

Una piastrinopenia “particolare”: la piastrinopenia indotta da eparina (HIT).

Armando D'Angelo

Servizio di Coagulazione ed Unità' Ricerca Trombosi
IRCCS H S. Raffaele, Milano

COMPLICANZE EMORRAGICHE E
TROMBOTICHE IN ONCOLOGIA:
DIAGNOSI E TERAPIA

Milano, 26-27 Novembre 2008

HIT

- Il trattamento con eparina induce due tipi di piastrinopenia (**thrombocytopenia**):
- Il tipo I (*frequente*) e' caratterizzato da una modica discesa della conta piastrinica, dell'ordine del 10%-20%, puo' associarsi ad aumento delle transaminasi ed e' del tutto transitorio, anche proseguendo la somministrazione di eparina. **Non e' da considerarsi evento avverso.**

HIT (tipo II)

- Il tipo II (la vera HIT) e' un evento avverso serio (SAE),
- autoanticorpo-mediato,
- che puo' dar luogo alla comparsa di fenomeni trombotici durante o
- (raramente, in circa il 5% dei casi) dopo la sospensione del trattamento con eparina (**delayed HITT**).

Patogenesi della HIT (tipo II)

I protagonisti:

- Neo-epitopo immunogeno → autoanticorpo
- Neo-antigene → complesso Ag-autoAb
- Recettore dell'autoanticorpo
- Attivazione piastrinica intravascolare
- Riduzione della conta piastrinica
- Trombosi

Il fattore piastrinico 4

- Il fattore piastrinico 4 (PF4, rilasciato dalle piastrine **attivate** e fortemente **elettropositivo**, al pari di alcune citochine come la **IL-8**) si lega alla superficie delle stesse ed agli eparansolfati di membrana endoteliale (analoghi dell'eparina, fortemente **elettronegativi**) inibendone l'attività anticoagulante, un meccanismo che contrasta l'attività dell'**antitrombina** e che facilita l'emostasi fisiologica.

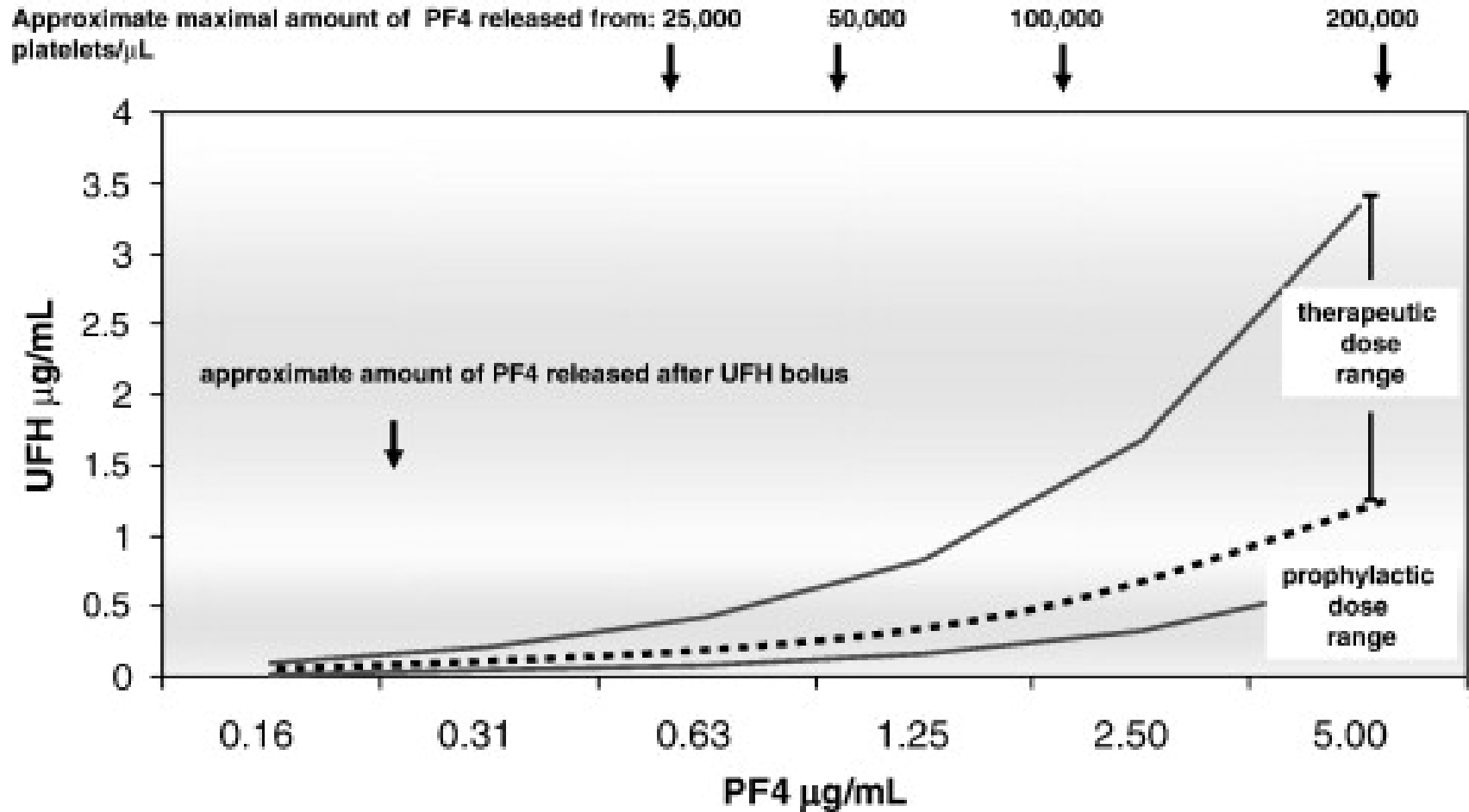
Patogenesi della HIT (type II)

- Il legame con l'eparina, somministrata a fini profilattici o terapeutici, induce la formazione di un complesso con molecole di PF4 che a sua volta rappresenta il neoepitopo immunogeno per la formazione di autoanticorpi.

Che relazione tra dosaggi di UFH ed immunogenicit  per la formazione di autoanticorpi (HIT-Abs)?

Greinacher A, et al. Thromb Res 2008;122:211-20

a



Greinacher A, et al. Thromb Res 2008;122:211-20

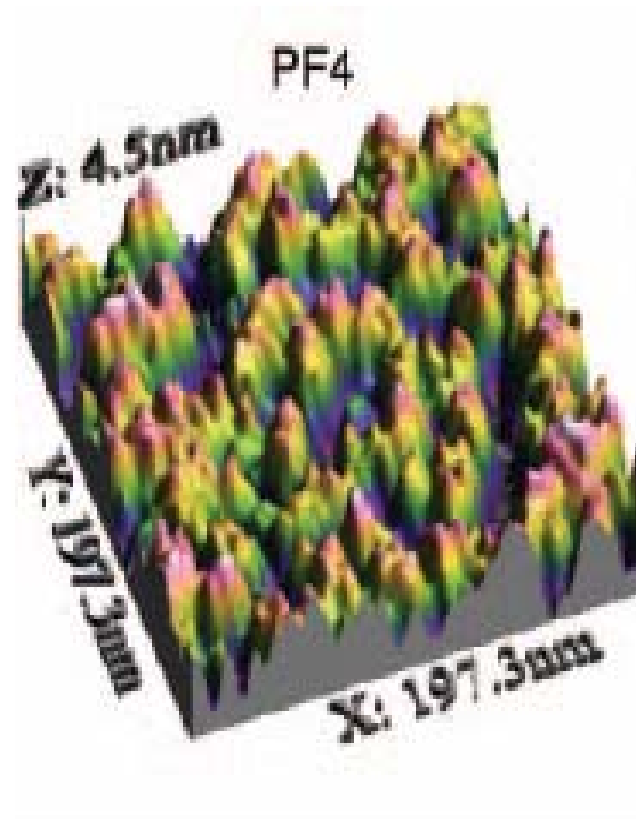
- with **therapeutic-dose** UFH, complex formation with PF4 should be expected primarily in situations of **major** platelet activation resulting in very high concentrations of PF4.
- with **prophylactic-dose** UFH, complex formation with PF4 should be expected primarily in situations of **moderate to major** platelet activation resulting in increased concentrations of PF4.
- for a given amount of PF4 availability, **complex formation with PF4 is more likely to occur with prophylactic-dose UFH** compared with therapeutic-dose UFH.

Quale e' il neo-antigene
riconosciuto dagli autoanticorpi ?

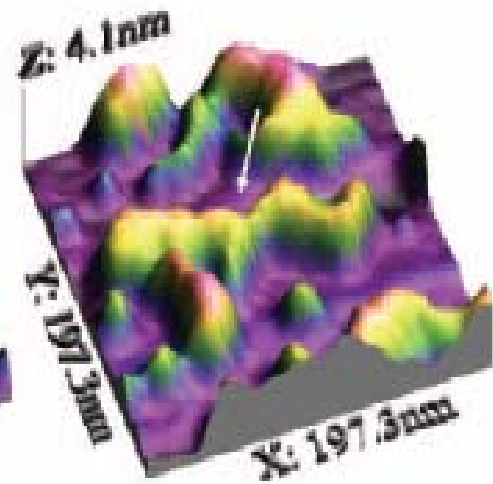
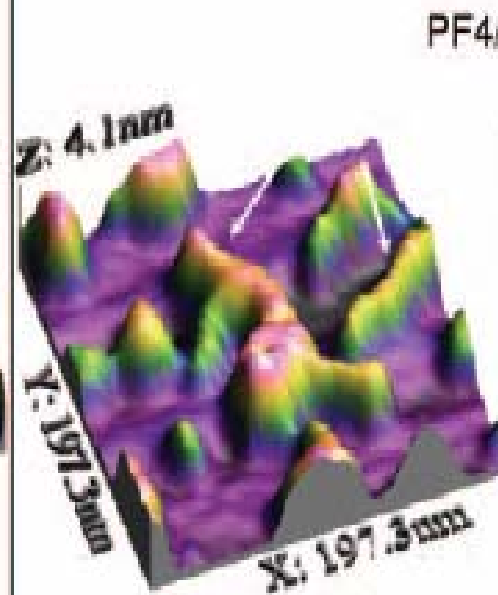
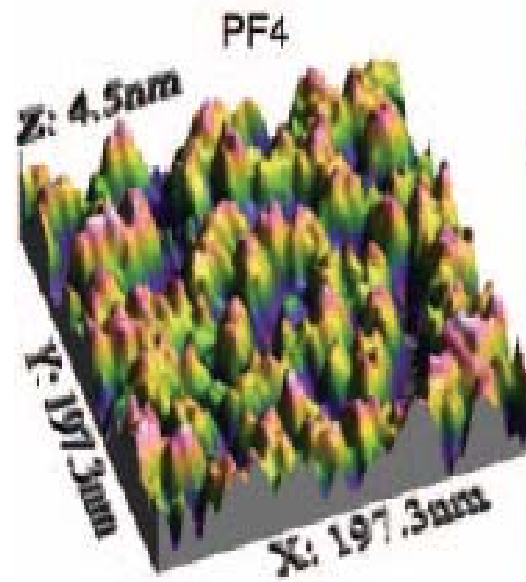
Greinacher A, et al.
Close Approximation of Two Platelet
Factor 4 Tetramers by
Charge Neutralization Forms the
Antigens Recognized by
HIT Antibodies

Arterioscler Thromb Vasc Biol
2006;26:2386-2393.

Greinacher et al, 2006

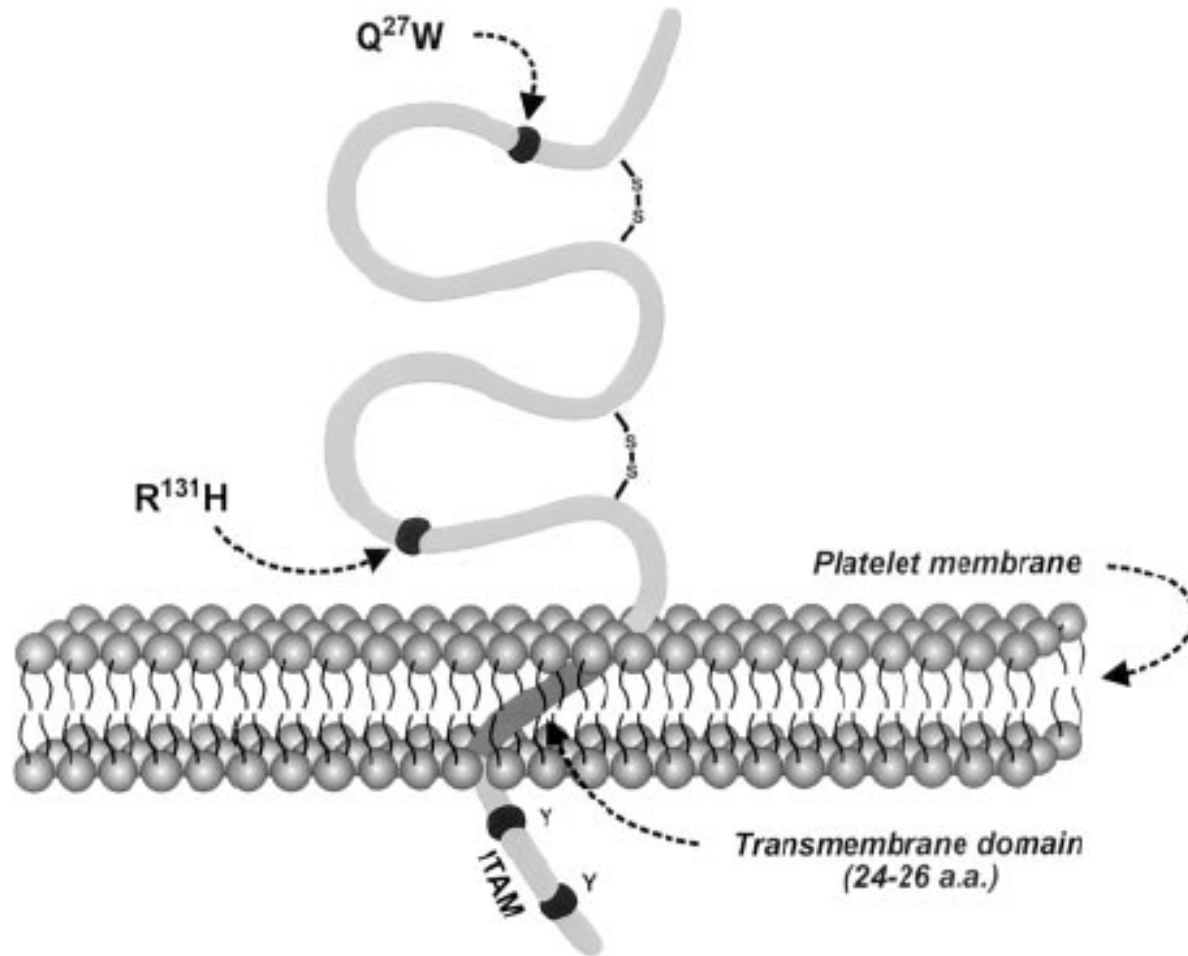


Greinacher et al, 2006



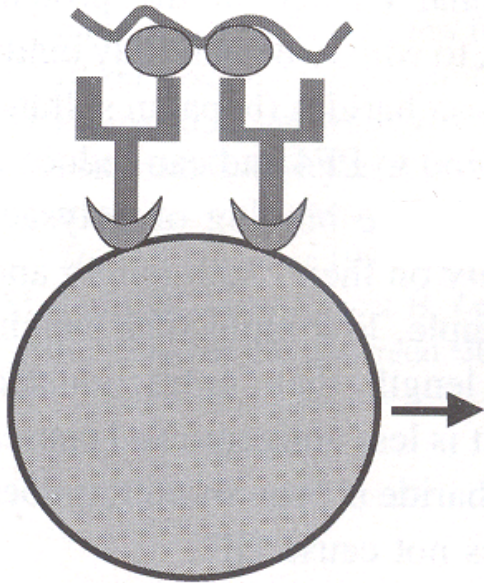
Il meccanismo di attivazione
piastrinica da parte degli
autoanticorpi

Il recettore piastrinico per Fc (CD32, FcRIIA)



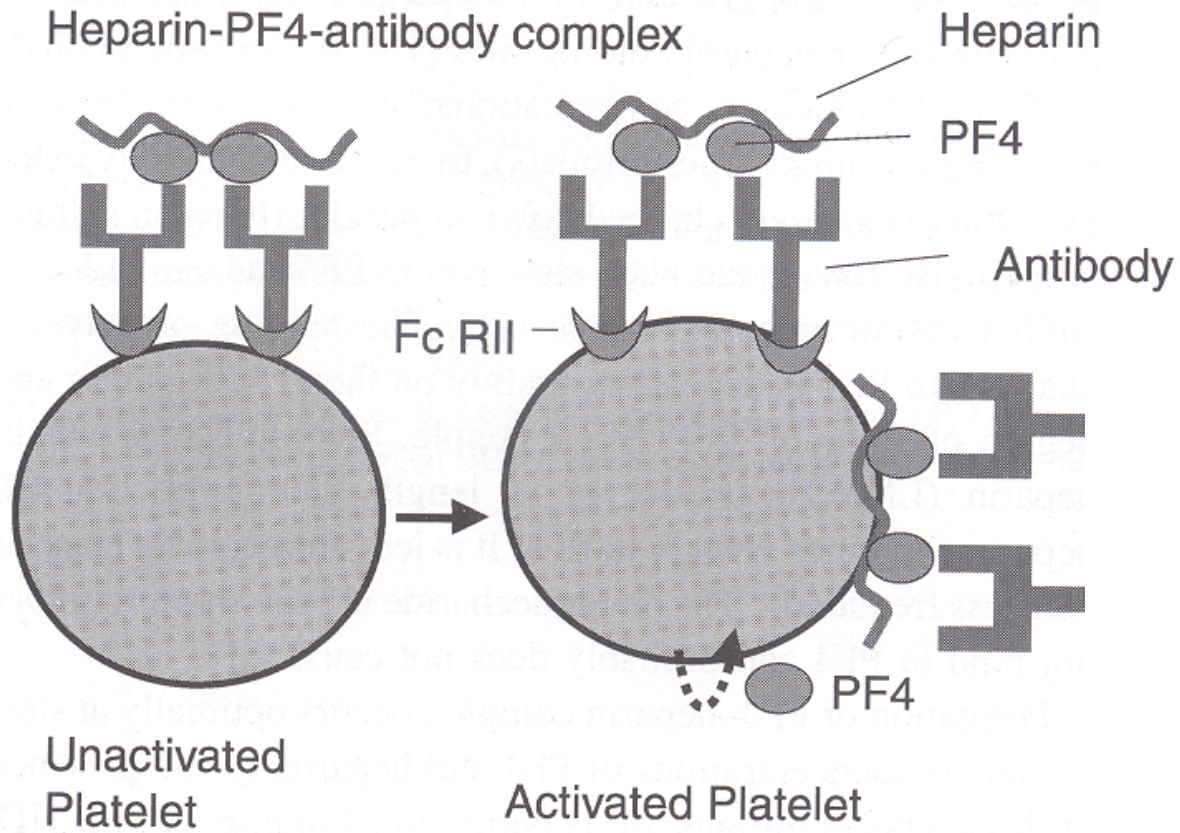
HIT type II

Heparin-PF4 -autoAb

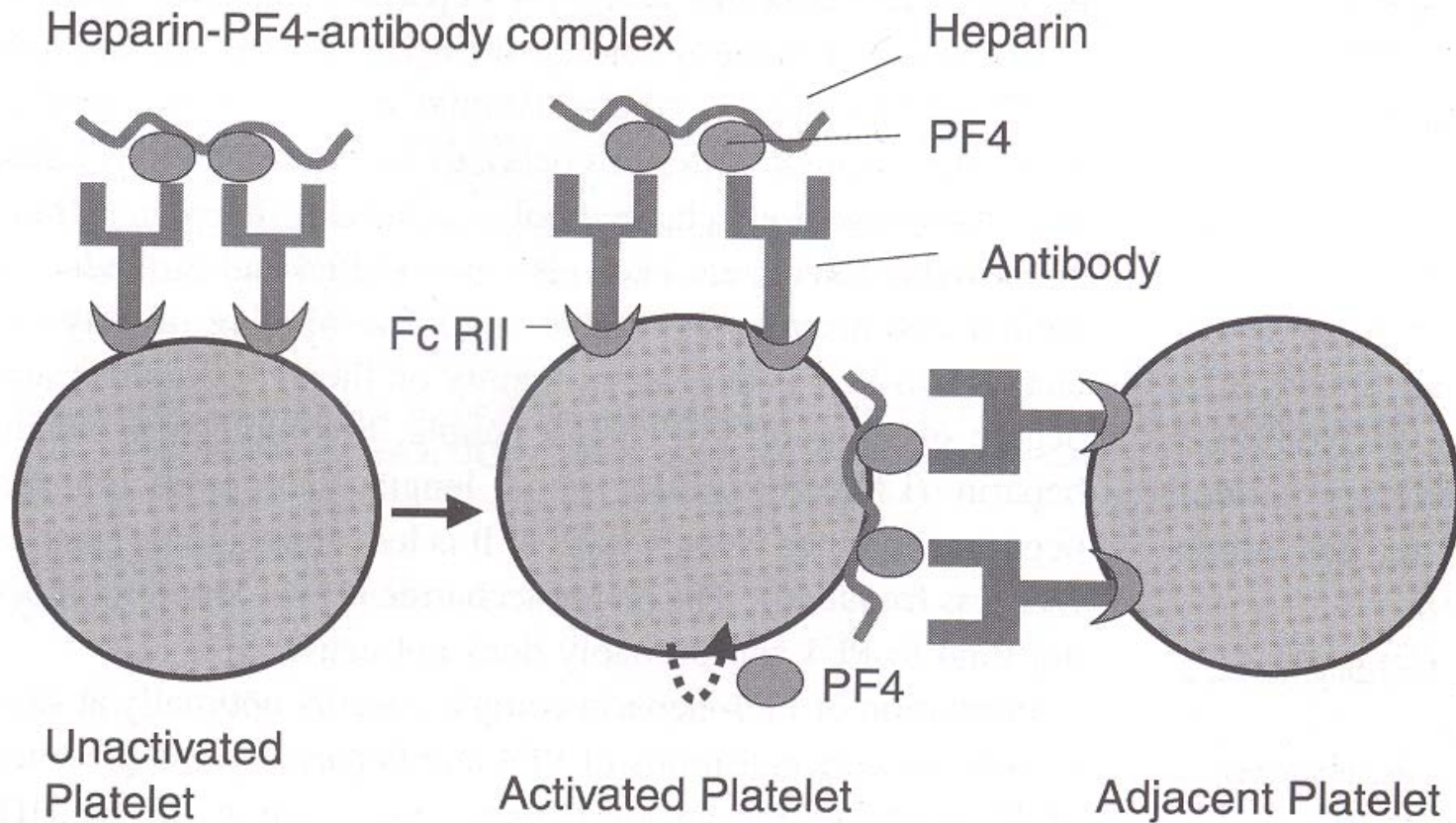


Unactivated
Platelet

HIT type II



HIT type II



I determinanti del fenomeno

- La reazione inducente piastrinopenia sara' tanto maggiore quanto:

I determinanti del fenomeno

- La reazione inducente piastrinopenia sara' tanto maggiore quanto:
 1. maggiore il titolo (auto)anticorpale e

I determinanti del fenomeno

- La reazione inducente piastrinopenia sarà tanto maggiore quanto:
 1. maggiore il titolo (auto)anticorpale e
 2. maggiore la quantità di PF4 rilasciata alla superficie delle piastrine

I determinanti del fenomeno

- La reazione sara' tanto maggiore quanto:
 1. maggiore il titolo (auto)anticorpale e
 2. maggiore la quantita' di PF4 rilasciata alla superficie delle piastrine

Quindi...

I determinanti del fenomeno

1. Condizioni patologiche coinvolgenti stati di forte attivazione piastrinica (chirurgia, contatto con superfici estranee), e
2. Contenuto di PF4 nei granuli piastrinici e
3. Titolo (auto)anticorpale
risulteranno determinanti del **grado di piastrinopenia**

Di conseguenza...

HIT type II

- I pazienti con HIT sono a forte rischio di **manifestazioni trombotiche** in funzione:

HIT type II

- I pazienti con HIT sono a forte rischio di **manifestazioni trombotiche** in funzione:
 1. della tipologia patologica,

HIT type II

- I pazienti con HIT sono a forte rischio di **manifestazioni trombotiche** in funzione:
 1. della tipologia patologica,
 2. dell'entità del titolo anticorpale,

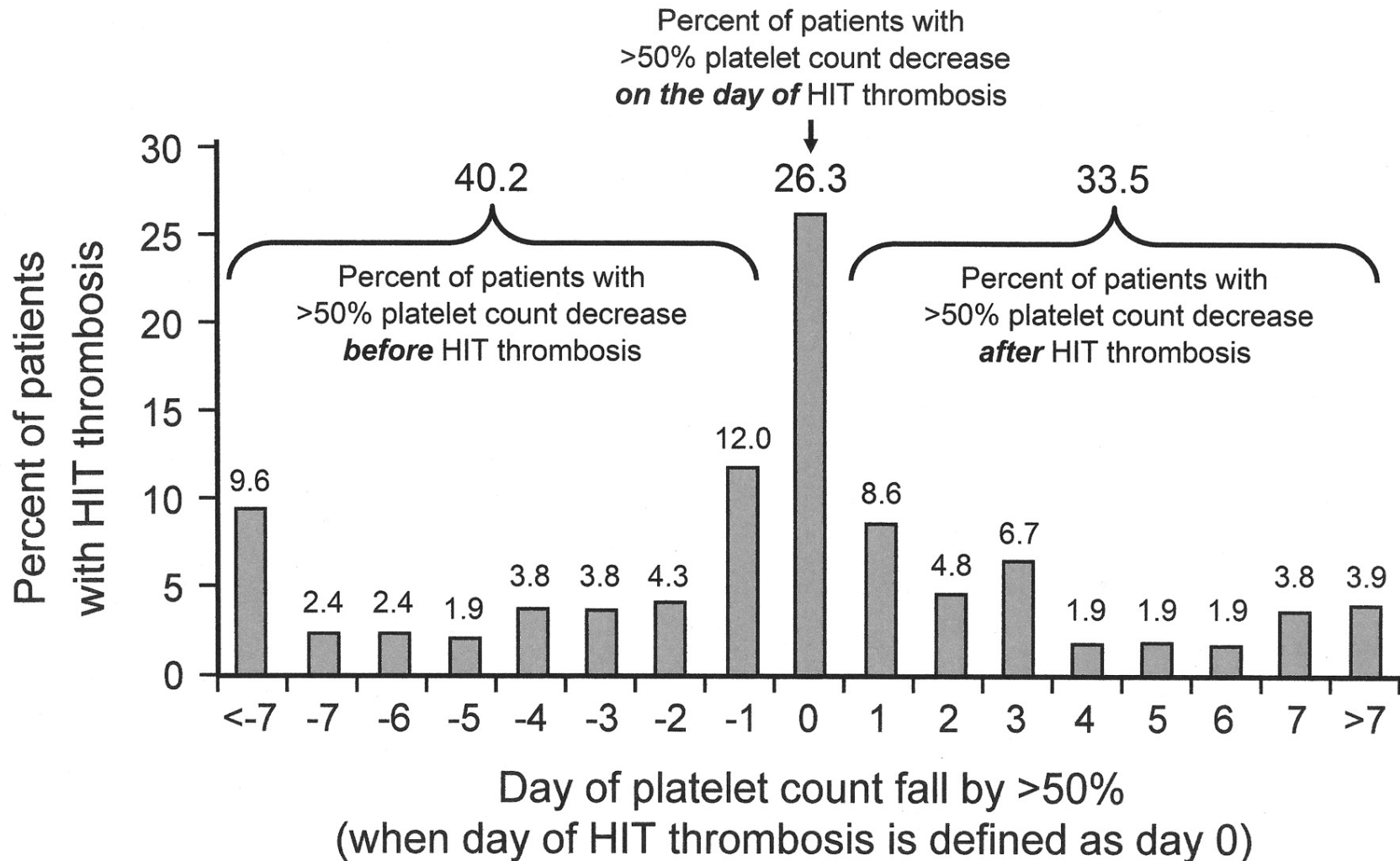
HIT type II

- I pazienti con HIT sono a forte rischio di **manifestazioni trombotiche** in funzione:
 1. della tipologia patologica,
 2. dell'entità del titolo anticorpale,
 3. e quindi del grado di piastrinopenia.

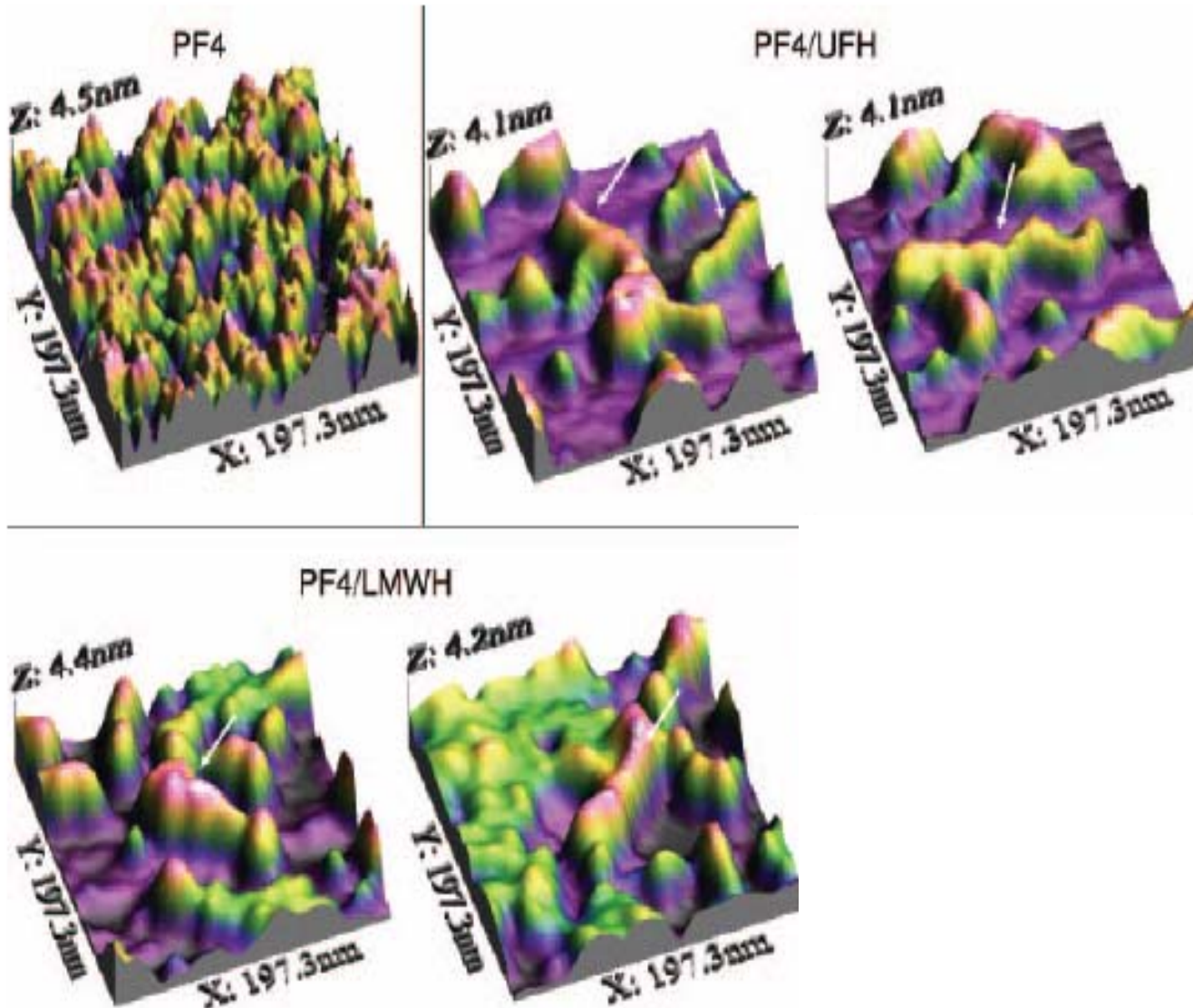
HIT e trombosi (HITT)

- Manifestazioni trombotiche (venose e/o arteriose) si verificano in circa il 25% dei pazienti con HIT,
- e possono insorgere prima, in corrispondenza, o successivamente al raggiungimento del nadir della conta piastrinica

Warkentin TE. Hematology 2006;2006:408-414



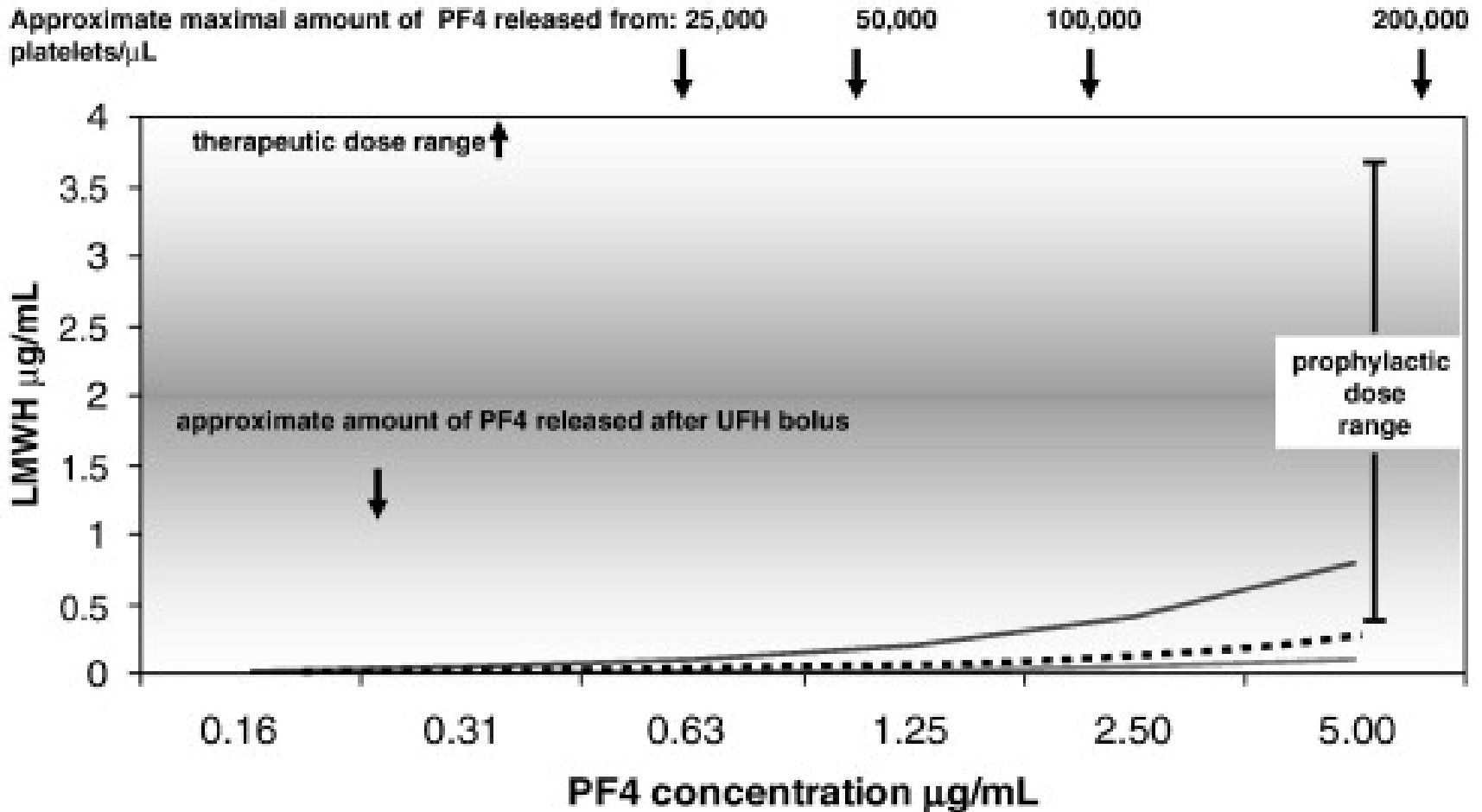
Anche le EBPM possono indurre la formazione di neo-antigeni



Che relazione tra dosaggi di LMWH ed immunogenicit  per la formazione di autoanticorpi (HIT-Abs)?

Greinacher A, et al. Thromb Res 2008;122:211-20

b



- therapeutic-dose LMWH is too high for optimal formation of PF4/LMWH complexes.
- in prophylactic-dose administration of LMWH, complex formation with PF4 should primarily be expected in case of major platelet activation resulting in high concentrations of PF4 and during time periods when LMWH reaches its lowest concentration, i.e., before the subsequent dose is given.

LMWH vs UFH e HIT

	Setting	UFH	LMWH
Martel N et al,2005	Prophylaxis	2.6%	0.2%

LMWH vs UFH e HIT

	Setting	UFH	LMWH
Martel N et al,2005	Prophylaxis	2.6%	0.2%
Girolami B, et al,2003	Medical	0.8%	-
Prandoni P, et al, 2005	Medical	-	0.8%

Caratteri distintivi tra LMW-HIT e UF-HIT

- L'intervallo temporale tra inizio del trattamento eparinico e comparsa di piastrinopenia e' piu' lungo con le EBPM che con l'eparina non frazionata.
- Il grado della piastrinopenia e' maggiore con le EBPM che con l'eparina non frazionata.

La diagnosi di HIT

a) somministrazione di eparina
(UFH o LMWH) in corso o
comunque molto recente

HIT type II

- Riduzione della conta piastrinica $\geq 50\%$
senza spiegazione alternativa.
- Lesioni cutanee al sito di somministrazione
- Reazioni sistemiche acute dopo somministrazione e.v.

HIT type II

- Riduzione della conta piastrinica $\geq 50\%$
senza spiegazione alternativa.
- Lesioni cutanee al sito di somministrazione
- Reazioni sistemiche acute dopo somministrazione e.v.

+

- **Presenza di autoanticorpi (HIT-Abs)**

Il problema degli autoanticorpi (HIT-Abs)

- ***Metodi immunologici***
- Elisa (PF4/eparina, PF4/ polianioni) totali (IgG, IgM, IgA)
- Elisa (PF4/eparina, PF4/polianioni) selettivi per IgG
- PaGIA
- PIFA

Il problema degli autoanticorpi (HIT-Abs)

- *Metodi funzionali*
- Rilascio serotonina marcata (*gold standard*)
- HIPA
- Aggregazione piastrinica
- Citofluorimetria (per marcatori di attivazione piastrinica)

Il problema dei metodi funzionali

- Servono donatori di piastrine (almeno 4) per la preparazione di:
 - Piastrine lavate
 - PRP.....

Il problema dei metodi funzionali

- Servono donatori di piastrine (almeno 4) per la preparazione di:
 - Piastrine lavate
 - PRP.....
- Non sono praticabili su larga scala

Il problema degli autoanticorpi (HIT-Abs)

- HIT-Abs si osservano in un'altissima percentuale di pazienti trattati con eparina, specialmente a seguito di interventi chirurgici **ortopedici** (~ 35%) o di **cardiochirurgia** (~ 70%)...

Il problema degli autoanticorpi (HIT-Abs)

- HIT-Abs si osservano in un'altissima percentuale di pazienti trattati con eparina, specialmente a seguito di interventi chirurgici **ortopedici** (~ 35%) o di **cardiochirurgia** (~ 70%)...
- **Se si utilizzano metodiche immunologiche**

Il problema degli autoanticorpi (HIT-Abs)

- HIT-Abs si osservano in un'altissima percentuale di pazienti trattati con eparina, specialmente a seguito di interventi chirurgici ortopedici (~ 35%) o di cardiocirurgia (~ 70%).
- **Nella maggior parte dei casi tali HIT-Abs non hanno affinità sufficiente per reagire con l'antigene/piastrine e non sono causali di piastrinopenia.**

HIT-Abs tests

- Immunoassays:
 1. Asserachrom HPIA (Stago)
 2. Zymutest HIA IgG (Hyphen BioMed)
 3. ID-PaGIA heparin/PF4 antibody test (DiaMed)
- Results obtained with the two ELISAs were graded as negative (below cut-off OD), positive (above cut-off OD, but below the positive control OD), and strongly positive (above the positive control OD).
- Negative, positive, and strongly positive ID-PaGIA test results were adjudicated by a single operator on undiluted serum samples.

HIT-Abs tests

- Functional assay:
 1. HIPA (as described by Greinacher et al, Thromb Haemost 1991; 66:734).
- With the HIPA test a sample was considered positive for HIT-Abs according to Eichler et al (Thromb Haemost 1999; 81:625), or otherwise negative.

Immunologic assays: summary

	ID-PaGIA	HPIA	Hyphen IgG	
neg	27%	32%	59%	
pos	46%	9%	5%	
strongly pos	27%	59%	36%	
Any positive	73%	68%	41%	

Immunologic and functional assays: summary

	ID-PaGIA	HPIA	Hyphen IgG	HIPA
neg	27%	32%	59%	73%
pos	46%	9%	5%	27%
strongly pos	27%	59%	36%	-
Any positive	73%	68%	41%	27%

Positivi per HIT-Abs al test funzionale (HIPA)

ID-PaGIA	HPIA	IgG	IgM	IgA
pos	strongly pos	strongly pos	neg	neg
strongly pos	strongly pos	strongly pos	neg	strongly pos
pos	strongly pos	neg	neg	neg
pos	strongly pos	neg	neg	neg
strongly pos	strongly pos	strongly pos	neg	neg
strongly pos	strongly pos	strongly pos	neg	neg

HIT-Abs tests

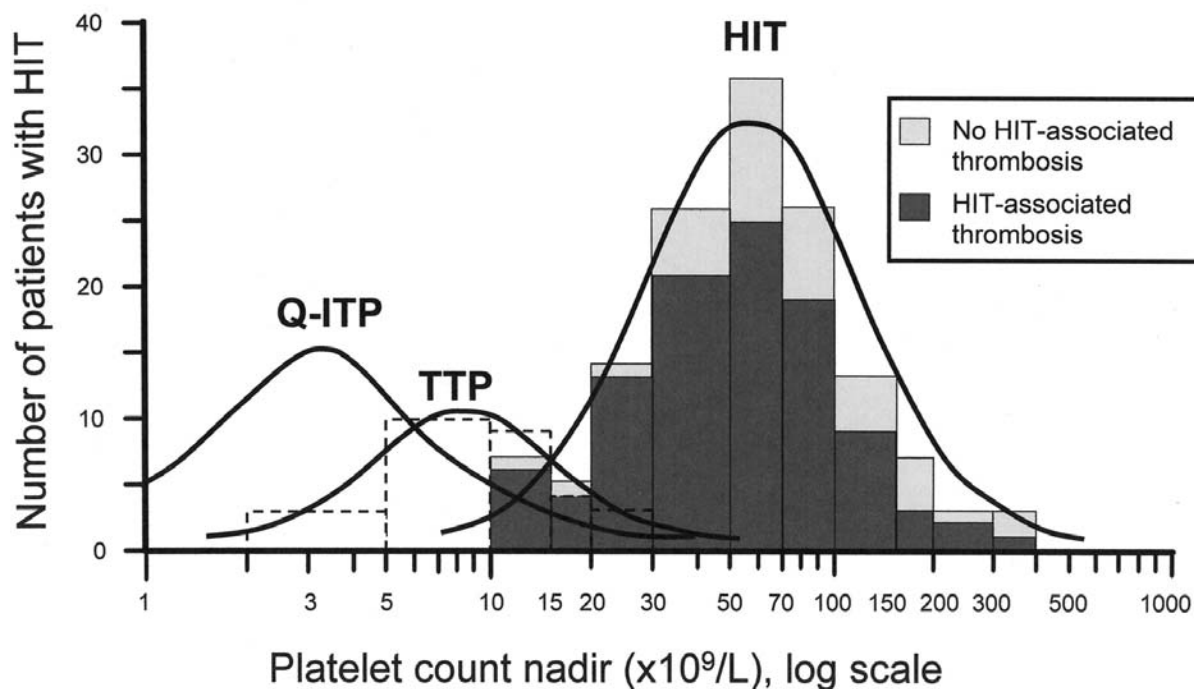
- Quindi test immunologici di principio piu' specifici non sono necessariamente altrettanto sensibili dei test funzionali.

Il ruolo della probabilità clinica a priori

Lo scoring della probabilita' a priori

4T's	2 punti	1 punto	0 punti
Trombocitopenia	↓ > 50% e nadir ≥ 20000/μl	↓ 30-50% o nadir 10- 19000/μl	↓ < 30% o nadir < 10000/μl

Figure 1. Platelet count nadirs in heparin-induced thrombocytopenia (HIT), quinine-induced immune thrombocytopenic purpura (Q-ITP), and thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) with absent ADAMTS-13 activity



Warkentin, T. E. Hematology 2006;2006:408-414

Lo scoring della probabilita' a priori

4T's	2 punti	1 punto	0 punti
Trombocitopenia	↓ > 50% e nadir ≥ 20000/μl	↓ 30-50% o nadir 10-19000/μl	↓ < 30% o nadir < 10000/μl
Timing dell'insorgenza di trombocitopenia	Tra 5 e 14* gg o ≤ 1g se previa esposizione entro 30 gg	Possibile tra 5 e 14 gg, ma non documentata; dopo 14* gg o ≤ 1 g se previa esposizione tra 30 e 100 gg	< 4 gg senza previa esposizione recente

Lo scoring della probabilita' a priori

4T's	2 punti	1 punto	0 punti
Trombocitopenia	↓ > 50% e nadir ≥ 20000/μl	↓ 30-50% o nadir 10-19000/μl	↓ < 30% o nadir < 10000/μl
Timing dell'insorgenza di trombocitopenia	Tra 5 e 14* gg o ≤ 1g se previa esposizione entro 30 gg	Possibile tra 5 e 14 gg, ma non documentata; dopo 14* gg o ≤ 1 g se previa esposizione tra 30 e 100 gg	< 4 gg senza previa esposizione recente
Trombosi od altre complicanze	Nuova trombosi, necrosi cutanea, reazione sistemica acuta al bolo i.v. di UFH	Trombosi progressiva o ricorrente, lesioni cutanee eritematose, trombosi sospettata	Nessuna

Lo scoring della probabilita' a priori

4T's	2 punti	1 punto	0 punti
Trombocitopenia	↓ > 50% e nadir ≥ 20000/μl	↓ 30-50% o nadir 10-19000/μl	↓ < 30% o nadir < 10000/μl
Timing dell'insorgenza di trombocitopenia	Tra 5 e 14* gg o ≤ 1g se previa esposizione entro 30 gg	Possibile tra 5 e 14 gg, ma non documentata; dopo 14* gg o ≤ 1 g se previa esposizione tra 30 e 100 gg	< 4 gg senza previa esposizione recente
Trombosi od altre complicanze	Nuova trombosi, necrosi cutanea, reazione sistemica acuta al bolo i.v. di UFH	Trombosi progressiva o ricorrente, lesioni cutanee eritematose, trombosi sospettata	Nessuna
Altra possibile causa di trombocitopenia	Nessuna apparente	Possibile	Certa

Commenti che accompagnano il modulo per la per la richiesta di anticorpi anti-PF4/eparina nel sospetto di piastrinopenia da eparina con e senza trombosi (HIT)

- La metodica per la misura degli anticorpi anti-PF4/eparina in uso presso l'Ospedale S. Raffaele di Milano è dotata di elevata sensibilità, ma di specificità relativamente bassa. Pertanto, mentre la negatività del test esclude con eccellente probabilità che la piastrinopenia sia da imputarsi al trattamento/profilassi eparinico, la positività del test non è indicativa in modo certo della presenza della patologia in questione.
Per una più corretta definizione della probabilità che sia realmente in atto una piastrinopenia da eparina è necessario il **combinato di dati clinici e di laboratorio**.

Questionario sottoposto ai reparti dell'Ospedale S. Raffaele di Milano per la richiesta di anticorpi anti-PF4/eparina nel sospetto di piastrinopenia da eparina con e senza trombosi (HIT) (I)

Dati paziente:

Cognome _____ Nome _____

Se pz. esterno Ente di Provenienza _____

Reparto di provenienza del paziente	
Sesso ed età del paziente	<input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> anni
Il paziente è post-chirurgico?	<input type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no
Conta piastrinica al momento della richiesta	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> X 1000 / mm ³
Valore più alto della conta piastrinica osservato nel paziente e sua distanza temporale dal nadir	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> X 1000 / mm ³ <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> giorni
Eparina somministrata	<input type="checkbox"/> E. non frazionata <input type="checkbox"/> EBPM
Dosaggio eparina	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> X 1000 U/die

Questionario sottoposto ai reparti dell'Ospedale S. Raffaele per la richiesta di anticorpi anti-PF4/eparina nel sospetto di piastrinopenia da eparina con e senza trombosi (HIT) (II)

Intervallo di tempo tra la somministrazione di eparina attualmente in corso e la comparsa di piastrinopenia	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> giorni
Il paziente è stato sottoposto in passato all'eparina?	<input type="checkbox"/> E. non frazionata <input type="checkbox"/> EBPM <input type="checkbox"/> no
Se sì, l'esposizione è stata:	<input type="checkbox"/> nei 30 gg precedenti <input type="checkbox"/> tra i 30 gg e i 100 gg precedenti <input type="checkbox"/> oltre i 100 gg precedenti
E' in atto un fenomeno trombotico associato temporalmente alla piastrinopenia?	<input type="checkbox"/> sì <input type="checkbox"/> no
Se sì, indicarne la localizzazione	
Se sì, la trombosi era assente precedentemente alla piastrinopenia?	<input type="checkbox"/> sì <input type="checkbox"/> no
Se sì, si tratta di una recidiva o di un nuovo episodio in altra sede?	<input type="checkbox"/> recidiva <input type="checkbox"/> nuovo episodio

Questionario sottoposto ai reparti dell'Ospedale S. Raffaele per la richiesta di anticorpi anti-PF4/eparina nel sospetto di piastrinopenia da eparina con e senza trombosi (HIT) (III)

Se sì, si è assistito ad un peggioramento della trombosi durante il trattamento eparinico?	<input type="checkbox"/> sì	<input type="checkbox"/> no
Se no, è stato eseguito un esame ecografico delle vene profonde degli arti inferiori?	<input type="checkbox"/> sì	<input type="checkbox"/> no
Sono presenti lesioni necrotiche cutanee?	<input type="checkbox"/> sì	<input type="checkbox"/> no
Sono presenti lesioni cutanee eritematose?	<input type="checkbox"/> sì	<input type="checkbox"/> no
Si è osservata una reazione acuta sistemica al bolo i.v. di eparina non frazionata?	<input type="checkbox"/> sì	<input type="checkbox"/> no
Esistono possibili cause alternative della piastrinopenia?	<input type="checkbox"/> sì	<input type="checkbox"/> no
Se sì, indicarle		

Punteggi assegnati (I)

Reparto di provenienza del paziente	TERAPIA INTENSIVA CARDIOCHIRURGICA	15
	ALTRE TERAPIE INTENSIVE	0
	CHIRURGIE	5
	MEDICINE	0
	NON DEFINITO	0
Sesso	MASCHIO	0
	FEMMINA	5
Postchirurgico	SI E PROVENIENTE DA MEDICINE/UTI	5
	Si MA PROVENIENTE DA CHIRURGIE	0
	SI MA PROVENIENTE DA TICCH	0
	NO	0
Piastrinopenia	nadir 20-100000 o discesa > 50%	10
	nadir 10-19000 o discesa tra 30 e 50%	5
	nadir < 10000 o discesa tra < 30%	0
	NON DEFINITO	0

Punteggi assegnati (II)

Tipo di eparina	UFH	0
	LMWH	0
Dosaggio	UFH profilattico	5
	ALTRI/NON DEFINITO	0
Precedente esposizione ad eparina	nei 30 giorni precedenti	5
	nei 30 giorni precedenti se pz. da TICCH	0
	tra 30 e 100 giorni	0
	Oltre 100 giorni	0
Timing della piastrinopenia in relazione al trattamento	tra 5 e 10 giorni	10
	<1 o 1 giorno se esposto ad eparina nei 3 mesi precedenti	10
	<1 o 1 giorno e non esposto ad eparina nei 3 mesi precedenti	-20
	tra 15 e 25 giorni se LMWH senza precedente esposizione	10
	> 10 giorni se UFH ma con caduta rapida delle piastrine	5
	NON DEFINITO	0

Punteggi assegnati (III)

Trombosi ed altre sequele	trombosi non in atto e CUS negativa	- 5
	trombosi non in atto e CUS non eseguita	0
	nuova trombosi	25
	recidiva di trombosi	15
	peggioramento di trombosi pre-esistente	15
	necrosi cutanea	25
	reazione acuta sistemica al bolo di eparina UFH	25
	presenza di lesioni cutanee eritematose	15
Altre cause di piastrinopenia	ASSENTI	10
	POSSIBILI	5
	CERTE	- 10
	NON DEFINITO	0
TEST	POSITIVO SOMMA DEI PUNTEGGI x 1.4	
	NEGATIVO SOMMA DEI PUNTEGGI x 0.1	

Come prevenire la HIT

- Una pubblicazione recente riporta l'utilizzo di eparina in circa il 45% dei pazienti ricoverati in ospedale.

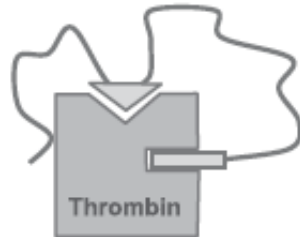
Come prevenire la HIT

- Una pubblicazione recente riporta l'utilizzo di eparina in circa il 45% dei pazienti ricoverati in ospedale:
- L'utilizzo di anticoagulanti **non-eparinici** e' l'unico mezzo reale per prevenire la HIT

Come prevenire la HIT

- Una pubblicazione recente riporta l'utilizzo di eparina in circa il 45% dei pazienti ricoverati in ospedale:
- L'utilizzo di anticoagulanti non-eparinici e' l'unico mezzo reale per prevenire la HIT
- Una serie di nuovi farmaci anticoagulanti e' in fase avanzata di studio e diverra' presto disponibile

Come curarla



Lepirudin
(6980 Da)
Renal



Bivalirudin
(2180 Da)
Enzymic > Renal



Argatroban
(527 Da)
Hepatic

Binding	irreversible	reversible	reversible
Effect on INR	+	++	++++
Immuno genicity	+++	??	-

HIT and thrombosis

- Non-heparin anticoagulants (lepirudin, argatroban, bivalirudin, danaparoid) have been studied for treatment of HIT-associated thrombosis, but they have not been directly compared in prospective studies.

HIT and thrombosis

- Non-heparin anticoagulants (lepirudin, argatroban, bivalirudin, danaparoid) have been studied for treatment of HIT-associated thrombosis, but they have not been directly compared in prospective studies.
- Despite treatment of HIT-associated thrombosis with one of these anticoagulants, there remains a 5-20% frequency of new thrombosis.

HIT and thrombosis

- In a recent analysis of retrospective and prospective studies, it was shown that 20 to 50% of patients with HIT and no apparent thrombosis will have a thrombotic complication within the next month, most frequently within 1 to 2 weeks after discontinuing the heparin therapy.

Profilassi secondaria della HIT

- Quindi anche in assenza di trombosi il paziente con HIT va anticoagulato per 2-3 mesi con (attualmente) anticoagulanti orali (una volta che le piastrine siano risalite)

Fondaparinux and HIT

- Lepirudin requires laboratory monitoring, may induce antibody formation with paradoxical effects and bleeding complications are not uncommonly observed.
- Experimental evidence had been provided for no cross-reactivity of fondaparinux with antibodies to heparin-PF4 complexes

Fondaparinux and HIT

- A prospective randomised trial showing non-inferiority of fondaparinux versus hirudin in the treatment of HIT type 2 is urgently needed.

**A randomised study
comparing Fondaparinux and
Lepirudin in the management
of heparin-induced
thrombocytopenia (HIT)**

FLHIT Study

FLHIT

- **Study Coordinators:** Franco Piovella, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italy & Armando D'Angelo, IRCCS H S. Raffaele, Milano, Italy.
- **Study Centres:** 11 Italian Heart Surgery Centres: 1) Pavia (**Coordinator Centre**), 2) Milano, 3) Varese, 4) Milano, 5) Piacenza, 6) Bologna, 7) Padova, 8) Firenze, 9) Milano, 10) Perugia.

FLHIT

- **Study Objectives.** To investigate efficacy and safety of fondaparinux treatment in subjects with heparin-induced thrombocytopenia with or without thromboembolic complications.
- **Methodology.** Hundred patients on UFH or LMWH treatment presenting with $<100,000$ platelets/ μl and/or a $\geq 50\%$ decrement in platelet counts (\pm associated thrombosis) and positivity for heparin/PF4 IgG antibodies will be randomised to treatment with s.c. fondaparinux or to i.v. lepirudin.
- Fondaparinux: single s.c. 7.5 mg daily dose for all patients (with or without thromboembolic complications). In patients with reduced creatinine clearance (between 30 and 50 ml/min) a lower fondaparinux dose will be administered (2.5 mg s.c. daily).

FLHIT

- Lepirudin: continuous iv infusion (0.1mg/Kg/hr starting dose, without bolus injection), aiming at aPTT ratio between 1.5 and 2.5 for all patients (with or without thromboembolic complications). In patients with reduced creatinine clearance (between 30 and 50 ml/min) a lower lepirudin starting dose will be administered (0.05 mg/Kg/hr).
- Switch to oral anticoagulant (warfarin) is strongly recommended and performed according to local practice. All patients will be treated with fondaparinux or lepirudin for at least 7 days, depending on the time required to reach the target INR (>2.0).

FLHIT

- **Criteria for evaluation:**
- **Primary:**
- Composite of the incidence of new clinically manifest thromboembolic complications, amputations, and death and the incidence of major bleeding (fatal or life-threatening, intracranial, retroperitoneal, occurring in a critical organ, requiring surgical intervention and overt bleeding requiring transfusion of 2 RBC units or more).
- **Secondary:**
- Clinically-relevant non major bleeding (i.e. epistaxis requiring interventions, spontaneous macroscopic haematuria).
- Time to reach an increase $\geq 50\%$ of the lowest value in platelet counts
- Time course of decrease in heparin/PF4 IgG antibodies.
- Duration of hospital stay.

FLHIT

- **Anti Heparin/PF4 Antibody Measurement**
- Blood samples will be taken in all eligible patients for local and centralized antibody testing.
- Local test will be performed according to the investigator's preference.
- Serial blood samples will be taken (at least every two weeks) up to the expected normalization.
- A blood sample will be also taken for centralized platelet serotonin-release assay to detect heparin-dependent immunoglobulin-induced platelet activation. This test will be performed as confirmation of the presence of HIT and will be available from one to three weeks from sampling.

FLHIT

Statistical methods:

Sample size:

- The sample size (number of pairs) has been calculated on the assumption of a combined incidence of efficacy and safety events of 60% in patients receiving Lepirudin and a decrease of the same combination to 30% in patients receiving Fondaparinux.
- A two group χ^2 test with a 0.050 two-sided significance level will have 80% power to detect the difference between a Group 1 proportion of 0.60 and a Group 2 proportion of 0.30 (odds ratio of 0.286) when the sample size in each group is 42.
- To allow for a 10% attrition, 50 patients per group will be enrolled, for a total of 100 patients.
- Given the uncertainty of the prevalence of events, a blinded redefinition of the sample size will be performed after 50% of the patients have completed the study.

FLHIT

- **Statistical analysis**
- ***Analysis of the primary endpoint:***
- **The combined incidence of efficacy and safety will be analyzed with a global test, relying on a GEE approach (with logit link). If significant at $\alpha=0.05$, each of the single endpoints will be evaluated at $\alpha=0.025$. The difference in incidence of the combined endpoints in the 2 treatment groups will also be computed together with its 95% confidence interval (95%CI).**
- ***Analysis of the secondary endpoints:***
- **The time to $\geq 50\%$ increase of the lowest value or greater than $100 \times 10^9 / l$ platelets count will be described according to the Kaplan Meier method and compared between groups with the logrank test.**

FLHIT

- **Statistical methods:**
- ***Analysis of the secondary endpoints:***
- **The time course of heparin/PF4 IgG antibodies will be compared between groups by a GEE linear model.**
- **Duration of hospital stay will be compared between groups by means of the Mann Whitney U test.**
- **Categorical variables will be described as counts and percent. Continuous variables will be described as mean and standard deviation, median and 25th-75th percentiles, minimum and maximum.**
- **In case of dropout, the last available data will be forwarded.**
- **All analyses will be based on the intention-to-treat principle. All randomized patients who have been administered one dose of either drugs will be included in the analysis set**