 220) zur VITT aus dem Vereinigten Königreich wiesen 50 % der Patienten Sinus- und Hirnvenenthrombosen auf, gefolgt von Lungenarterienembolien (29 %), Thrombosen im Splanchnikusgebiet (19 %) und tiefe Beinvenenthrombosen (18 %) [6]. Bei 29 % der Patienten waren Gefäßterritorien von zwei oder mehr Organsystemen betroffen. Jeder fünfte Patient (21 %) wies auch arterielle Thrombosen auf.

Die aktuell international etablierten Bezeichnungen sind *Vaccine-induced immune thrombotic thrombocytopenia* (VITT) oder gemäß der World Health Organization (WHO) *Thrombosis with thrombocytopenia syndrome* (TTS). Der Begriff TTS sollte dabei eher als Überbegriff für das klinische Bild einer Thrombozytopenie mit Thrombosen nach Impfung verstanden werden. Wenn dann zusätzlich zu den klinischen Charakteristika plättchenaktivierende PF4-abhängige Antikörper nachgewiesen werden, sollte aus Sicht der Autoren weiterhin der Begriff VITT verwendet werden. Einige Patienten wurden beobachtet, die eine Thrombozytopenie und Thrombosen entwickelt haben, ohne dass funktionell aktive Anti-PF4-Antikörper gefunden worden. Es ist daher möglich, dass auch andere Mechanismen, als die in diesem Artikel beschriebenen Anti-PF4-Antikörper das Bild einer TTS auslösen.

Auch die COVID-19-Erkrankung selbst kann selten mit Sinus- und Hirnvenenthrombosen einhergehen. Ihre Häufigkeit wurde in einer aktuellen Meta-Analyse mit 0,8 pro 100.000 hospitalisierten COVID-19-Patienten angegeben [7]. Ähnlich wie bei der VITT kommt es hier in der Mehrzahl der Fälle zur Manifestation multipler Thrombosen an unterschiedlichen Stellen des zerebralen Sinus- und Venensystems. Parenchymatöse Stauungsblutung treten in bis zu 42 % der Fälle auf und die Krankenhaus-Mortalität ist mit 40 % ebenfalls hoch [7]. Die Pathophysiologie der COVID-19-assoziierten Sinus- und Hirnvenenthrombosen ist bislang nicht geklärt und anders als bei der VITT konnten bislang keine Frühindikatoren identifiziert werden.

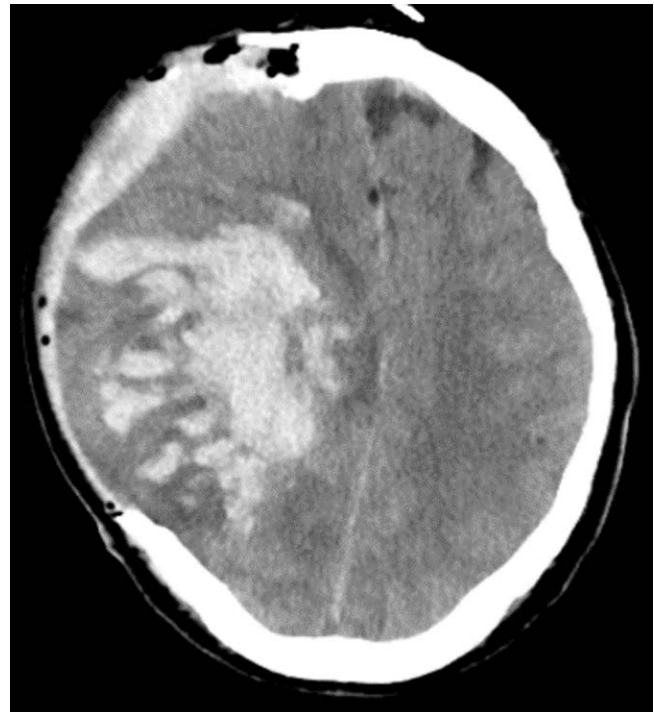
Bei der VITT manifestieren sich die Thrombosen in der Regel 5–20 Tage nach der Impfung. Bislang sind nahezu alle publizierten VITT-Fälle nach der ersten Impfung mit dem ChAdOx1 nCoV-19- oder AD26.COVS.2Vakzin aufgetreten. Erst kürzlich wurde aus

einer europäischen Registerstudie der erste sichere Fall einer VITT beschrieben, die nach der 2. Impfung mit ChAdOx1 nCoV-19 aufgetreten ist [8]. Die Tatsache, dass die 2. Impfung gegen SARS-CoV-2 in vielen europäischen Ländern seltener mit dem ChAdOx1 nCoV-19-Vakzin durchgeführt wurde, erklärt die viel seltener dokumentierten VITT-Fälle nach der 2. Impfung nicht ausreichend. Die Ursache hierfür liegt vermutlich in der spezifischen PF4-vermittelten Immunreaktion, die der Pathogenese der VITT zugrundeliegt.

Laborchemisch weisen die Betroffenen eine Kombination aus erniedrigter Thrombozytenzahl und stark erhöhten D-Dimeren auf. Die Letalität in den ersten publizierten Fallserien lag bei bis zu 60 % [9–11]. Vor allem das Ausmaß der Thrombozytopenie und die Manifestation intrakranieller Blutungen ist mit einer erhöhten Letalität verbunden [6]. Viele der Betroffenen waren zuvor gesund und wiesen keine relevanten Vorerkrankungen auf. Verglichen mit Sinus- und Hirnvenenthrombosen anderer Ätiologien sind die klinischen Verläufe bei der VITT schwerer [12]. Patienten mit einer VITT weisen doppelt so häufig intrazerebrale Blutungen auf (68 vs. 35 % bei nicht VITT-assoz. HSVT), haben eine 5-fach erhöhte Wahrscheinlichkeit ein Koma zu entwickeln (24 vs. 5 %) und müssen mehr als 4-mal so häufig auf einer Intensivstation behandelt werden (80 vs. 18 %) [12]. Die Manifestation von meist multiplen Mikro- und Makrothrombosen an unterschiedlichen Lokalisationen der zerebralen Sinus und Hirnvenen bei der VITT ist wahrscheinlich eine plausible Erklärung für die schwereren Verläufe VITT-assozierter Sinus- und Hirnvenenthrombosen im Vergleich zu einfachen Sinus- und Hirnvenenthrombosen. ► **Abb. 1** zeigt das Kopf-CT eines Patienten mit einer letal verlaufenden diffusen Sinus- und Hirnvenenthrombosierung und ausgedehnter intrazerebraler Stauungsblutung im Rahmen einer VITT. Es ist möglich, dass die hohe Rate intrakranieller Blutungen durch einen zweiten Antikörper gegen Thrombozyten begünstigt wird. In einem Mausmodell wurde kürzlich gezeigt, dass Adenoviren, die an die Thrombozyten binden, über die Thrombozyten in die Milz gebracht werden und dort mit B-Zellen reagieren [13]. Das Institut für Transfusionsmedizin der Universitätsmedizin Greifswald konnte bei ca. einem Viertel der Patienten mit VITT zusätzliche antithrombozytäre Antikörper nachweisen. Die Spezifität dieser Antikörper unterscheidet sich nicht von Antikörpern, die bei der typischen Autoimmun-Thrombozytopenie (ITP) gefunden werden [13].

Aufgrund der hohen Letalität und Morbidität der VITT stoppten im Frühjahr 2021 einige europäische Länder ihre Impfprogramme mit ChAdOx1 nCoV-19 (Oxford-AstraZeneca) und AD26.COV2.S (Johnson & Johnson). Zwei maßgebliche wissenschaftliche Erkenntnisse trugen dazu bei, frühzeitig die Impfkampagnen wieder aufzunehmen:

1. Bei der VITT handelt um eine sehr seltene Komplikation in der Größenordnung von 1–3 pro 100.000 Geimpfter (genaue Inzidenzwerte liegen nicht vor, das Risiko ist jedoch bei Menschen <60 Jahren höher). Die EMA und nationale Impfkommisionen konnten rasch feststellen, dass die Vorteile der Impfungen bei Weitem die potentiellen Risiken einer VITT übertreffen.
2. Es gelang früh die pathophysiologische Assoziation der VITT mit Thrombozyten-aktivierenden Antikörpern (IgG) gegen Plättchenfaktor-4 (PF4) aufzudecken und damit gezielte Therapiemöglichkeiten in Form von i. v.-Immunglobulinen (IVIg) und einer therapeutischen Antikoagulation zu etablieren [10].



► **Abb. 1** CT-Kopf eines Patienten mit letal verlaufender Hirn- und Sinusvenenthrombose bei VITT. Der Patient stellte sich mit Kopfschmerzen und einer zunehmenden Lähmung der linken Körperhälfte vor. Im initialen CCT zeigte sich eine ausgedehnte Stauungsblutung rechtshemisphärisch bei diffuser Thrombosierung des Sinus sagittalis superior und des angrenzenden Sinus rectus sowie einzelner Brückenvenen rechts frontal. Das hier dargestellte CT erfolgte nach dekompensiver Hemikraniektomie rechts und zeigt die weitere Progredienz der Blutung, die schließlich zum Hirnfunktionsausfall führte.

Zusätzlich hat die Beschreibung des Prä-VITT Syndroms, einem Prodromalstadium der VITT, zu dessen früher Erkennung und Therapie beigetragen. So können thrombotische und hämorrhagische Komplikationen der VITT frühzeitig erkannt und gegebenenfalls vermieden werden [14, 15]. Die Aufklärung der VITT-Pathogenese, die Etablierung spezifischer Therapien und die Früherkennung sind im Laufe des Jahres 2021 von einer beeindruckenden Reduktion der VITT-assoziierten Mortalität von 50 % auf 5 % begleitet worden [16].

Die aktuell gültigen Diagnosekriterien der VITT sind (*American Society of Hematology*, aktualisiert 9. Mai 2022 [17]):

1. Symptombeginn 4–42 Tage nach COVID-19 Impfung (ab Tag 20 vor allem Spätmanifestation mit tiefen Beinvenenthrombosen und Lungenarterienembolien)
2. Venöse oder arterielle Thrombose (häufig zerebral oder abdominal)
3. Thrombozytopenie (< 150.000/µl)
4. Positiver anti-PF4/Heparin-ELISA
5. Erhöhte D-Dimere (für VITT > 2 mg/l)

Es wird empfohlen, eine VITT-spezifische Behandlung zu beginnen, sobald die klinischen und laborchemischen Kriterien erfüllt sind (Thrombozytopenie oder erhöhte D-Dimere), bevor die Ergebnis-

se des anti-PF4-ELISA vorliegen [17]. Die meisten Fälle einer VITT zeigen klinisch und laborchemisch einen transienten monophasischen Verlauf mit einem Abfall der plättchenaktivierenden Anti-PF4-Antikörper nach wenigen Monaten [18]. Allerdings sind vereinzelt auch Patienten berichtet worden, bei denen plättchenaktivierende Anti-PF4-Antikörper über Monate persistierten und dabei zu einem erneuten Thrombozytenabfall sowie in Einzelfällen auch zu erneuten Thrombosen führten [19].

Die Pathogenese der VITT

Pathophysiologisch weist die VITT Überschneidungen mit der Heparin-induzierten Thrombozytopenie auf (HIT). Die mit der VITT assoziierten Anti-PF4-IgG-Antikörper aktivieren Blutplättchen über den thrombozytären FcγIIa-Rezeptor. Das Ausmaß der Plättchenaktivierung wird dabei durch PF4 gesteigert. Ähnlich wie bei der HIT liegt auch der VITT ein 2-stufiger Prozess zugrunde:

1. Stufe: Konformationsänderung von PF4 und gleichzeitige Induktion eines inflammatorischen Prozess („danger signal“) ⇒ Bildung von PF4-Antikörpern ⇒ Aktivierung von B-Zellen ⇒ Produktion von Anti-PF4-Antikörpern
2. Stufe (etwa 5–14d nach der Impfung): Hohe Titer von Anti-PF4-Antikörpern ⇒ Plättchenaktivierung über FcγIIa-Rezeptoren ⇒ Entwicklung klinisch manifester Thrombosen

Für das Verständnis der VITT-Pathogenese ist es hilfreich, zunächst die Rolle von PF4 und der Anti-PF4-Antikörper bei der Infektabwehr zu beleuchten.

Die Rolle von PF4 und Anti-PF4-Antikörpern bei der Infektabwehr

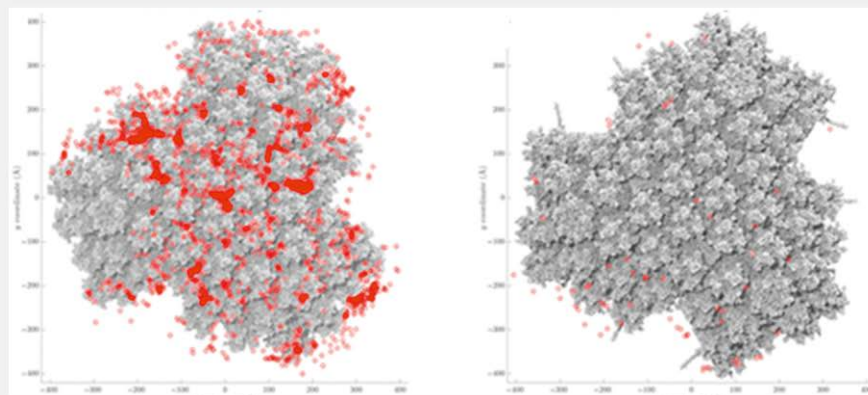
In der Infektabwehr ist PF4 als sog. Opsonin wirksam. Dabei bindet PF4 an negativ-geladene Oberflächenstrukturen mikrobieller Erreger und schafft so die Voraussetzung zur Bindung von Anti-PF4-Antikörpern und die konsekutive Phagozytose [20, 21]. Vermutlich gehört die anti-PF4 vermittelte Immunreaktion zu den angeborenen Antikörperreaktionen [22, 23]. Sie hilft die Zeit zwischen Initialphase der Infektion und Produktion spezifischer Antikörper zu

überbrücken. Wahrscheinlich ist somit die Anti-PF4-Immunantwort eine sehr ursprüngliche, evolutionär alte Form der Immunabwehr. Nach der initialen Opsonierung mikrobieller Erreger durch PF4 kommt es zu Änderungen in der Faltstruktur von PF4 (sog. konformationale Änderung) [24]. Durch diese Änderung werden Neo-Epitope exponiert, an die Anti-PF4-Antikörper binden können [25, 26]. Untersuchungen unter Blutspendern haben gezeigt, dass sich niedrige Titer von Anti-PF4-Antikörpern auch bei bis zu 6% von Gesunden finden [27]. Etwas höhere Raten finden sich bei Personen mit umschriebenen chronischen Entzündungen, ohne dass hiermit ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko oder erhöhte Thrombozytenraten verbunden sind [28].

Bindung von PF4 an adenovirale Impfvektoren

Neben Bakterien kann PF4 auch bei Adenoviren, die für die vektorbasierten COVID-19-Impfstoffe verwendet werden, eine Opsonierung bewirken [29, 30]. Für die Opsonierung durch PF4 sind bestimmte elektrostatische Voraussetzungen – speziell negative Ladungen – an der Erregeroberfläche maßgeblich. Das stark positiv geladene PF4 bindet ladungsabhängig an die Viren. Mittels Plasmonenresonanz-Technik wurde gezeigt, dass PF4 mit unterschiedlicher Affinität an alle drei Adenovirus-Vektoren Ad26, Ad5 und ChAdOx1 bindet. Dabei wird die notwendige negative Ladung vor allem vom adenoviralen Hexon-Hüllprotein bereitgestellt. Im ChAdOx1-Vektor ist dies ausgeprägter als bei den anderen untersuchten Adenovirus-Vektoren. Biophysikalische Untersuchungen zeigten allerdings, dass die Affinität von PF4 zu Ad26 (Johnson & Johnson) trotzdem stärker ist als zu ChAdOx1 (► **Abb. 2**, [31]). Generell erfolgt die Bindung von PF4 an Adenoviren mit einer vergleichsweise geringen Affinität [31]. Diese Befunde suggerieren, dass zusätzlich zum Adenovirus-Vektor noch andere Bestandteile aus dem Impfstoff als Liganden an der Induktion der PF4-vermittelten Immunreaktion der VITT beteiligt sind. Aktuelle Untersuchungen gehen nun der Frage nach, welche Impfstoff-Bestandteile hierfür in Frage kommen könnten.

Michalik et al. (2022) identifizierten in beiden Adenovirus-vektorbasierten Impfstoffen neben den Hexon-Hüllproteinen der Virus-Oberfläche auch freie Hexon-Proteine bzw. -Polypeptide und



► **Abb. 2** Plättchenfaktor 4 (PF4) bindet an Adenovirus-Vektore (ChAdOx1 nCoV); **a**) Der ChAdOx1 nCoV-19-Impfstoff bindet PF4. Brownsche-Dynamik Simulation zeigt die Bindung zwischen dem PF4-Tetramer (rote Punkte) und der Oberfläche von ChAdOx1 (grau). **b**) Inhibition der Interaktion zwischen PF4 und ChAdOx1 durch das Polyanion Fondaparinux (Abbildung aus [31]).

viele Proteine aus der humanen Zelllinie, in der das Virus propagiert wird [32]. Auch diese sind möglicherweise an der anti-PF4-vermittelten Immunreaktion beteiligt. Unterstützt wird diese Annahme durch Untersuchungen der PF4/ChAdOx1-Komplexe mit dem Super-Resolutionmikroskop. ► **Abb. 3** zeigt multimolekulare Komplexe aus PF4 und Bestandteile des Adenovirus-Vektor ChAdOx1, an die Anti-PF4-Antikörper von VITT-Patienten binden. Die Tatsache, dass sich einige Anteile dieser Komplexe nicht für das Hexon-Hüllprotein färben, unterstützt die Vermutung, dass weitere Impfstoffbestandteile für die Komplexbildung mit PF4 verantwortlich sind.

PF4-Bindungspartner jenseits des adenoviralen Hexon-Proteins

Der Bindungspartner von PF4, der für die Induktion der Antikörper in der VITT-Pathogenese wichtig ist, wurde bislang noch nicht identifiziert. Die bisherigen Ergebnisse zu einzelnen, potentiellen Kandidaten werden im Folgenden zusammengefasst:

Glykosaminoglykane

Da die HIT durch einen Komplex aus PF4 und Glykosaminoglykanen (GAG) induziert wird, erscheint es theoretisch möglich, dass GAG auch bei der VITT-assoziierten Immunreaktion eine Rolle spielen. Speziell könnte sulfatiertes GAG, das aus den Zellkulturen (T-REx-293 HEK Zellen) stammt, die für die Impfstoffherstellung genutzt werden, als Ligand (Bindungspartner) für PF4 fungieren [33]. Technisch ist es eine Herausforderung, geringe Konzentrationen von GAG in einer komplexen Matrix wie einem Impfstoff zu detektieren. Alban et al. (2022) haben hierzu ein mehrstufiges Verfahren genutzt, mit dem sie nachweisen konnten, dass GAG mutmaßlich nicht in ausreichender Menge im Impfstoff vorhanden ist, um

für die Bildung von Immunkomplexen mit PF4 eine entscheidende Rolle zu spielen [34].

EDTA

Mittels NMR wurde an der Universität Greifswald Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) im AstraZeneca Impfstoff nachgewiesen. Es wurde hiernach untersucht, ob die anti-PF4-Antikörper von VITT-Patienten in der Anwesenheit von EDTA an PF4 binden. Es zeigte sich, dass weder steigende Konzentrationen von EDTA noch die kompetitive Bindung mit Eisen(III)-chlorid (hohe Affinität zu EDTA und somit kompetitive Inhibition der Bindung von EDTA an PF4) das Antikörper-Bindungsverhalten an PF4 beeinflussten.

Nukleinsäuren

DNA, RNA, und Aptamere (einzelsträngiges DNA- und RNA-Oligonukleotid) können mit PF4 interagieren und jene konformationalen Strukturänderungen induzieren, die es Anti-PF4-Antikörper möglich machen, PF4 zu erkennen und zu binden. Im Tierexperiment zeigte sich ebenfalls, dass PF4/Aptamer-Komplexe die Induktion von anti-PF4-Antikörpern triggern [35]. Die im Impfstoff enthaltene DNA stammt in erster Linie vom Adenovirus. Ob die Impfstoffe zusätzlich DNA aus jenen Zellkulturen beinhalten, in denen das Virus während der Produktion vermehrt wird, ist nicht abschließend geklärt. Da der Impfstoff während seiner Herstellung mit DNase behandelt wird, erscheint dies allerdings eher unwahrscheinlich.

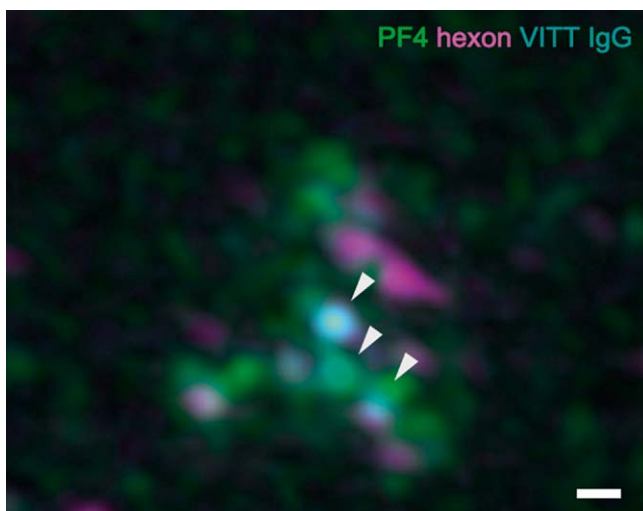
Polysorbat 80

Auch für Polysorbat 80, einem pharmazeutischen Hilfsstoff, der in beiden Adenovirus-vektorbasierten Impfstoffen – aber nicht in mRNA-basierten Impfstoffen – verwendet wird, wurde eine Rolle in der Pathogenese der VITT diskutiert [36, 37]. Da Polysorbat 80 allerdings auch für die Herstellung vieler anderer i. v.-Medikamente, wie z. B. Amiodaron, verwendet wird und dabei keine vermehrten Thrombosen auftreten, erscheint Polysorbat 80 für die Pathogenese der VITT eher unbedeutend zu sein.

Proteine

Messungen der Proteinkonzentrationen und Analysen der Proteinstmuster aus beiden Adenovirus-vektorbasierten Impfstoffen lassen den Schluss zu, dass sowohl ChAdOx1 nCoV-19 als auch Ad26.COV2.S neben den adenoviralen Proteinen, auch Proteine aus jenen Zellkulturen beinhalten, die für die Vermehrung des Adenovirus-Vektor während der Produktion genutzt werden [32, 38]. Ob diese Proteine direkt in die anti-PF4-vermittelte Immunreaktion der VITT involviert sind, ist offen. ► **Abb. 4** listet die Proteinzusammensetzung von ChAdOx1 nCoV-19 und Ad26.COV2.S auf. Die Tatsache, dass sich die zehn häufigsten Proteine des ChAdOx1 nCoV-19-Impfstoffes nicht in Ad26.COV2.S nachweisen lassen, macht es weniger wahrscheinlich, dass diese Proteine direkt an der Pathogenese der VITT beteiligt sind.

Zusammengefasst bindet PF4 im Rahmen der VITT an Adenovirus-Vektoren, was in erster Linie über die negative Ladung von Hexon-Hüllproteinen vermittelt wird. Außerdem sind freie Hexon-Proteine in beiden Adenovirus-vektorbasierten Impfstoffen in die Bildung von PF4-Komplexen involviert (► **Abb. 3**). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist noch unklar, ob weitere Bindungspartner (Li-



► **Abb. 3** Super-Resolutionmikroskopie von PF4/ChAdOx1 nCoV-19-Komplexen, an die Anti-PF4-Antikörper von VITT-Patienten binden.; 3D-SIM-Mikroskopie (3D structured illumination microscopy) zeigt Verbindungen von ChAdOx1 nCoV-19-Komponenten (Hexon-Polypeptide in magenta) mit Komplexen aus Anti-PF4-IgG (türkis) und PF4 (grün). Die Pfeilspitzen zeigen die Lokalisation, an der Anti-PF4-IgG an Komplexe aus PF4 und Hexon-Polypeptid binden. Der weiße Balken im Bild rechts unten markiert eine Länge von 200 nm.

					iBAQ intensities					
					ChAdOx1 nCoV-19			Ad26.COVS.2.S		
Top15 host cell line proteins in ChAdOx1 nCoV-19 or Ad26.COVS.2.S										
Top15 selection	Uniprot ID	protein description	rank	LOT1	LOT2	LOT3	LOT1	LOT2	LOT3	
ChAdOx1 nCoV-19	P08238	Heat shock protein HSP 90-beta	1	1.9E+07	1.1E+07	8.2E+06				
	P62258	14-3-3 protein epsilon	2	9.1E+06	6.4E+06	4.0E+06	3.2E+03	1.4E+03	1.1E+04	
	P08670	Vimentin	3	7.0E+06	5.8E+06	4.7E+06				
	P07900	Heat shock protein HSP 90-alpha	4	9.0E+06	4.3E+06	3.5E+06	1.4E+03		1.3E+03	
	P55072	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	5	7.1E+06	3.3E+06	3.0E+06				
	P68363	Tubulin alpha-1B chain	6	5.8E+06	3.3E+06	4.1E+06	7.5E+02	1.7E+03		
	P05387	60S acidic ribosomal protein P2	7	5.8E+06	2.6E+06	1.2E+06				
	P63104	14-3-3 protein zeta/delta	8	3.4E+06	3.0E+06	2.3E+06			6.5E+03	
	P14625	Endoplasmic	9	4.8E+06	2.2E+06	1.6E+06				
	P68371	Tubulin beta-4B chain	10	4.3E+06	2.0E+06	2.1E+06				
	P31946	14-3-3 protein beta/alpha	11	3.0E+06	2.1E+06	1.6E+06				
	Q08380	Galectin-3-binding protein	12	2.3E+06	2.2E+06	1.8E+06	3.3E+03		9.2E+03	
	Q04837	ngle-stranded DNA-binding protein, mitochondri	13	3.1E+06	2.0E+06	8.0E+05				
	P27797	Calreticulin	14	3.5E+06	1.6E+06	7.4E+05				
	P67936	Tropomyosin alpha-4 chain	15	1.4E+06	1.3E+06	1.7E+06				
Ad26.COVS.2.S	P62805	Histone H4	1	1.1E+06	1.7E+06	5.8E+05	8.6E+05	6.9E+04	6.8E+05	
	P62241	40S ribosomal protein S8	2	3.6E+05	3.8E+05	3.3E+05	1.5E+05	4.0E+04	2.2E+05	
	Q9Y3U8	60S ribosomal protein L36	3	1.0E+05	8.4E+04	7.6E+04	7.6E+04		1.5E+05	
	P46776	60S ribosomal protein L27a	4	1.5E+05	1.5E+05	1.2E+05	9.0E+04	1.4E+04	1.3E+05	
	P25788	Proteasome subunit alpha type-3	5	3.4E+04	7.3E+04	1.5E+06			5.5E+04	
	P62750	60S ribosomal protein L23a	6	1.6E+05	1.8E+05	8.7E+04	4.6E+04	2.5E+04	8.7E+04	
	P28070	Proteasome subunit beta type-4	7	2.1E+04	6.0E+04	1.5E+06			5.2E+04	
	P61353	60S ribosomal protein L27	8				6.1E+04	1.2E+03	8.2E+04	
	Q07020	60S ribosomal protein L18	9	1.4E+05	1.2E+05	1.0E+05	6.5E+04	6.3E+03	6.4E+04	
	P20618	Proteasome subunit beta type-1	10	3.9E+04	6.3E+04	1.8E+06	2.1E+05		7.5E+04	
	P62263	40S ribosomal protein S14	11	6.6E+05	4.8E+05	2.5E+05	4.9E+04	8.9E+03	5.0E+04	
	P25787	Proteasome subunit alpha type-2	12	1.1E+04	3.0E+04	8.2E+05			1.8E+04	
	P60900	Proteasome subunit alpha type-6	13	3.9E+04	4.7E+04	1.1E+06	3.6E+05		6.2E+04	
	P26373	60S ribosomal protein L13	14	1.1E+05	1.1E+05	7.9E+04	3.4E+04	6.3E+03	5.3E+04	
	O14818	Proteasome subunit alpha type-7	15	4.2E+04	8.9E+04	2.1E+06	2.4E+03		5.8E+04	
Top15 host cell line proteins found in ChAdOx1 nCoV-19 and Ad26.COVS.2.S (identified with at least 2 peptides in 3 LOTs each)										
both	P62258	14-3-3 protein epsilon	1	9.1E+06	6.4E+06	4.0E+06	3.2E+03	1.4E+03	1.1E+04	
	P62805	Histone H4	2	1.1E+06	1.7E+06	5.8E+05	8.6E+05	6.9E+04	6.8E+05	
	P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	3	2.0E+06	1.2E+06	8.9E+05	3.6E+03	7.7E+03	2.4E+03	
	P62263	40S ribosomal protein S14	4	6.6E+05	4.8E+05	2.5E+05	4.9E+04	8.9E+03	5.0E+04	
	P62241	40S ribosomal protein S8	5	3.6E+05	3.8E+05	3.3E+05	1.5E+05	4.0E+04	2.2E+05	
	P14618	Pyruvate kinase PKM	6	5.2E+05	3.1E+05	3.0E+05	3.3E+02	7.4E+02	8.8E+02	
	P62269	40S ribosomal protein S18	7	3.1E+05	2.0E+05	8.7E+04	3.0E+04	5.0E+03	3.2E+04	
	P46776	60S ribosomal protein L27a	8	1.5E+05	1.5E+05	1.2E+05	9.0E+04	1.4E+04	1.3E+05	
	P62750	60S ribosomal protein L23a	9	1.6E+05	1.8E+05	8.7E+04	4.6E+04	2.5E+04	8.7E+04	
	P62249	40S ribosomal protein S16	10	2.5E+05	1.8E+05	1.1E+05	7.8E+03	2.8E+03	7.8E+03	
	P62851	40S ribosomal protein S25	11	2.7E+05	1.5E+05	6.6E+04	2.6E+04	4.0E+03	3.8E+04	
	P61978	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	12	3.1E+05	1.5E+05	6.5E+04	2.8E+03	9.8E+02	6.4E+03	
	P31943	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	13	2.6E+05	1.5E+05	9.9E+04	7.0E+03	7.3E+02	3.9E+03	
	Q07020	60S ribosomal protein L18	14	1.4E+05	1.2E+05	1.0E+05	6.5E+04	6.3E+03	6.4E+04	
	P62753	40S ribosomal protein S6	15	1.3E+05	1.3E+05	9.3E+04	1.5E+04	7.1E+03	3.5E+04	

► **Abb. 4** Proteine, die in Analysen von ChAdOx1 nCoV-19 und Ad26.COVS.2.S identifiziert wurden (weitere Details in [32]).

ganden) in die Bildung von Komplexen mit PF4 involviert sind, an die Anti-PF4-Antikörper binden und die VITT-spezifische Immunreaktion auslösen. Erst wenn der Bindungspartner identifiziert ist, können die Impfstoffe so modifiziert werden, dass das Risiko der Induktion einer VITT reduziert wird.

Die Bindungsstelle von Anti-PF4-Antikörpern auf PF4

Die genauere Charakterisierung der Epitope im PF4-Molekül, an die Anti-PF4-Antikörper im Rahmen der VITT binden, ist ebenfalls

Gegenstand aktueller Forschung. Um diese Epitope zu charakterisieren, nutzen Huynh et al. (2021) die Alanin-Scantechnik (Mutagenese) [39]. Mit dieser Technik wurden systematisch einzelne Aminosäuren im PF4-Molekül modifiziert. Die so modifizierten PF4-Moleküle erlauben es, jene Aminosäuren zu identifizieren, die für die Bindung von Anti-PF4-Antikörpern notwendig sind. Mit diesem Ansatz zeigte sich, dass Anti-PF4-Antikörper von VITT-Patienten an andere Epitope auf PF4 binden als die Anti-PF4-Antikörper bei der HIT. Die Anti-PF4-Antikörper bei der VITT erkennen aber Amino-

säuren, die ebenfalls relevant für die Bindung von Heparin an PF4 sind. Dieser Befund könnte wichtige klinische Implikationen für die Behandlung der VITT haben. Da Heparin die Bindung von Anti-PF4-Antikörpern an PF4 inhibieren kann, könnte es theoretisch als Antidot bei der VITT eingesetzt werden. Klinisch belegt wurde diese Theorie bislang nicht [40]. Vielmehr empfehlen internationale Leitlinien aktuell weiterhin, kein Heparin bei der VITT einzusetzen [17].

Ein weiterer methodischer Ansatz, um spezifische Bindungsstellen zu charakterisieren, stellen monoklonale Antikörper dar, die mit patienteneigenen Anti-PF4-Antikörpern konkurrieren. Vayne et al. (2022) charakterisierten mit 1E12 den ersten VITT-ähnlichen monoklonalen Antikörper [41]. 1E12 ist ein chimärer Anti-PF4-Antikörper mit einem humanen Fc-Fragment, der vollständig die Effekte humaner VITT-Antikörper imitiert. Aktuelle Studienergebnisse zeigen, dass sich die Bindungsepitope an PF4 für Anti-PF4-Antikörper im Rahmen der VITT zu einem relevanten Anteil mit jenen für Heparin und für den monoklonalen Antikörper 1E12 überlappen. 1E12 wird damit ein wichtiger Bestandteil für weitere Experimente zum Verständnis der VITT-Pathogenese im Tiermodell sein und darüberhinaus helfen, die Antikörper-Bindungsstellen verschiedener anti-PF4-vermittelter Erkrankungen, wie VITT und HIT, zu charakterisieren.

Die bisher beschriebenen Bindungscharakteristika könnten nahelegen, dass ehemalige HIT-IIa-Patienten ein erhöhtes VITT-Risiko nach SARS-CoV-2-Impfung haben. Klinisch belegen ließ sich diese Vermutung bislang nicht. In der im Greifswalder Labor untersuchten Kohorte (n = 70 VITT Patientinnen und Patienten) gab es keinen Patienten, der zuvor eine HIT gehabt hat. Vermutlich sind die meisten ehemaligen HIT-Patient*innen vorsichtshalber mit einem mRNA-Vakzin gegen Sars-CoV-2 geimpft worden.

Die Anti-PF4-Immunantwort benötigt ein proinflammatorisches Milieu

Wie im Folgenden beschrieben, könnten Proteine aus Zellkulturen, die in der Impfstoffproduktion verwendet werden, und freie Adenovirus-Proteine über die Induktion einer inflammatorischen Reaktion („*danger signal*“) zu der anti-PF4-vermittelten Immunreaktion der VITT beitragen. Das Ausmaß der Inflammation ist dabei wahrscheinlich stärker ausgeprägt, je höher der Anteil von Zellkultur-Proteinen und freien Adenovirus-Proteine im Impfstoff ist. Die Tatsache, dass der Anteil dieser Proteine in ChAdOx1-nCoV-19 (AstraZeneca) höher ist, könnte erklären, warum die Häufigkeit einer VITT nach Impfung mit ChAdOx1-nCoV-19 etwa dreimal höher als nach Impfung mit Ad26.COVS.2 (Johnson & Johnson) ist [42, 43].

Analog zur HIT liegt der Pathogenese der VITT auch ein 2-stufiger Prozess zugrunde:

1. Begleitet von einem inflammatorischen Prozess („*danger signal*“) werden unmittelbar nach der Impfung zunächst PF4-Antigene gebildet (durch konformationale Änderungen der PF4-Struktur). Das inflammatorische „*danger signal*“ aktiviert B-Zellen, die dann beginnen Anti-PF4-Antikörper zu produzieren.
2. Etwa 5–14d nach der Impfung führen hohe Titer von Anti-PF4-Antikörpern über FcγIIa-Rezeptoren zu einer Plättchenaktivierung mit konsekutiver Thrombinbildung, die die Thrombosen induziert [38].

Klinisch manifestiert sich dieser inflammatorische Prozess in den ersten 24–48 h als typische Impfreaktion mit Fieber, Schüttelfrost und Kopfschmerzen. Diese akute Impfreaktion ist wahrscheinlich vor allem durch freie Hexon-Proteine und andere freie Virusbestandteile verursacht [44]. Zusätzlich können Zellkultur-Proteine (T-REX HEK-293) in der Initialphase nach der Impfung ins Blut penetrieren. Im Blut werden sie von präformierten IgG-Antikörpern erkannt [45]. Die Funktion dieser Antikörper bei Gesunden ist es, intrazelluläre Proteine zu erkennen und so degradierte Zellkomponenten aus der Zirkulation zu entfernen. Die Bindung dieser Antikörper an Proteine aus dem Impfstoff führt wahrscheinlich zur Bildung von Immunkomplexen. Serum-Untersuchungen bei Geimpften und Ungeimpften zeigten, dass sich diese präformierten IgG-Antikörper zwar in beiden Gruppen nachweisen ließen. Die Antikörper-Reaktivität war bei Geimpften aber stärker ausgeprägt als bei Ungeimpften. Vermutlich wird das Immunsystem durch die Impfung gegen SARS-CoV-2 in der Produktion dieser Antikörper verstärkt. Wie in der Pathogenese der HIT könnte dieser inflammatorische Prozess ein wichtiges Co-Signal darstellen („*danger signal*“), das die Anti-PF4-Antikörperproduktion durch präformierte B-Zellen stimuliert [22, 35]. Bezogen auf den ChAdOx1-Impfstoff wird dieser inflammatorische Prozess durch EDTA aus dem Vakzin verstärkt. EDTA steigert das „*capillary leakage*“ an der Impfstelle, wahrscheinlich hervorgerufen durch Abbau von endothelialen (VE)-Cadherin [32, 38, 46]. Das „*capillary leakage*“ wiederum verstärkt den Übertritt von Impfstoff-Proteinen in die Blutbahn.

VITT-assoziierte Anti-PF4-Antikörper zeigen keine Kreuzreaktion mit Antikörpern gegen das SARS-CoV2-Spikeprotein

Mit der Erkenntnis, dass die VITT mit Anti-PF4-Antikörpern assoziiert ist, drängte sich die Frage auf, ob es eine Kreuzreaktion mit Antikörpern gegen das SARS-CoV-2-Spikeprotein geben könnte und damit VITT-ähnliche Komplikationen auch nach Impfungen mit mRNA-Impfstoffen möglich sind. Tatsächlich wurden auch bei COVID-19-Patienten Antikörper gefunden, die ähnlich wie Anti-PF4-Antikörper bei VITT-Patienten über FcγIIa-Rezeptoren zu einer Plättchenaktivierung führen. Zusätzlich genährt wurde diese Vermutung durch Computer-Simulationen und 3D-Modellierungen, die eine Ähnlichkeit der Heparin-Bindungsstelle auf PF4 (an die auch VITT-Antikörper binden) mit Epitopen auf dem SARS-CoV-2-Spikeprotein zeigten. Um eine potentielle Kreuzreaktion auszuschließen, wurden im Institut für Transfusionsmedizin der Universitätsmedizin Greifswald Anti-PF4-Antikörper von VITT-Patienten isoliert und gegen rekombinantes SARS-CoV-2-Spikeprotein getestet. Keiner der von VITT-Patienten isolierten Anti-PF4-Antikörper zeigte eine Kreuzreaktion mit dem SARS-CoV-2-Spikeprotein. Parallel wurde an einer Kohorte von PCR-bestätigten COVID-19 Patienten (n = 222) gezeigt, dass der Nachweis von Anti-PF4-Antikörpern hier nicht mit einer erhöhten Häufigkeit einer Thrombozytopenie oder Thrombosen assoziiert ist. Auch andere Studien zeigten keine Korrelation von anti-PF4- und anti-SARS-CoV-2 Antikörpern [47]. Diese Daten führten zu der Einschätzung, dass mRNA-Impfstoffe keine VITT induzieren sollten. Auch ehemalige VITT-Patienten mit noch zirkulierenden plättchenaktivierenden Anti-PF4-Antikörpern entwickeln kein VITT-Rezidiv mit erneuter Thrombozytopenie oder gar Thrombosen, wenn sie mit einem mRNA-Vakzin

geimpft werden [19]. Zusätzlich zeigte sich bei 11 VITT-Patienten, die Covid-19 nach einer VITT entwickelten, kein Anstieg der Anti-PF4-Antikörpertiter [48].

Erneute Exposition mit mRNA-Impfstoffen gegen SARS-CoV-2

Bei mutmaßlich unerwünschten Immunreaktionen gegen Medikamente wird das Wiederauftreten von Symptomen während einer erneuten Exposition häufig als Beweis eines kausalen Zusammenhangs gewertet. In dieser Hinsicht sind klinische Beobachtungen an VITT-Patienten von Bedeutung, die jeweils eine 2. Impfung mit einem mRNA-Vakzin erhielten und in keinem Fall ein VITT-Rezidiv mit Thrombosen oder einer Thrombozytopenie entwickelten [49–51]. Dies unterstützt auch, dass mRNA-Vakzine keine Ko-Faktoren enthalten oder induzieren, die für eine Anti-PF4-Antikörper vermittelte prothrombotische Plättchenaktivierung notwendig wären. Einige dieser Patienten wiesen auch noch zirkulierende plättchenaktivierende Anti-PF4-Antikörper im Plasma auf, als die zweite Impfung mit dem mRNA-Vakzin erfolgte. Auf der anderen Seite beschrieben Lacy et al. (2021) kürzlich auch fünf Patienten (n = 1 mit bestätigter VITT; n = 4 mit möglicher VITT), die ihre 2. Impfung mit ChAdOx1 nCoV-19 erhielten und ebenfalls kein VITT-Rezidiv oder sonstige Nebenwirkungen zeigten [51]. Ob diese Patienten zum Zeitpunkt der 2. Impfung noch plättchenaktivierende Antikörper aufwiesen, wurde nicht untersucht. Von der HIT ist bekannt, dass eine kurze Re-Exposition mit Heparin von den meisten Patienten gut toleriert wird, wenn keine plättchenaktivierenden Anti-PF4-Antikörper mehr präsent sind [52]. Somit ist die komplikationslose Re-Exposition mit einem Vakzin kein Beweis, dass dieses Vakzin nicht doch Faktoren enthält, die in der Lage sind Komplexe mit PF4 zu bilden, die initial die VITT getriggert haben. Eine mögliche Erklärung, für die komplikationslose Re-Exposition von ehemaligen VITT-Patienten mit dem ChAdOx1-Vakzin, ermöglicht auch hier ein Vergleich zur HIT. Die Anti-PF4-Immunreaktion benötigt bei der VITT analog zur HIT ebenfalls ein begleitendes inflammatorisches „*danger signal*“. Für die HIT konnte dieses Prinzip in einer prospektiven Studie an Trauma-Patienten demonstriert werden. Verglichen wurden Patienten mit leichtem und schwerem Trauma. Beide Gruppen erhielten die gleichen Heparin-Dosen über die gleiche Zeitdauer. Eine Anti-PF4-Reaktion zeigte sich nur bei Patienten, die aufgrund eines schwerem Traumas operativ versorgt werden mussten [53]. Analog lässt sich herleiten, dass bei fehlenden pro-inflammatorischen Signalen zum Zeitpunkt der 2. Impfung seltener eine relevante Anti-PF4-Antwort hervorgerufen wird. In der Tat scheinen klinische Beobachtungen zu bestätigen, dass die üblichen frühen Impfreaktionen während der ersten 24–48 h nach der 2. Impfung mit ChAdOx1 weniger ausgeprägt sind als nach der 1. Impfung.

Die Anti-PF4-Reaktion der VITT ist eine transiente sekundäre Immunreaktion

Der Symptombeginn bei der VITT liegt typischerweise im Zeitfenster zwischen Tag 5–20 nach der Impfung. Zusätzlich weisen nahezu alle Patienten mit einer VITT sehr hohe optische Dichtewerte im Anti-PF4/Heparin IgG EIA auf. Das Auftreten hochtitriger Anti-PF4-IgG Antikörper bereits 5d nach der Impfung, lässt sich nicht durch

eine primäre Immunantwort erklären. Wie bei der HIT, weist die VITT-assoziierte Immunreaktion somit Charakteristika einer sekundären Immunreaktion auf [54]. Ob bei der VITT eine vorherige Exposition zu Pathogenen notwendig ist, die – wie bei der HIT – eine primäre Anti-PF4-Immunreaktion triggert, ist gegenwärtig ungeklärt [20]. Allerdings ließen sich bei der VITT bisher auch einige Eigenschaften beobachten, die nicht ganz typisch für eine sekundäre Immunreaktion sind. Nach einer ausgeprägten sekundären Immunreaktion persistieren Antikörper typischerweise für mehrere Monate bis Jahre. Dies ist vor allem für eine sekundäre Immunreaktion nach Impfung der Fall. Für eine Mehrzahl der VITT-Patienten trifft das allerdings nicht zu [48]. Die Abnahme der Anti-PF4-Antikörperspiegel nach der Entwicklung einer VITT ist ähnlich wie die Antikörper-Dynamik bei der HIT [55]. Allerdings ist die Dauer bis zu einer Seroreversion bei der VITT länger als bei der HIT. Wahrscheinlich ist dies durch die ungewöhnlich hohen Antikörperlevel in der Initialphase der VITT zu erklären [10]. Der rasche Abfall der Antikörpertiter spiegelt, dass die Immunreaktion bei der VITT nicht dem „klassischen“ Muster einer sekundären Immunreaktion entspricht.

Im Tiermodell der HIT konnte die Anti-PF4-Immunreaktion auf B-Zellen der Marginalzone in der Milz zurückgeführt werden [22]. Diese B-Zellsubpopulation stellt eine erste Immunabwehr durch schnell produziertes IgM und durch Ig-Klassenwechsel entstandenes IgG dar. Der zeitliche Verlauf der klinischen VITT-Manifestation suggeriert, dass Marginalzonen-B-Zellen auch bei der VITT mögliche Kandidaten für die Produktion von Anti-PF4-Antikörpern sind. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass ChAdOx1 nach i. v.-Injektion an Thrombozyten bindet und dass diese Thrombozyten mit B-Lymphozyten in der Marginalzone der Milz interagieren [13]. In einer Subgruppe von VITT-Patienten wurden allerdings noch über sechs Monate persistierende plättchenaktivierende Anti-PF4-Antikörper gezeigt [19, 56]. Ob die persistierende Immunreaktion weitere B-Zellen neben den Marginalzonen-B-Zellen involviert, ist unklar. Eine weitere Erkenntnis, die sich aus den Tierexperimenten ergibt, ist, dass Thrombozyten bei der VITT auch als Antigenpräsentierende Zellen fungieren. Die gemeinsame Präsentation von Thrombozyten- und Virusantigenen stellt ein erhöhtes Risiko für die Induktion von Anti-Thrombozyten-Autoantikörpern dar. In der Tat wurde bei etwa 25% eines VITT-Kollektivs im Serum gezeigt, dass diese auch Glykoprotein-spezifische Anti-Thrombozyten-Antikörper produzieren [13].

Multimolekulare Komplexe, die PF4 beinhalten, aktivieren auch das Komplementsystem [57, 58]. Aggregate aus an PF4 gebundenem Komplement erlauben die Bindung von B-Zellen über den Komplementrezeptor [57]. Aktuell ist noch unklar, ob das Komplementsystem analog zur HIT auch eine Rolle in der Immunantwort gegen PF4 bei der VITT spielt.

Anti-PF4-Antikörper führen über Fcγ1a-Rezeptoren auch zu einer Aktivierung von Granulozyten

Sobald B-Zellen zur Produktion von Anti-PF4-Antikörpern stimuliert werden, dauert es 5–10 Tage bis ausreichende Titer an Anti-PF4-Antikörpern gebildet sind. Dabei werden Antikörper mit unterschiedlicher biologischer Relevanz produziert. Bis diese Antikörper wiederum zur Symptomanifestation führen, dauert es meist

nochmal wenige Tage. Bei mehr als 5 % der Geimpften finden sich niedrige Titer von Anti-PF4-Antikörper. Diese führen weder zu einer Plättchenaktivierung noch sind sie mit einer Thrombozytopenie oder Thrombosen assoziiert [59]. Im Gegensatz dazu wiesen bislang alle untersuchten VITT-Patienten plättchenaktivierende Anti-PF4-Antikörper auf [60]. Diese Antikörper aktivieren Thrombozyten über den thrombozytären FcγIIa-Rezeptor. Blockiert werden kann diese Bindung durch hohe Dosen i. v.-Immunglobuline (IVIG) und einen Fc-Rezeptor-spezifischen, monoklonalen Antikörper (MoAb IV.3) [10, 61, 62]. Aktivierte Thrombozyten exponieren wiederum Phosphatidylserin, was als katalytische Oberfläche für die Thrombinbildung fungiert [63]. Gleichzeitig setzen die Thrombozyten PF4 frei. Das freigesetzte PF4 bindet auf der Oberfläche von Granulozyten an Chondroitinsulfat. Zu einer Granulozytenaktivierung kommt es darauffolgend, wenn Anti-PF4-Antikörper an die Granulozyten binden und deren FcγIIa-Rezeptoren vernetzen. In der Folge dieses Vorgangs wird nukleäre DNA aus den Granulozyten in einem Prozess freigesetzt, der als NETose (NET = *neutrophil extracellular traps*) bezeichnet wird [38, 64]. An diese DNA-NETs binden zunächst PF4-Moleküle und dann auch Anti-PF4-Antikörper. Dies erlaubt die Bildung großer Immunkomplexe, wodurch ein sich selbst verstärkender Kreislauf der Zellaktivierung entsteht und das prothrombotische Stadium der VITT verstärkt und unterhalten wird. Diese aus *in vitro*-Experimenten generierten Erkenntnisse wurden *in vivo* in einem Mausmodell bestätigt [65]. Ferner wurden stark erhöhte Marker der NETose bei VITT-Patienten nachgewiesen und zusätzlich NETs im Thrombusmaterial aus Hirn- und Sinusvenenthrombosen von VITT-Patienten nachgewiesen [38].

Es ist sehr wahrscheinlich, dass Anti-PF4-Antikörper auch an Komplexe aus PF4 und Heparinsulfat auf Endothelzellen binden. Die damit induzierte Aktivierung von Endothelzellen setzt von-Willebrand-Faktor frei, an den zuerst PF4 und dann auch Anti-PF4-Antikörper binden. Dies führt zu einer weiteren Aktivierung von Thrombozyten und über diese zu einer Aktivierung von Granulozyten [66, 67].

Ausblick

Anti-PF4-Antikörper als Ursache von Thrombosen jenseits der VITT

Die Aufarbeitung der VITT-Pathogenese hat gezeigt, dass Anti-PF4-Antikörper ungewöhnliche Thrombosen hervorrufen können. Einige jüngere Beobachtungen lassen vermuten, dass die Bildung dieser Antikörper nicht spezifisch für SARS-CoV-2-Impfstoffe oder Adenovirus-vektorbasierte Impfstoffe im Allgemeinen ist. Eine kürzlich publizierte Kasuistik beschrieb die Entwicklung einer VITT nach Impfung gegen das humane Papillomavirus (Gardasil) mit dem klinisch typischen VITT-Bild und der Bildung von plättchenaktivierenden Anti-PF4-Antikörpern [68]. In einem anderen Fallbericht wurde eine Frau beschrieben mit einem persistierenden, PF4-reaktiven monoklonalen IgG-Paraprotein, das Thrombozyten direkt über den FcγIIa-Rezeptor aktivierte. Diese Patientin zeigte eine chronische, milde Thrombozytopenie und rekurrende Thrombosen [69]. Die chronische Hyperkoagulopathie zeigte hier eine starke Korrelation zwischen dem Ausmaß der Thrombozyto-

penie und erhöhten D-Dimeren. Auch wurde kürzlich ein Fall mit einem spontanen HIT-Syndrom assoziiert mit einem IgG-κ Paraprotein beschrieben [70]. Basierend auf diesen Kasuistiken erscheint das Spektrum der anti-PF4-vermittelten Koagulopathien, die auf einer Fc-Rezeptor-vermittelten Thrombozytenaktivierung basieren, über Heparin und Impfstoffe hinauszugehen. Möglicherweise spielen Anti-PF4-Antikörper auch eine ursächliche Rolle bei anderen seltenen Erkrankungsformen, die mit wiederkehrenden venösen und arteriellen Thrombosen unklarer Ätiologie einhergehen.

Relevanz der VITT heute und Implikationen für die Zukunft

Die rasante Charakterisierung der immunologischen Pathogenese der VITT und die schnelle Veröffentlichung internationaler Guidelines zum Management der VITT half, die hohe Mortalität in der Initialphase von ca. 50 % auf 5 % zu reduzieren [16]. Damit entspricht die Mortalität der VITT der von HSVT anderer Ätiologien [12]. Derzeit kommen Adenovirus-vektorbasierte Impfstoffe gegen SARS-CoV-2 vor allem in sog. *low income countries* (LIC) zum Einsatz. Aktuell sind weltweit zwar mehr als 12 Milliarden SARS-CoV-2-Impfdosen appliziert worden. Allerdings haben bislang lediglich 17,6 % der Menschen in LICs überhaupt erst eine Impfdosis erhalten. Um diese Impflücke zu schließen, sind Impfkampagnen weiterhin auf Adenovirus-vektorbasierte Impfstoffe angewiesen, weil nur diese ausreichend kostengünstig hergestellt werden können, um von Gesundheitssystemen ärmerer Länder bezahlt werden zu können. Die große Herausforderung dabei ist, VITT-Verdachtsfälle zu identifizieren, die Diagnose zu sichern und zügig zu therapieren, wenn labor diagnostische und radiologische Ressourcen in regionalen Gesundheitssystemen limitiert sind. Auch wenn fast alle bisher publizierten VITT-Fälle nach der 1. Impfung aufgetreten sind, zeigen jüngere Berichte, dass eine VITT durchaus auch nach der 2. Impfung mit einem Adenovirus-vektorbasierten Vakzin auftreten kann [8]. Dabei ist die Latenz zwischen Impfung und Symptombeginn möglicherweise etwas kürzer als bei Manifestation einer VITT nach der 1. Impfung. Um Mortalität und Morbidität durch schwere Thrombosen gering zu halten, muss es das Ziel sein, Risikopatienten bereits dann zu erkennen, wenn erst das Prodromalstadium der VITT, das Prä-VITT-Syndrom, vorliegt. Hierfür ist ein Clinical Pathway publiziert worden, der auch unter den besonderen Umständen eines LICs umsetzbar ist [15].

Interessenkonflikt

F.S. reports personal fees from Bristol-Myers Squibb, AstraZeneca, MD Horizonte and AMEOS, all outside the submitted work. L.S. was supported within the Gerhard-Domagk-Research-Program by the University Medicine Greifswald. A.G. reports grants and non-financial support from Aspen, Boehringer Ingelheim, MSD, Bristol Myers Squibb (BMS), Paringenix, Bayer Healthcare, Gore Inc., Rovi, Sagent, Biomarin/Prosensa, personal fees from Aspen, Boehringer Ingelheim, MSD, Macopharma. This work has been supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft, Grant/Award Number: 374031971-TRR 240. M.E. received funding from DFG under Germany's Excellence Strategy – EXC-2049 – 390688087, BMBF, DZNE, DZHK, EU, Corona Foundation, and Fondation Leducq. M.E. also reports grants from Bayer and fees

paid to the Charité from AstraZeneca, Bayer, Boehringer Ingelheim, BMS, Daiichi Sankyo, Amgen, GSK, Sanofi, Covidien, Novartis, Pfizer, all outside the submitted work.

Literatur

- [1] Long B, Bridwell R, Gottlieb M. Thrombosis with thrombocytopenia syndrome associated with COVID-19 vaccines. *Am J Emerg Med* 2021; 49: 58–61. doi:10.1016/j.ajem.2021.05.054. PMID: 34062319
- [2] See I, Su JR, Lale A et al. US Case Reports of Cerebral Venous Sinus Thrombosis with Thrombocytopenia after Ad26.COVS.2 Vaccination, March 2 to April 21, 2021. *JAMA* 2021; 325: 2448–2456
- [3] European Medicines Agency (EMA) Vaxzevria (previously covid-19 vaccine astra zeneca): Epar – product information. 2021 [Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/vaxzevria-previously-covid-19-vaccine-astrazeneca>
- [4] European Medicines Agency & Healthcare products Regulatory Agency- Public assessment report authorisation for temporary supply – covid-19 vaccine astrazeneca, solution for injection in multidose container covid-19 vaccine (chadox1-s [recombinant]). 2021 [Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/vaxzevria-previously-covid-19-vaccine-astrazeneca-epar-public-assessment-report_en.pdf
- [5] European Medicines Agency (EMA) COVID-19 Vaccine Janssen (COVID-19 vaccine (Ad26.COVS.2 [recombinant])) 2021 [Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/covid-19-vaccine-janssen>
- [6] Pavord S, Scully M, Hunt BJ et al. Clinical Features of Vaccine-Induced Immune Thrombocytopenia and Thrombosis. *N Engl J Med* 2021; 385: 1680–1689. doi:10.1056/NEJMoa2109908. PMID: 34379914
- [7] Baldini T, Asioli GM, Romoli M et al. Cerebral venous thrombosis and severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 infection: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Neurol* 2021; 28: 3478–3490. doi:10.1111/ene.14727. PMID: 33426733
- [8] Krzywicka K, van de Munckhof A, Zimmermann J et al. Cerebral venous thrombosis due to vaccine-induced immune thrombotic thrombocytopenia after a second ChAdOx1 nCoV-19 dose. *Blood* 2022; 139: 2720–2724. doi:10.1182/blood.2021015329. PMID: 35263427
- [9] Schultz NH, Sørvoll IH, Michelsen AE et al. Thrombosis and Thrombocytopenia after ChAdOx1 nCoV-19 Vaccination. *N Engl J Med* 2021; 384: 2124–2130. doi:10.1056/NEJMoa2104882. PMID: 33835768
- [10] Greinacher A, Thiele T, Warkentin TE et al. Thrombotic Thrombocytopenia after ChAdOx1 nCov-19 Vaccination. *N Engl J Med* 2021; 384: 2092–2101. doi:10.1056/NEJMoa2104840. PMID: 33835769
- [11] Scully M, Singh D, Lown R et al. Pathologic Antibodies to Platelet Factor 4 after ChAdOx1 nCoV-19 Vaccination. *N Engl J Med* 2021; 384: 2202–2211. doi:10.1056/NEJMoa2105385. PMID: 33861525
- [12] Sánchez van Kammen M, Aguiar de Sousa D, Poli S et al. Cerebral Venous Sinus Thrombosis With Thrombocytopenia Syndrome Study Group. Characteristics and Outcomes of Patients With Cerebral Venous Sinus Thrombosis in SARS-CoV-2 Vaccine-Induced Immune Thrombotic Thrombocytopenia. *JAMA Neurol* 2021; 78: 1314–1323. doi:10.1001/jamaneurol.2021.3619. PMID: 34581763
- [13] Nicolai L, Leunig A, Pekayvaz K et al. Thrombocytopenia and splenic platelet directed immune responses after intravenous ChAdOx1 nCov-19 administration. *Blood* 2022 blood.2021014712. doi:10.1182/blood.2021014712. Epub ahead of print. PMID: 35486845; PMCID: PMC9060731
- [14] Salih F, Schönborn L, Kohler S et al. Vaccine-Induced Thrombocytopenia with Severe Headache. *N Engl J Med* 2021; 385: 2103–2105. doi:10.1056/NEJMc2112974. PMID: 34525282
- [15] Salih F, Kohler S, Schönborn L et al. Early recognition and treatment of pre-VITT syndrome after adenoviral vector-based SARS-CoV-2 vaccination may prevent from thrombotic complications: review of published cases and clinical pathway. *Eur Heart J Open* 2022; 2: 1–10. doi:10.1093/ehjopen/oeac036
- [16] van de Munckhof A, Krzywicka K, de Sousa DA et al. Declining mortality of cerebral venous sinus thrombosis with thrombocytopenia after SARS-CoV-2 vaccination. *Eur J Neurol* 2022; 29: 339–344
- [17] American Society of Hematology. Vaccine-induced Immune Thrombotic Thrombocytopenia (Version 1.9; last updated May 9,2022). Link: <https://www.hematology.org/covid-19/vaccine-induced-immune-thrombotic-thrombocytopenia>
- [18] Schönborn L, Greinacher A. Longitudinal Aspects of VITT. *Semin Hematol* 2022; 59: 108–114. doi:10.1053/j.seminhematol.2022.03.001. PMID: 35512899
- [19] Schönborn L, Thiele T, Kaderali L et al. Most anti-PF4 antibodies in vaccine-induced immune thrombotic thrombocytopenia are transient. *Blood* 2022; 139: 1903–1907. doi:10.1182/blood.2021014214. PMID: 35113987
- [20] Krauel K, Pötschke C, Weber C et al. Platelet factor 4 binds to bacteria, [corrected] inducing antibodies cross-reacting with the major antigen in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 2011; 117: 1370–1378. doi:10.1182/blood-2010-08-301424.
- [21] Palankar R, Kohler TP, Krauel K et al. Platelets kill bacteria by bridging innate and adaptive immunity via platelet factor 4 and Fcγ3b. *J Thromb Haemost* 2018; 16: 1187–1197
- [22] Zheng Y, Wang AW, Yu M et al. B-cell tolerance regulates production of antibodies causing heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 2014; 123: 931–934
- [23] Krauel K, Schulze A, Jouni R et al. Further insights into the anti-PF4/heparin IgM immune response. *Thromb Haemost* 2016; 115: 752–761
- [24] Delcea M, Greinacher A. Biophysical tools to assess the interaction of PF4 with polyanions. *Thromb Haemost* 2016; 116: 783–791
- [25] Nguyen TH, Greinacher A, Delcea M. Quantitative description of thermodynamic and kinetic properties of the platelet factor 4/heparin bonds. *Nanoscale* 2015; 7: 10130–10139
- [26] Kreimann M, Brandt S, Krauel K et al. Binding of anti-platelet factor 4/heparin antibodies depends on the thermodynamics of conformational changes in platelet factor 4. *Blood* 2014; 124: 2442–2449
- [27] Hursting MJ, Pai PJ, McCracken JE et al. Platelet factor 4/heparin antibodies in blood bank donors. *Am J Clin Pathol* 2010; 134: 774–780. doi:10.1309/AJCPG0MNR5NGKNFX. PMID: 20959660
- [28] Greinacher A, Holtfreter B, Krauel K et al. Association of natural anti-platelet factor 4/heparin antibodies with periodontal disease. *Blood* 2011; 118: 1395–1401. doi:10.1182/blood-2011-03-342857. PMID: 21659541
- [29] Othman M, Baker AT, Gupalo E et al. To clot or not to clot? Ad is the question-Insights on mechanisms related to vaccine-induced thrombotic thrombocytopenia. *J Thromb Haemost* 2021; 19: 2845–2856. doi:10.1111/jth.15485. PMID: 34351057
- [30] Othman M, Labelle A, Mazzetti I et al. Adenovirus-induced thrombocytopenia: the role of von Willebrand factor and P-selectin in mediating accelerated platelet clearance. *Blood* 2007; 109: 2832–2839
- [31] Baker AT, Boyd RJ, Sarkar D et al. ChAdOx1 interacts with CAR and PF4 with implications for thrombosis with thrombocytopenia syndrome. *Sci Adv* 2021; 7: eabl8213
- [32] Michalik S, Siegerist F, Palankar R et al. Comparative analysis of ChAdOx1 nCov-19 and Ad26.COVS.2 SARS-CoV-2 vector vaccines. *Haematologica* 2022; 107: 947–957. doi:10.3324/haematol.2021.280154. PMID: 35045692

- [33] Holen HL, Zernichow L, Fjelland KE et al. Ephrin-B3 binds to a sulfated cell-surface receptor. *Biochem J* 2011; 433: 215–223. doi:10.1042/BJ20100865. PMID: 20925654
- [34] Alban S, Neupane S, Girreser U et al. The COVID-19 vaccine ChAdOx1-S is not contaminated with sulfated glycosaminoglycans. *J Thromb Haemost* 2022; 20: 777–780. doi:10.1111/jth.15633. PMID: 34971474
- [35] Jaax ME, Krauel K, Marschall T et al. Complex formation with nucleic acids and aptamers alters the antigenic properties of platelet factor 4. *Blood* 2013; 122: 272–281. doi:10.1182/blood-2013-01-478966. PMID: 23673861
- [36] Choi PY. Thrombotic Thrombocytopenia after ChAdOx1 nCoV-19 Vaccination. *N Engl J Med* 2021; 385: e11. doi:10.1056/NEJMc2107227. PMID: 34133852
- [37] Ramge P, Unger RE, Oltrogge JB et al. Polysorbate-80 coating enhances uptake of polybutylcyanoacrylate (PBCA)-nanoparticles by human and bovine primary brain capillary endothelial cells. *Eur J Neurosci* 2000; 12: 1931–1940. doi:10.1046/j.1460-9568.2000.00078.x. PMID: 10886334
- [38] Greinacher A, Selleng K, Palankar R et al. Insights in ChAdOx1 nCoV-19 vaccine-induced immune thrombotic thrombocytopenia. *Blood* 2021; 138: 2256–2268. doi:10.1182/blood.2021013231. PMID: 34587242
- [39] Huynh A, Kelton JG, Arnold DM et al. Antibody epitopes in vaccine-induced immune thrombotic thrombocytopenia. *Nature* 2021; 596: 565–569. doi:10.1038/s41586-021-03744-4. PMID: 34233346
- [40] Singh A, Toma F, Uzun G et al. The interaction between anti-PF4 antibodies and anticoagulants in vaccine-induced thrombotic thrombocytopenia. *Blood* 2022; 139: 3430–3438. doi:10.1182/blood.2021013839. PMID: 35679071
- [41] Vayne C, Palankar R, Billy S et al. The deglycosylated form of 1E12 inhibits platelet activation and prothrombotic effects induced by VITT antibodies. *Haematologica* 2022. doi:10.3324/haematol.2021.280251. PMID: 35385923
- [42] See I, Lale A, Marquez P et al. Case Series of Thrombosis With Thrombocytopenia Syndrome After COVID-19 Vaccination—United States, December 2020 to August 2021. *Ann Intern Med* 2022; 175: 513–522. doi:10.7326/M21-4502. PMID: 35038274
- [43] Paul-Ehrlich-Institut G.Sicherheitsbericht: Verdachtsfälle von Nebenwirkungen und Impfkomplicationen nach Impfung zum Schutz vor COVID-19 seit Beginn der Impfkampagne am 27.12.2020 bis zum 30.09.2021. Link: https://www.pei.de/SharedDocs/Downloads/DE/newsroom/dossiers/sicherheitsberichte/sicherheitsbericht-27-12-20-bis-30-09-21.pdf?__blob=publicationFile&v=9
- [44] Li R, Liu J, Wu S et al. Toll-like receptor 4 signalling regulates antibody response to adenoviral vector-based vaccines by imprinting germinal centre quality. *Immunology* 2018; 155: 251–262. doi:10.1111/imm.12957. PMID: 29876918
- [45] Pfueller SL, Logan D, Tran TT et al. Naturally occurring human IgG antibodies to intracellular and cytoskeletal components of human platelets. *Clin Exp Immunol* 1990; 79: 367–373. doi:10.1111/j.1365-2249.1990.tb08097.x. PMID: 2107990
- [46] Gao X, Kouklis P, Xu N et al. Reversibility of increased microvessel permeability in response to VE-cadherin disassembly. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279: L1218–L1225. doi:10.1152/ajplung.2000.279.6.L1218. PMID: 11076812
- [47] Uzun G, Althaus K, Bakchoul T. No Correlation between Anti-PF4 and Anti-SARS-CoV-2 Antibodies after ChAdOx1 nCoV-19 Vaccination. *N Eng. J Med* 2021; 385: 1334–1336
- [48] Greinacher A, Schönborn L, Siegerist F et al. Pathogenesis of vaccine-induced immune thrombotic thrombocytopenia (VITT). *Semin Hematol* 2022; 59: 97–107. doi:10.1053/j.seminhematol.2022.02.004. Epub 2022 Feb 23. PMID: 35512907
- [49] Schönborn L, Thiele T, Kaderali L et al. Decline in Pathogenic Antibodies over Time in VITT. *N Eng J Med* 2021; 385: 1815–1816
- [50] Lindhoff-Last E, Schönborn L, Piorkowski M et al. Heterogeneity of Vaccine-Induced Immune Thrombotic Thrombocytopenia after ChAdOx1 nCoV-19 Vaccination and Safety of Second Vaccination with BNT162b2. *Thromb Haemost* 2022; 122: 304–307
- [51] Lacy J, Pavord S, Brown KE VITT. and Second Doses of Covid-19 Vaccine. *N Eng. J Med* 2022; 386: 95
- [52] Warkentin TE, Sheppard JA. Serological investigation of patients with a previous history of heparin-induced thrombocytopenia who are reexposed to heparin. *Blood* 2014; 123: 2485–2493
- [53] Lubenow N, Hinz P, Thomaschewski S et al. The severity of trauma determines the immune response to PF4/heparin and the frequency of heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 2010; 115: 1797–1803. doi:10.1182/blood-2009-07-231506. PMID: 19965682
- [54] Greinacher A. Heparin-Induced Thrombocytopenia. *N Eng J Med* 2015; 373: 1883–1884
- [55] Warkentin TE, Kelton JG. Temporal aspects of heparin-induced thrombocytopenia. *N Eng J Med* 2001; 344: 1286–1292
- [56] Günther A, Brämer D, Pletz MW. Complicated Long Term Vaccine Induced Thrombotic Immune Thrombocytopenia – A Case Report. *Vaccines (Basel)* 2021; 9: 1344. doi:10.3390/vaccines9111344. PMID: 34835275
- [57] Khandelwal S, Ravi J, Rauova L et al. Polyreactive IgM initiates complement activation by PF4/heparin complexes through the classical pathway. *Blood* 2018; 132: 2431–2440. doi:10.1182/blood-2018-03-834598. PMID: 30309891
- [58] Arepally GM, Cines DB. Pathogenesis of heparin-induced thrombocytopenia. *Transl Res* 2020; 225: 131–140
- [59] Thiele T, Ulm L, Holtfreter S et al. Frequency of positive anti-PF4/polyanion antibody tests after COVID-19 vaccination with ChAdOx1 nCoV-19 and BNT162b2. *Blood* 2021; 138: 299–303. doi:10.1182/blood.2021012217. PMID: 33988688
- [60] Thiele T, Weisser K, Schönborn L et al. Laboratory confirmed vaccine-induced immune thrombotic thrombocytopenia: Retrospective analysis of reported cases after vaccination with ChAdOx1 nCoV-19 in Germany. *Lancet Reg Health Eur* 2022; 12: 100270. doi:10.1016/j.lanep.2021.100270. PMID: 34901912
- [61] Uzun G, Althaus K, Singh A et al. The use of IV immunoglobulin in the treatment of vaccine-induced immune thrombotic thrombocytopenia. *Blood* 2021; 138: 992–996. doi:10.1182/blood.2021012479. PMID: 34166507
- [62] Bourguignon A, Arnold DM, Warkentin TE et al. Adjunct Immune Globulin for Vaccine-Induced Immune Thrombotic Thrombocytopenia. *N Engl J Med* 2021; 385: 720–728. doi:10.1056/NEJMoa2107051. PMID: 34107198
- [63] Althaus K, Möller P, Uzun G et al. Antibody-mediated procoagulant platelets in SARS-CoV-2-vaccination associated immune thrombotic thrombocytopenia. *Haematologica* 2021; 106: 2170–2179. doi:10.3324/haematol.2021.279000. PMID: 34011137
- [64] Holm S, Kared H, Michelsen AE et al. Immune complexes, innate immunity, and NETosis in ChAdOx1 vaccine-induced thrombocytopenia. *Eur Heart J* 2021; 42: 4064–4072. doi:10.1093/eurheartj/ehab506. PMID: 34405870
- [65] Beng C, Halina L, Jose P et al. NETosis and thrombosis in vaccine-induced immune thrombotic thrombocytopenia. *Nature Portfolio* 2022 preprint
- [66] Arepally GM, Padmanabhan A. Heparin-Induced Thrombocytopenia: A Focus on Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2021; 41: 141–152. doi:10.1161/Atvbaha.120.315445. PMID: 33267665
- [67] Blank M, Shoenfeld Y, Tavor S et al. Anti-platelet factor 4/heparin antibodies from patients with heparin-induced thrombocytopenia provoke direct activation of microvascular endothelial cells. *Int Immunol* 2002; 14: 121–129. doi:10.1093/intimm/14.2.121. PMID: 11809731

- [68] Johansen S, Laegreid IJ, Ernstsen SL et al. Thrombosis and thrombocytopenia after HPV vaccination. *J Thromb Haemost* 2022; 20: 700–704. doi:10.1111/jth.15604. PMID: 34817130
- [69] Greinacher A, Langer F, Schönborn L et al. Platelet-activating anti-PF4 antibodies mimic VITT antibodies in an unvaccinated patient with monoclonal gammopathy. *Haematologica* 107: 1219–1221. doi:10.3324/haematol.2021.280366. PMID: 34965704
- [70] Faille DH-NMO A, Amiral J, Huisse MG et al. Isolation of a monoclonal IgG kappa with functional autoantibody activity against platelet factor 4/heparin from a patient with a monoclonal gammopathy of undetermined significance and clinically overt heparin thrombocytopenia. *Res Pract Thromb Haemost* 2017; 1: 1355