



## **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO**

SCUOLA DI DOTTORATO "SCIENZE BIOMEDICHE CLINICHE E SPERIMENTALI"

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA SALUTE

CORSO DI DOTTORATO IN ***METODOLOGIA CLINICA XXVI CICLO***

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

### **CARENZA CONGENITA DI ANTITROMBINA E DIAGNOSI DI LABORATORIO: QUALE TEST FUNZIONALE?**

Settore Scientifico Disciplinare MED/09

Dott.ssa ANNA ROSA CORNO

Nr. Matricola R09152

TUTOR

Dott.ssa ROSARIA REDAELLI

COORDINATORE DEL DOTTORATO

Chiar.mo Prof. MARCO CATTANEO

A.A. 2012-2013

<b>RIASSUNTO</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>4</b>
<b>INTRODUZIONE</b>	<b>5</b>
<b>BACKGROUND E SCOPO DELLO STUDIO</b>	<b>9</b>
<b>RISULTATI</b>	<b>15</b>
<b>DISCUSSIONE</b>	<b>23</b>
<b>TABELLE e FIGURE</b>	<b>28</b>
<b>RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI</b>	<b>43</b>

## RIASSUNTO

Introduzione - La carenza congenita di Antitrombina (AT), che espone a rischio trombotico di tipo prevalentemente venoso, viene classificata in tipo I (difetto quantitativo) o tipo II (difetto qualitativo). I difetti qualitativi possono interessare il sito reattivo (Reactive Site, RS) o il sito di legame dell'AT con l'eparina (Heparin Binding Site, HBS), oppure possono avere effetto pleiotropico (PE). I test di screening, che misurano la capacità dell'AT, presente nel plasma, di neutralizzare la trombina (attività anti-IIa) o il Fattore Xa (attività anti-Xa) in presenza di eparina, sono in grado di evidenziare la maggior parte dei difetti dell'AT; tuttavia, sono stati osservati risultati discrepanti (valore normale vs. valore patologico) con i due differenti metodi. Scopo della tesi è quello di valutare la concordanza tra un test AT anti-Xa e un test AT anti-IIa e di valutare la relativa capacità di individuare le carenze di AT.

Materiali e Metodi - La popolazione in studio è costituita dal gruppo "routine e trombofilici" (493 soggetti con prescrizione del test AT) e dal gruppo "carenti noti" (23 soggetti con carenza nota di AT e 18 familiari). I dosaggi dell'attività dell'AT sono stati effettuati con i metodi AT anti-Xa (HemosIL, Instrumentation Laboratory) e AT anti-IIa (*home-made*). Una popolazione di controllo (n= 100) è stata utilizzata per definire i relativi intervalli di riferimento. In 21 soggetti con carenza di AT è stata effettuata la ricerca di mutazioni nel gene SERPINC1 (Universitair Ziekenhuis di Bruxelles).

Risultati - I risultati di AT% ottenuti con i due metodi sono altamente correlati (rho di Spearman >0.70); tuttavia, sono stati riscontrati 8 dati discordanti (3 nel gruppo "routine e trombofilici", 5 nel gruppo "carenti noti"). L'analisi genetica ha identificato la presenza di mutazioni nel gene SERPINC1 in 18/21 soggetti studiati, 5 dei quali con valori di attività AT discordanti. Infatti, valori normali di AT anti-Xa si sono ottenuti per il difetto Cambridge II (II RS), mentre il test AT anti-IIa ha fornito valori normali per un difetto HBS. Valori di AT patologici concordi sono stati ottenuti per 5 carenze di tipo I, mentre si sono ottenuti risultati di AT normali con entrambi i metodi per altre 2 carenze HBS. Nella popolazione indagata la sensibilità del test AT anti-Xa è 61.1%, quella del test AT anti-IIa è 55.6%. Se si considerano entrambi i test la sensibilità diventa 72.2%. Se si utilizza in aggiunta anche il rapporto tra l'attività AT anti-IIa e l'attività anti-Xa, la sensibilità aumenta a 88.9%.

Conclusioni - I metodi funzionali attualmente a disposizione per il dosaggio dell'AT non sono in grado di individuare tutti i tipi di difetti molecolari dell'AT. L'utilizzo combinato di un test anti-Xa e di un test anti-IIa e del rapporto AT anti-IIa/AT anti-Xa potrebbe aumentare la capacità diagnostica dei dosaggi. I risultati dei test di laboratorio vanno comunque considerati alla luce della storia clinica personale e familiare del soggetto.

## **ABSTRACT**

Introduction – Antithrombin (AT) deficiency, associated with an increased risk for venous thrombosis, is classified into type I (quantitative defect) and type II (qualitative defect). Qualitative defects may affect the reactive site (RS), the heparin binding site (HBS) of AT, or they may have a pleiotropic effect (PE). Screening tests, which measure the ability of AT, in the presence of heparin, to inhibit either thrombin (anti-IIa activity) or FXa (anti-Xa activity), are able to detect most AT deficiencies; however, few cases of discrepancies have been described (i.e. normal vs. pathological value) with the two different methods. Aim of the study was the evaluation of agreement between an anti-Xa assay and an anti-IIa assay for AT, and the evaluation of their ability in detecting AT defects.

Materials and Methods – The study population consisted of the “routine and thrombophilic” group (493 patients for which AT test was required) and the “historical deficiencies” group (23 subjects with known AT deficiency and 18 relatives). Anti-Xa HemosIL Antithrombin kit (from Instrumentation Laboratory) and a home-made anti-IIa method were used to measure AT activities. A control group (n= 100) was used to determine AT reference ranges. SERPINC1 gene analysis was carried out for 21 patients (Universitair Ziekenhuis in Bruxelles).

Results – The results provided by the two methods showed a high correlation (Spearman  $\rho > 0.70$ ); however, 8 discrepant results were observed (3 in the “routine and thrombophilia” group and 5 in the “historical deficiencies” group). Gene analysis confirmed the presence of a molecular defect in 18/21 subjects, 5 of which had also discrepant AT results. In fact, normal anti-Xa AT values were obtained for Cambridge II defect (RS), whereas anti-IIa test provided normal values for a HBS defect. Both methods provided pathological AT values for 5 type I deficiencies but normal AT values for other 2 HBS defects. In the study population AT anti-Xa and AT anti-IIa sensitivity was 61.1% and 55.6%, respectively; when both tests were used, sensitivity increased to 72.2%. When the ratio between AT anti-IIa and AT anti-Xa was added, sensitivity increased to 88.9%.

Conclusions – Currently available screening tests are not able to detect all molecular defects. However, when anti-Xa assay is carried out together with anti-IIa method, and the ratio between the results provided by both is considered, the diagnostic power is increased. Anyway, laboratory test results should be considered together with personal and familiar clinical history of the single subject under evaluation.

## INTRODUZIONE

### *L'Antitrombina*

L'Antitrombina (AT), glicoproteina plasmatica a singola catena (PM 58 kDa) sintetizzata dal fegato, appartiene alla famiglia degli inibitori delle proteasi seriniche (serpine) ed è il principale regolatore fisiologico della coagulazione: l'AT, infatti, inibisce la trombina (FIIa) e il FXa e, in misura minore, i fattori IXa, XIa e XIIa, la callicreina, la plasmina e il FVIIa [1,2]. L'AT, inoltre, possiede proprietà anti-infiammatorie e anti-angiogeniche indipendenti dall'attività anticoagulante serpinica [3].

La molecola dell'AT è costituita da 464 aminoacidi (432 aminoacidi rappresentano la molecola matura, 32 costituiscono il peptide segnale), 6 dei quali sono Cisteine che danno origine a 3 ponti disolfuro; sono inoltre presenti 4 siti di glicosilazione [2]. L'AT, che ha una struttura terziaria globulare costituita da tre foglietti  $\beta$  e da nove eliche  $\alpha$ , presenta due siti funzionali:

- un sito funzionale reattivo (*reactive site*, RS) con il "reactive centre loop" (RCL), contenente il legame scissile P1-P1' (dipeptide Arg393-Ser394, secondo la numerazione tradizionale [4]), localizzato vicino alla regione C-terminale;
- un sito, che include la regione N-terminale e l'elica D, in grado di legare una specifica sequenza pentasaccaridica contenuta nei glicosamminoglicani presenti sulla superficie dell'endotelio e nell'eparina (*heparin binding site*, HBS) [2,5,6].

L'attività inibitoria dell'AT allo stato nativo è piuttosto lenta, a causa della inaccessibilità del legame P1-P1', ma viene accelerata 500-1000 volte in presenza di eparina o eparan solfato, che, legandosi ai residui di Arginina e Lisina dell'elica D, determina un cambio conformazionale nella molecola dell'AT con esposizione del RCL [5]. Per accelerare l'inibizione del FXa è sufficiente la presenza di uno specifico pentasaccaride, mentre per l'inibizione della trombina è necessaria la presenza di almeno 18 unità saccaridiche, contenenti il pentasaccaride, che, legandosi sia alla trombina sia all'AT, determinano la formazione di un complesso trimolecolare [5].

L'interazione tra il sito attivo della serin proteasi e il RCL dell'AT determina la formazione di un complesso 1:1 stabile: la proteasi, infatti, scinde il legame P1-P1' in RCL, rimanendo covalentemente legata al residuo P1 dell'inibitore (meccanismo di suicidio del substrato) [5,6]. Il RCL dell'AT diventa mobile e viene incorporato nel foglietto  $\beta$  centrale, determinando un cambio conformazionale sia nell'AT che nella proteasi con

conseguente inattivazione del sito attivo della proteasi [2,6]. Il complesso proteasi-inibitore viene successivamente rimosso dal circolo dal sistema reticolo-endoteliale.

#### *La carenza congenita di AT*

Il gene SERPINC1 che codifica per l'AT è localizzato sul cromosoma 1 (1q23-25.1) [7] (GenBank X68793.1, MIM 107300) ed è costituito da 7 esoni e 6 introni. Il RS dell'AT è codificato dall'esone 7, l'HBS è codificato dall'esone 2.

La carenza congenita di AT (MIM 613118) si associa a un rischio aumentato da 5 a 50 volte di sviluppare eventi trombotici [2,8], rappresentati principalmente da trombosi venosa profonda (TVP) degli arti inferiori e/o embolia polmonare (EP), spesso con carattere di ricorrenza [9]. Sono stati anche descritti casi di trombosi in siti non usuali, come la TVP degli arti superiori, delle vene mesenteriche, della vena cava inferiore e delle vene renali, retiniche e cerebrali [2,9]. In letteratura sono anche riportati eventi trombotici arteriosi [2,9].

Il rischio trombotico aumenta con l'età: entro 50 anni circa il 50% degli individui con carenza di AT manifesta un episodio di trombosi [10,11]. La gravidanza espone le donne con difetto congenito ad un rischio molto elevato di eventi [11].

Recenti studi hanno anche mostrato che il rischio tromboembolico venoso aumenta progressivamente con la diminuzione del livello di AT [12,13] e che in corrispondenza di livelli borderline di AT (tra 76 e 85 IU/dL) tale rischio risulterebbe raddoppiato [12]. Inoltre, livelli borderline (<80% e >70%) sarebbero associati ad un rischio di ricorrenza di eventi tromboembolici venosi simile a quello dei pazienti con carenza di AT (<70%) e significativamente superiore al rischio per i soggetti normali [14].

La carenza congenita di AT, che viene trasmessa come carattere autosomico dominante, è classificata in tipo I e tipo II [15]:

- carenza di tipo I: è caratterizzata da ridotti livelli di AT (difetto quantitativo), che raggiungono approssimativamente il 50% della norma. Questa carenza è presente quasi esclusivamente allo stato eterozigote, essendo lo stato omozigote incompatibile con la vita. La maggior parte delle mutazioni riportate (delezioni/inserzioni parziali/totali del gene SERPINC1) determina la sintesi di un prodotto di trascrizione instabile o di proteine tronche [9];
- carenza di tipo II: è caratterizzata da livelli normali o quasi normali di AT con ridotta funzionalità (difetto qualitativo); è causata da difetti molecolari discreti, normalmente sostituzioni di singole basi (mutazioni *missense*), che possono

interessare il sito reattivo (tipo II RS), il sito di legame con l'eparina (tipo II HBS), o possono avere un effetto multiplo o pleiotropico (tipo II PE) [9].

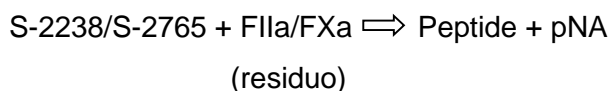
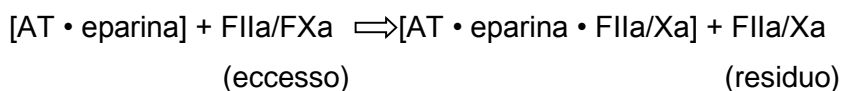
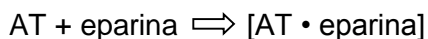
Ad oggi sono state descritte oltre 300 mutazioni, catalogate nel database HGMD (Human Gene Mutation Data) [16] e in "Antithrombin Mutation Database" [17].

La prevalenza della carenza congenita di AT nella popolazione generale è stata stimata da 1:500 a 1:5.000 [18,19], mentre in soggetti con storia di tromboembolismo venoso la prevalenza è stata stimata tra 1:20 e 1:200 [9,10]. Nella popolazione generale è prevalente la carenza di tipo II, mentre nei soggetti con trombosi la carenza di tipo I è riscontrabile nell'80% dei casi [10,11]. La carenza di tipo II HBS è stata associata ad un rischio tromboembolico inferiore [20,21].

#### *La diagnosi di laboratorio della carenza di AT*

La diagnosi di laboratorio della carenza congenita di AT viene effettuata mediante test funzionali [22] allo scopo di identificare sia i difetti quantitativi sia quelli qualitativi della molecola dell'AT. I test di screening disponibili sono basati sulla metodica amidolitica (test cromogenici) e misurano la capacità dell'antitrombina, in presenza di eparina (attività di cofattore eparinico), di neutralizzare la trombina (attività anti-IIa) o il FXa (attività anti-Xa).

Il plasma diluito del paziente viene incubato in un eccesso di trombina (/FXa) in presenza di eparina. Nella prima fase della reazione, accelerata dall'eparina, l'AT neutralizza la trombina (/FXa). La trombina (/FXa) residua agisce sul substrato specifico (S-2238/S-2765) liberando paranitroanilina (pNA).



La quantità di pNA, inversamente proporzionale alla quantità di AT presente nel plasma, viene misurata cineticamente e rilevata spettrofotometricamente a 405 nm. L'impiego di una curva di calibrazione permette di calcolare l'attività % dell'AT a partire dalla variazione di assorbanza che accompagna la reazione enzimatica.

Il test di screening che misura l'attività anti-Xa dell'AT permetterebbe una migliore discriminazione tra portatori e non-portatori della carenza di AT [23] perché non viene influenzato dalla presenza dell'Heparin Cofactor II (HCII), che è un inibitore naturale della trombina. L'utilizzo, nella determinazione dell'attività anti-IIa dell'AT, della trombina bovina, anziché di quella umana, e di inibitori delle proteasi, come l'aprotinina, permette di aumentare la specificità dei test amidolitici [2].

La carenza di AT, una volta confermata, viene classificata in tipo I o tipo II, mediante la misurazione della quantità totale di proteina (antigene) [9,24]. La determinazione dell'attività progressiva dell'AT, in assenza di eparina, mediante l'impiego di tempi di incubazione prolungati [25], permette di identificare i difetti che coinvolgono l'HBS dell'AT e quindi di valutare la capacità dell'AT di legare l'eparina.

## BACKGROUND E SCOPO DELLO STUDIO

Presso il Laboratorio di Emostasi dell'A.O. Niguarda Ca' Granda era stato osservato un valore normale (92%) di AT anti-Xa per un soggetto per il quale era stato ottenuto, con il metodo anti-IIa in uso c/o il Laboratorio Centrale dell'Ospedale, un valore patologico (55%) di AT.

In letteratura erano presenti poche segnalazioni di dati discordanti tra i due metodi di dosaggio dell'attività dell'AT: Perry nel 1991 [26] dimostrò per la variante Cambridge II dell'AT (Ala384Ser) una normale attività anti-Xa e una ridotta attività anti-IIa, entrambe in presenza di eparina, con normali livelli antigenici e normale attività progressiva; Ungerstedt nel 2002 [27] riportò valori analoghi per la variante AT Stockholm (Gly392Asp), e ipotizzò il rischio di non identificare tutti i casi di carenza di tipo II con i metodi basati sul FXa. Tuttavia, a fronte del numero esiguo di casi discrepanti segnalati in letteratura, si riteneva che fosse necessario eseguire entrambi i test funzionali solo in rari casi [28].

Poiché l'osservazione iniziale veniva confermata nel nostro Laboratorio anche su un prelievo successivo della paziente, si è deciso di attivare un protocollo di studio (approvato dal Comitato Etico dell'Ospedale Niguarda) per:

- valutare la concordanza tra il metodo AT anti-Xa e il metodo AT anti-IIa;
- correlare l'espressione fenotipica alla alterazione molecolare;
- valutare la capacità diagnostica dei due test.

A questo scopo i test AT anti-Xa e AT anti-IIa sono stati utilizzati per:

- l'analisi routinaria di plasmi da pazienti con prescrizione del dosaggio dell'attività dell'AT e da pazienti studiati per il rischio trombofilico (gruppo "routine e trombofilici");
- l'analisi di plasmi da pazienti con difetto noto di AT (individuati dal Laboratorio Emostasi negli anni precedenti o messi a disposizione dall'Universitair Ziekenhuis di Bruxelles, Dr. Kristine Jochmans) (gruppo "carenti noti").

Un gruppo di soggetti di controllo è stato utilizzato per la definizione degli intervalli di riferimento delle varie misure dell'AT (AT anti-Xa, AT anti-IIa, AT progressiva e AT antigene, ratio AT anti-IIa/AT anti-Xa).

Per un gruppo di soggetti, è stata effettuata la ricerca delle mutazioni nel gene SERPINC1.

## **MATERIALI E METODI**

### ***Popolazione studiata***

La popolazione oggetto di studio è costituita dal gruppo “routine e trombofilici” e dal gruppo “carenti noti”:

- gruppo “routine e trombofilici”: 493 soggetti (di cui 121 sottoposti allo studio trombofilico) afferiti al Laboratorio di Emostasi e Trombosi nel periodo gennaio 2010 - dicembre 2012;
- gruppo “carenti noti” (tabella 1):
  - 18 pazienti (studiati con 14 familiari negli anni precedenti presso il Laboratorio di Emostasi e Trombosi), appartenenti a famiglie non correlate (1-18), a cui si sono aggiunti altri 4 familiari, per un totale di 36 soggetti;
  - 5 soggetti, appartenenti a famiglie non correlate (19-23), con difetto di AT e caratterizzazione molecolare, ottenuti dal laboratorio dell'Universitair Ziekenhuis di Bruxelles.

La storia clinica delle famiglie studiate è raccolta nella tabella 1. In 21/45 (46.7%) soggetti per i quali erano disponibili le informazioni cliniche, l'anamnesi è negativa per eventi tromboembolici. In 24/45 (53.3%) soggetti il primo evento tromboembolico (range di età: 5-69 anni, mediana= 34 anni) è rappresentato da: TVP (33.3%), EP (20.8%), TVP seguita da EP (20.8%), infarto miocardico acuto (12.5%), attacco ischemico transitorio (12.5%). In 6/24 casi (25.0%) gli eventi trombotici si sono verificati senza causa apparente. Le ricorrenze si sono verificate nel 61.5% dei soggetti di cui erano disponibili le notizie cliniche.

### ***Popolazione di riferimento***

100 soggetti (53 maschi, 47 femmine; range età: 23-69 anni) con storia negativa per eventi trombotici, in assenza di segni obiettivi di patologie e non in trattamento farmacologico [29] sono stati selezionati per la determinazione degli intervalli di riferimento (IR) delle misure dell'AT (anti-Xa e anti-IIa).

Un campione di plasma da un sottogruppo di soggetti normali è stato utilizzato anche per la determinazione dell'IR dell'attività progressiva dell'AT (n= 55) e della proteina totale (antigene, n= 50).

### **Campioni**

I campioni di sangue per i test funzionali e immunologici sono stati ottenuti da sangue raccolto in Vacutainer (Becton Dickinson Vacutainer Systems - BD, Franklin Lakes, USA), contenente sodio citrato 0.109 M (1/10 v/v), utilizzando aghi 21 G. Il plasma è stato ottenuto mediante centrifugazione a 2000 x g per 30 min a temperatura ambiente.

I campioni sono stati conservati a -80°C fino al loro utilizzo.

I campioni di sangue da avviare all'indagine genetica sono stati raccolti in provette contenenti EDTA (BD), sono stati immediatamente congelati e conservati a -80°C fino al loro utilizzo.

### **METODI**

Per tutti i soggetti della popolazione in studio (figura 1) il dosaggio dell'attività dell'AT è stato effettuato con entrambi i metodi funzionali AT anti-Xa e AT anti-IIa.

I risultati sono stati considerati discrepanti in caso di valore di attività anti-Xa dell'AT all'interno del relativo IR vs. un valore di attività anti-IIa dell'AT al di sotto del limite inferiore del relativo IR o *vice versa*. I casi con risultati AT anti-Xa e anti-IIa discrepanti sono stati sottoposti a verifica mediante la ripetizione di entrambi i test o sullo stesso campione o su un campione ottenuto da un prelievo successivo.

Nei soggetti con carenza funzionale dell'AT con uno o con entrambi i metodi, il difetto è stato caratterizzato mediante la determinazione anche dell'attività progressiva anti-IIa dell'AT e della quantità totale di proteina (antigene).

La caratterizzazione genotipica è stata effettuata mediante la ricerca di mutazioni nel gene SERPINC1.

#### **Attività anti-Xa dell'AT**

L'attività anti-Xa dell'AT è stata misurata con il kit HemosIL Antithrombin (Instrumentation Laboratory, IL – Milano, Italia), su coagulometro automatico ACL TOP 500 (IL). Il tempo di inattivazione del FXa da parte dell'AT contenuta nel plasma in esame è di 110-140 secondi.

#### **Attività anti-IIa dell'AT**

L'attività anti-IIa dell'AT è stata misurata mediante un metodo semiautomatico *home-made* [30] implementato e adattato sul coagulometro ACL 7000 (IL), utilizzando trombina bovina (Hyphen BioMed, Neu-ville-sur-Oise, France) alla concentrazione di 14 NIH-U/mL e il substrato cromogenico S-2238 0.75 mM, in presenza di polibrene 0.33 g/L. I

campioni sono stati diluiti 1/60 in tampone tris 0.05 M, EDTA 0.0075 M, NaCl 0.175 mM, pH 8.4, contenente eparina 3 IU/mL. Il tempo di inattivazione della trombina da parte dell'AT contenuta nel plasma in esame è di 77 secondi.

### ***Attività progressiva dell'AT***

L'attività progressiva dell'AT è stata misurata mediante un metodo semiautomatico *home-made* in accordo a quanto indicato in "Disorders of thrombin formation" [31], implementato e adattato su ACL 7000. I campioni sono stati diluiti 1/20 in tampone tris/HCl 0.05 M contenente polibrene 0.05 g/L, EDTA 0.0075 M e NaCl 0.31 M. La trombina bovina (Hyphen BioMed) è stata usata alla concentrazione di 7 NIH-U/mL. Il tempo di inattivazione della trombina da parte dell'AT contenuta nel plasma in esame è stato impostato a 360 secondi.

### ***Rapporto AT anti-IIa/AT anti-Xa***

Per ogni campione è stato calcolato il rapporto tra il risultato in % ottenuto per il test AT anti-IIa e il risultato in % ottenuto per il test AT anti-Xa. I dati ottenuti per la popolazione di riferimento sono stati utilizzati per determinare l'IR di questo parametro.

### ***Dosaggio della proteina totale (antigene)***

La quantità totale di proteina è stata misurata mediante Rocket immunoelettroforesi [32], utilizzando agar ME 1% (Seakem; FMC BioProducts, Rockland, Md) e anti-Human Antithrombin 0.5% (Dako, Glostrup, Danimarca) in tampone tris-tricina pH 8.4 [33]. Come plasma di riferimento è stato utilizzato un pool di plasmi da soggetti normali ( $n \geq 12$ ), a cui è stato assegnato il titolo arbitrario di 100%.

### ***Elettroforesi bidimensionale***

L'elettroforesi bidimensionale è stata eseguita utilizzando agar ME 1% (Seakem) in tampone tris-tricina pH 8.4; nella prima dimensione l'elettroforesi è stata effettuata in assenza e in presenza di eparina (16 U/mL), nella seconda dimensione è stato impiegato l'anticorpo policlonale anti-Human Antithrombin 0.5% (Dako) [34].

### ***Riferibilità delle misure***

I dosaggi funzionali dell'AT sono stati eseguiti utilizzando come plasma di riferimento il Plasma Calibrante HemosIL (IL), il cui titolo di attività AT (%) è riconducibile allo

Standard Internazionale fornito dal National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC, Potters Bar, Hertfordshire, UK).

Il Plasma Calibrante IL e il Terzo Standard Internazionale NIBSC (08/258) sono stati utilizzati anche nel dosaggio antigenico dell'AT per verificare l'accuratezza del titolo assegnato al pool di plasmi normali utilizzato per la curva di calibrazione.

### ***Valutazione dell'imprecisione e dell'inaccuratezza delle misure analitiche***

La verifica dell'imprecisione dei metodi funzionali è stata effettuata mediante l'applicazione del Controllo di Qualità Interno (CQI) con l'utilizzo di plasmi a due livelli di attività AT (Normal Control Plasma e Low Abnormal Control Plasma della IL). L'imprecisione del dosaggio immunologico è stata valutata mediante l'analisi contestuale di un pool di plasmi normali.

La verifica dell'inaccuratezza è stata effettuata mediante la partecipazione a programmi di Valutazione Esterna della Qualità (VEQ) forniti da UK-NEQAS e mediante l'analisi del Terzo Standard Internazionale NIBSC.

### ***Analisi genetica del gene SERPINC1***

L'analisi genetica è stata eseguita, per le carenze di AT individuate, presso l'Universitair Ziekenhuis di Bruxelles (Dr. Christine Jochmans, Dr. Christelle Orlando).

Il gene SERPINC1, analizzato su DNA estratto da campione di sangue periferico, è stato sottoposto ad amplificazione e sequenziamento dei 7 esoni e delle regioni fiancheggianti del gene dell'AT [35]. Nei familiari è stata ricercata solo l'alterazione individuata nei probandi.

Nei casi in cui non è stata rilevata la presenza di mutazioni nel gene dell'AT, è stata applicata la metodica MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), che permette la valutazione di eventuali delezioni/inserzioni esoniche all'interno del gene analizzato, utilizzando il kit SALSA MLPA P227 Serpin C1 (MRC-Holland, Amsterdam, Olanda).

La numerazione delle mutazioni del DNA si basa sulla sequenza di riferimento NM\_000488.2, in cui l'Adenina del codone iniziale di traduzione (= codone 1, precedentemente codone -32) è in posizione +1 del cDNA.

La numerazione degli aminoacidi è in accordo alle Linee Guida HGVS, *Human Genome Variation Society* (l'aminoacido +1 è la Metionina codificata dalla tripletta ATG).

## **ANALISI STATISTICA**

L'analisi statistica descrittiva, il test di Shapiro-Wilk per la verifica della distribuzione dei dati, e la determinazione del coefficiente di correlazione di Spearman ( $\rho$ ) sono stati effettuati utilizzando StatsDirect Statistical Software versione 2.8.0 (StatsDirect Ltd, Cheshire, UK).

Gli IR delle diverse misure dell'AT (AT anti-IIa, AT anti-Xa, AT progressiva e AT antigene) e del rapporto AT anti-IIa/AT anti-Xa nella popolazione di riferimento sono stati determinati mediante metodo non parametrico utilizzando il programma "Reference Value Advisor" [36].

La comparazione tra i metodi AT anti-IIa e il metodo AT anti-Xa è stata valutata mediante le regressioni di Deming e di Passing e Bablok, eseguite con MedCalc 12.7 (MedCalc Software, Ostende, Belgio), che ha fornito anche i risultati del test CUSUM per la linearità. La concordanza tra i due test di dosaggio dell'AT è stata valutata mediante il coefficiente  $k$  di Cohen ed è stata considerata scarsa per valori di  $k < 0.20$ , discreta tra 0.21 e 0.40, moderata tra 0.41 e 0.60, buona, tra 0.61 e 0.80, eccellente tra 0.81 e 1.00. Sensibilità, Specificità, Valore Predittivo Positivo, Valore Predittivo Negativo, e l'estensione dell'area sottesa alla curva ROC (AUC, *Area Under Curve*) sono stati calcolati mediante Stata/SE 13.1 (Stata Corp., College Station, Texas, USA).

## RISULTATI

### ***Intervalli di Riferimento***

Gli intervalli di riferimento (IR), definiti mediante metodo non parametrico, per tutti i parametri dell'AT, utilizzando i valori ottenuti per la popolazione di riferimento, sono i seguenti: AT anti-Xa: 84-129%; AT anti-IIa: 84-126%; AT antigene: 80-139%; AT progressiva: 79-128%; rapporto AT anti-IIa/AT anti-Xa: 0.85-1.10.

### **PERFORMANCE DEL METODO AT ANTI-IIA VS. IL METODO AT ANTI-XA**

#### *Statistica descrittiva*

Le misure dell'attività dell'AT (AT anti-Xa, AT anti-IIa) e i valori del rapporto AT anti-IIa/AT anti-Xa ottenuti per la popolazione di riferimento e per i gruppi "routine e trombofilici" e "carenti noti" sono riportati nella tabella 2. I *box and whisker plot* relativi alle attività anti-Xa e anti-IIa dell'AT e al rapporto AT anti-IIa/AT anti-Xa nella popolazione di riferimento e nei due gruppi di soggetti indagati sono illustrati rispettivamente nelle figure 2 e 3.

I dati relativi a 3 soggetti del gruppo "carenti noti" (genitori del probando della famiglia 5 e fratello della probanda della famiglia 6), risultati fenotipicamente e/o genotipicamente normali, sono stati esclusi dalle elaborazioni. Il gruppo "carenti noti" è pertanto costituito da 38 soggetti.

#### *Imprecisione e inaccuratezza*

L'imprecisione nel test AT anti-Xa è risultata del 2.9% per il controllo normale e del 13.3% per il controllo patologico. L'imprecisione nel test AT anti-IIa è risultata del 4.7% per il controllo normale e di 8.1% per il controllo patologico. Nel test immunologico l'imprecisione massima riscontrata per un pool di plasmi normali è stata del 7.4%.

Per quanto riguarda l'inaccuratezza, la differenza % rispetto al valore di consenso dei materiali UK NEQAS è risultata compresa tra -2.2% e 10.2% (mediana 2.2%) per il metodo AT anti-Xa e tra -1.1% e 11.4% (mediana 6.9%) per il metodo AT anti-IIa; la differenza % rispetto al valore atteso dello standard NIBSC 08/258 è stata di -1.1% per il test AT anti-Xa e di 4.2% per il test AT anti-IIa. L'inaccuratezza del test antigenico rispetto allo standard NIBSC è risultata compresa tra 1.0% e 9.4% (mediana 4.9%).

### *Correlazione e regressione*

Il coefficiente di correlazione di Spearman ( $\rho$ ) è risultato 0.737 ( $p < 0.001$ ) nella popolazione di riferimento, 0.873 ( $p < 0.001$ ) nel gruppo "routine e trombofilici" e 0.841 ( $p < 0.001$ ) nel gruppo "carenti noti".

Nella popolazione di riferimento, la retta di regressione di Deming ha equazione  $y = 2.268 + 0.942 x$  [IC95% intercetta = (-9.639, 14.175); IC95% pendenza = (0.831, 1.052)] (figura 4a); la retta di regressione di Passing e Bablok ha equazione  $y = 1.583 + 0.944 x$  [IC95% intercetta = (-11.219, 15.364); IC95% pendenza = (0.818, 1.063)] (figura 4b); il test CUSUM per la linearità dimostra che non c'è una significativa deviazione dalla linearità ( $P = 0.85$ ).

Nel gruppo "routine e trombofilici", la regressione lineare di Deming ha fornito l'equazione  $y = 3.961 + 0.952 x$  [IC95% intercetta = (-0.073, 7.996); IC95% pendenza = (0.913, 0.991)] (figura 5a); la regressione di Passing e Bablok ha dato l'equazione  $y = 2.676 + 0.971 x$  [IC95% intercetta = 0.000, 6.929); IC95% pendenza = (0.929, 1.000)] (figura 5b); inoltre non è riscontrabile una significativa deviazione dalla linearità (test CUSUM per la linearità,  $P = 0.38$ ).

Nel gruppo "carenti noti", la regressione lineare di Deming ha prodotto l'equazione  $y = 22.090 + 0.821 x$  [IC95% intercetta = (5.554, 38.625); IC95% pendenza = (0.531, 1.111)] (figura 6a); la regressione di Passing e Bablok ha fornito l'equazione  $y = 21.793 + 0.829 x$  [IC95% intercetta = (12.500, 33.333); IC95% pendenza = (0.667, 1.000)] (figura 6b); anche in questo caso non è riscontrabile una significativa deviazione dalla linearità (test CUSUM per la linearità,  $P = 0.50$ ).

## **ANALISI DELLA CONCORDANZA**

### Gruppo "routine e trombofilici"

I metodi anti-Xa e anti-IIa hanno fornito valori % di attività AT concordemente all'interno dei rispettivi IR in 460/493 (93.3%) casi (tabella 4).

I metodi anti-Xa e anti-IIa hanno fornito valori % di attività AT concordemente al di sotto dei rispettivi IR in 30/493 (6.1%) casi (tabella 4). In 22/30 (73.3%) soggetti la diminuzione dell'AT era acquisita: in 14/22 soggetti (63.6%) era attribuibile a epatopatia; in 8/22 (36.4%) alla complicata condizione clinica in atto (2 soggetti con recente ictus ischemico, un paziente ricoverato per shock emorragico, 5 pazienti con neoplasie ematologiche, di cui uno in regime di ricovero per VOD - Venous-Occlusive-Disease).

Le discrepanze confermate tra i metodi AT anti-Xa e AT anti-IIa sono state 3/493 (0.6%) e sono relative ai soggetti (tabella 5): #1 con storia negativa per eventi tromboembolici, reclutato per la definizione degli IR dei parametri dell'AT; #2, indagato per un ictus ischemico in forame ovale pervio; #3, donna gravida in trattamento con seleparina per una TVP alla 9<sup>a</sup> settimana di gestazione all'età di 43 anni.

#### Gruppo "carenti noti"

I metodi anti-Xa e anti-IIa hanno fornito valori % di attività AT concordemente al di sotto dei rispettivi IR in 26/38 casi (68.4%) e valori concordemente all'interno dei rispettivi IR in 7/38 casi (18.4%) (tabella 6).

Sono stati riscontrati 5/38 (13.2%) casi di valori di attività AT discrepanti in relazione agli IR stabiliti per i test AT anti-Xa e AT anti-IIa. Le discrepanze sono state osservate per i seguenti soggetti (tabella 6):

- probanda della famiglia 4: valore di AT anti-Xa "normale" vs. valore di AT anti-IIa ridotto;
- probanda, madre e figlia 3 della famiglia 7: valori di AT anti-Xa ridotti vs. valori di AT anti-IIa nella norma;
- probando della famiglia 8; valore di AT anti-Xa ridotto vs. valore di AT anti-IIa all'interno del relativo IR.

Complessivamente, i metodi AT anti-Xa e AT anti-IIa hanno fornito risultati concordi in relazione al rispettivo IR in 490/493 casi (99.4%) nel gruppo "routine e trombofilici" e in 33/38 casi (86.8%) nel gruppo "carenti noti" (tabella 7). L'indice K di Cohen è 0.949 (IC 95%= 0.892, 1.000) nel gruppo "routine e trombofilici" e 0.652 (IC 95%= 0.377, 0.927) nel gruppo "carenti noti".

#### **CORRELAZIONE FENOTIPO-GENOTIPO**

I carenti noti appartenenti alle famiglie 1-7 e 19-23 sono stati studiati a livello molecolare per la ricerca delle mutazioni del gene SERPINC1. L'analisi genetica è stata effettuata anche per il soggetto #1 del gruppo "routine e trombofilici" (tabella 8).

**Famiglia 1.** La probanda è risultata portatrice eterozigote di una delezione *in-frame* di 3 paia di basi (c.1033\_1035delGAG) nell'esone 5 che porta alla perdita di un acido glutammico (p.Glu313del). Tale difetto era già descritto da Cowdhury [37] e depone per una carenza di tipo I già espressa a livello fenotipico dalla consensuale riduzione delle

attività (anti-IIa, anti-Xa e progressiva) e dell'antigene dell'AT. La paziente ha sperimentato una EP a 30 anni durante la gravidanza e una TVP a 51 anni. Anche la storia familiare è positiva per tromboembolismo venoso.

**Famiglia 2.** La probanda è risultata portatrice eterozigote di una delezione *in-frame* di 3 paia di basi (c.462\_464delTTC) nell'esone 3 del gene SERPINC1. Questa mutazione porta alla perdita di una fenilalanina a livello del codone 155 (p.Phe155del), che può determinare una anomala secrezione o un anomalo "folding" della proteina. La mutazione riscontrata conferma la carenza di tipo I determinata fenotipicamente. Tale difetto non è stato ancora descritto in letteratura.

La probanda ha sperimentato una TVP a un arto inferiore durante il puerperio dopo la prima gravidanza all'età di 32 anni e un aborto durante la seconda gravidanza pur essendo in trattamento con eparina a basso peso molecolare (EBPM). La paziente è risultata negativa per la mutazione FV Leiden e per la mutazione G20210A del gene della protrombina. Il fratello della paziente, che aveva avuto embolia polmonare, è in trattamento con anticoagulanti orali.

**Famiglia 3.** Il probando è risultato portatore eterozigote di una mutazione puntiforme con transizione da Citosina a Timina (c.490C>T) nell'esone 3; questa alterazione, localizzata nel codone 164, determina la sostituzione dell'aminoacido Arginina con un codone di stop (p.Arg164\*). Il difetto molecolare, confermato anche nella madre, determina la prematura interruzione della sintesi dell'AT e depone per una carenza di tipo I, già diagnosticata dai test di laboratorio. Il probando ha avuto TVP poplitea destra seguita da EP a 27 anni, con ricorrenza a 31 anni dopo la sospensione della terapia anticoagulante orale (TAO); la madre ha avuto una TVP poplitea bilaterale a 69 anni. Entrambi sono attualmente in TAO.

**Famiglia 4.** Il sequenziamento di tutti gli esoni e delle zone di giunzione tra esoni ed introni del gene dell'AT ha evidenziato la presenza della mutazione Cambridge II (c.1246G>T, esone 7) allo stato omozigote. Questa alterazione porta alla sostituzione dell'Alanina con la Serina a livello dell'aminoacido 416 (p.Ala416Ser).

La ricerca delle alterazioni è stata effettuata nei genitori, anch'essi asintomatici, che sono risultati entrambi portatori eterozigoti della mutazione Cambridge II.

Il difetto molecolare dell'AT non viene identificato mediante il test AT anti-Xa, che fornisce per la probanda e per entrambi i genitori, valori all'interno dell'IR. Il test AT anti-

lla è in grado di rivelare la presenza dell'alterazione molecolare solo se allo stato omozigote (probanda).

**Famiglia 5.** Il sequenziamento del gene SERPINC1 ha evidenziato la presenza, allo stato eterozigote, della sostituzione di una Guanina con una Adenina (c.762+1G>A) della prima base dell'introne 4. Questa mutazione interferisce col sito di donatore di *splicing* dell'introne 4. Il suo riscontro conferma la carenza di tipo I, evidenziata dai risultati di laboratorio (test funzionali e dosaggio dell'antigene). Questa mutazione non è stata ancora descritta in letteratura e non è stata trovata nei genitori, suggerendo che si tratti di una mutazione *de novo*.

Il probando, all'età di 5 anni, la settimana successiva a un episodio febbrile trattato con antibiotici, è stato ricoverato per emiparesi sinistra, mal di testa e disturbi visivi. La tomografia computerizzata ha documentato la presenza di una trombosi venosa massiva delle vene del seno cerebrale. Il probando è negativo per la mutazione FV Leiden e per la mutazione G20210A del gene della protrombina.

**Famiglia 6.** Il sequenziamento di tutti gli esoni e delle giunzioni esone/introne non ha evidenziato alterazioni a carico del gene SERPINC1 della probanda. L'analisi mediante MLPA non ha identificato riarrangiamenti genomici coinvolgenti le regioni esoniche analizzate. La probanda ha sperimentato un TIA a 47 anni con ricorrenza a 49 anni dopo la sospensione dell'antiaggregante.

**Famiglia 7.** La probanda è risultata portatrice eterozigote della mutazione puntiforme c.391C>T, che determina la transizione di una Citosina a Timina nell'esone 2. Questa mutazione porta alla sostituzione di una Leucina con una Fenilalanina a livello del residuo 131 (p.Leu131Phe). La mutazione riscontrata determina l'alterazione del sito HBS dell'AT, confermata da livelli normali di attività progressiva dell'AT (con livelli normali di antigene) e del profilo anomalo della elettroforesi bidimensionale (dato non mostrato). La ricerca della mutazione nei familiari ha confermato l'alterazione genetica in tutti i soggetti indagati (madre, figlie 1 e 3).

La paziente ha sperimentato una TVP a un arto inferiore *post partum* all'età di 19 anni. A 31 anni, durante la gravidanza, ha avuto una trombosi iliaco-femoro-poplitea sinistra, trattata con EBPM. Al parto è stata effettuata la terapia con concentrato di AT. Dopo il taglio cesareo si è sviluppata una EP dei rami distali. La paziente è stata pertanto posta in trattamento TAO *sine die*. A fronte della storia clinica della paziente e per escludere la presenza di grandi delezioni, è stata applicata anche la metodica MLPA che non ha

identificato riarrangiamenti genomici coinvolgenti le regioni esoniche analizzate. La paziente non è portatrice di altri difetti noti predisponenti la trombosi.

Il test AT anti-Xa ha fornito valori al di sotto del limite inferiore dell'IR per la probanda, la figlia 3 e la madre, mentre il test AT anti-IIa ha fornito valori all'interno dell'IR.

**Famiglia 19** – La probanda è portatrice della mutazione c.218C>T che, con la sostituzione di una Prolina con una Leucina (p.Pro73Leu), determina una alterazione del dominio HBS dell'AT. Entrambi i test funzionali AT anti-Xa e AT anti-IIa hanno fornito risultati di attività AT all'interno dei rispettivi IR. I dosaggi effettuati c/o il laboratorio dell'Universitair Ziekenhuis di Bruxelles hanno fornito un valore normale con un test che misura l'attività anti-IIa dell'AT e con il kit HemosIL (IL), ma risultati patologici con altri due test che misurano l'attività anti-Xa dell'AT (Coamatic AT della IL e Innovance AT della Siemens). Il dosaggio della proteina totale è risultato normale in entrambi i laboratori.

La probanda ha una storia personale negativa per eventi tromboembolici, ma una storia familiare positiva per eventi trombotici arteriosi e venosi. Non sono disponibili i dati sui genitori relativamente alla presenza di alterazioni nel gene SERPINC1.

**Famiglia 20** – Il probando è portatore della completa delezione del gene. Tale difetto è presente negli altri membri della famiglia (madre, zii, fratello e sorella). I risultati dei test funzionali e del test antigenico esprimono una carenza di tipo I. I dosaggi effettuati a Bruxelles hanno fornito valori patologici sia per l'attività anti-Xa dell'AT (kit HemosIL) sia per la misura della quantità di proteina.

Il probando è asintomatico ma appartiene a una famiglia con una importante storia di eventi trombotici: infatti, 2 zii hanno avuto TVP ed EP in età giovanile; la nonna aveva avuto TVP ricorrenti; la madre, anch'essa carente di AT, è asintomatica ma è stata sempre profilassata nelle situazioni a rischio tromboembolico. Il fratello e la sorella del probando sono asintomatici.

**Famiglia 21** – La probanda è portatrice della mutazione c.218C>T, p.Pro73Leu, la stessa rilevata nella famiglia 19. La mutazione è stata riscontrata nel padre e la sua presenza è stata confermata nella probanda. Entrambi i test funzionali AT anti-Xa e AT anti-IIa forniscono risultati di attività AT all'interno dei rispettivi IR (con normalità dell'attività progressiva dell'AT e della quantità di proteina). Presso il laboratorio di Bruxelles sono stati ottenuti valori normali con i kit Coamatic AT (IL) e patologici con

Innovance AT (Siemens). Il dosaggio della proteina totale è risultato normale in entrambi i laboratori.

La probanda ha avuto un TIA a 36 anni; il padre è stato studiato e identificato come carente di AT dopo aver avuto due infarti del miocardio.

**Famiglia 22** – La probanda è portatrice della mutazione c.235C>T che determina la sostituzione di una Arginina con una Cisteina (p.Arg79Cys). La mutazione era presente anche nella madre. Entrambi i test funzionali AT anti-Xa e AT anti-IIa forniscono risultati di attività AT al di sotto del limite inferiore del rispettivo IR. I valori dell'attività progressiva dell'AT e della sua misura antigenica sono normali, confermando la carenza di tipo II, che interessa il dominio HBS dell'AT. I dosaggi effettuati a Bruxelles con i kit Coamatic AT (IL) e Innovance AT (Siemens) hanno fornito anch'essi risultati patologici, a fronte di un livello antigenico normale.

La probanda, asintomatica, è stata riscontrata con difetto di AT durante le indagini per infertilità. E' eterozigote per la mutazione G20210A. Ha ereditato il difetto dell'AT dalla madre che ha avuto un IMA a 51 anni.

**Famiglia 23** – La probanda è portatrice della mutazione c.236G>A che determina la sostituzione di una Arginina con una Istidina (p.Arg79His) nel sito HBS. Tutti i test funzionali (AT anti-Xa, AT anti-IIa e AT progressiva) e il dosaggio immunologico forniscono risultati di attività AT all'interno dei rispettivi IR. I dosaggi effettuati a Bruxelles hanno fornito valori di attività AT normali con il kit HemosIL (IL) e valori patologici con i kit Coamatic AT (IL) e Innovance AT (Siemens). Il dosaggio della proteina totale è risultato normale in entrambi i laboratori.

La probanda è asintomatica. La madre era stata identificata come carente di AT dopo due episodi di EP in età giovanile.

**Soggetto #1** – Il Soggetto #1 è risultato portatore della mutazione Cambridge II (c.1246G>T, p.Ala416Ser) allo stato eterozigote; tale difetto è stato evidenziato dal test AT anti-IIa. I valori di AT antigene e AT progressiva sono rispettivamente 88% e 92%. Il probando ha una storia personale e familiare negativa per eventi tromboembolici.

### **Misure di accuratezza diagnostica**

E' stata valutata l'accuratezza diagnostica dei due test nel gruppo di soggetti (n= 21) per i quali è disponibile il risultato della ricerca di mutazioni nel gene SERPINC1 (tabella 9).

Il test AT anti-Xa ha individuato 12/18 carenze genotipiche di AT, con una sensibilità di 61.1% [IC95% = (35.7%, 82.7%)] e una specificità di 66.7% [IC95%= (9.4%, 99.2%)]. Il Valore Predittivo Positivo (VPP) è 91.7% [IC95%= (61.5%, 99.8%)], il Valore Predittivo Negativo (VPN) è 22.2% [IC95%= (2.8%, 60.0%)]. Il test AT anti-IIa ha individuato 10/18 carenze, mostrando una sensibilità di 55.6% [IC95%= (30.8%, 78.5%)] e una specificità di 66.7% [IC95%= (9.4%, 99.2%)]. Il VPP è 90.9% [IC95%= (58.7, 99.8)], il VPN è 20.0% [IC95%= (2.5%, 55.6%)]. I valori delle AUC (ROC) sono 0.639 [IC95%= (0.292, 0.985)] per il test AT anti-Xa e 0.611 [IC95%= (0.264, 0.958)] per il test AT anti-IIa.

L'esecuzione di entrambi i test permetterebbe di identificare la presenza di 13/18 carenze genotipiche dell'AT, con sensibilità di 72.2% [IC95%= (46.5%, 90.3%)] e specificità di 66.7% [IC95%= (9.4%, 99.2%); il VPP risulterebbe 92.9% [IC95%= (66.1%, 99.8%)] e il VPN sarebbe 28.6% [IC95%= (3.7%, 71.0%)]. Il valore della AUC (ROC) risulterebbe 0.694 [IC95%= (0.351, 1.000)].

Se, oltre a considerare l'IR di entrambi i test AT anti-Xa e AT anti-IIa, si utilizzasse anche l'IR del rapporto AT anti-IIa/AT anti-Xa (<0.85 o >1.10), verrebbero identificate 16/18 carenze genotipiche dell'AT con sensibilità 88.9% [IC95%= (65.3, 98.6%)] e specificità invariata [66.7%, IC95%= (9.4, 99.2%)]. Il VPP risulterebbe 94.1% [IC95%= (71.3%, 99.9%); il VPN sarebbe 50% [IC95%= (6.8%, 93.2%)]. Il valore della AUC (ROC) risulterebbe 0.778 [IC95%= (0.443, 1.000)].

## DISCUSSIONE

I metodi funzionali amidolitici (anti-Xa e anti-IIa) sono attualmente raccomandati come test di screening per l'identificazione delle carenze di AT, essendo in grado di evidenziare sia i difetti quantitativi sia i difetti qualitativi di questo inibitore fisiologico della coagulazione. L'utilizzo di entrambi i metodi non era giustificato, essendo presenti in letteratura, fino a pochi anni fa, rare segnalazioni di dati discordanti, ovvero di risultati di attività anti-Xa normali vs. attività anti-IIa patologici e *vice versa*.

A fronte di un riscontro in laboratorio di un caso di discordanza tra un metodo AT anti-Xa e un metodo AT anti-IIa, è stata misurata l'attività anti-Xa e l'attività anti-IIa dell'AT in plasmi provenienti da pazienti afferiti al laboratorio con richiesta di AT (gruppo "routine e trombofilici") e in plasmi da un gruppo di soggetti con carenza di AT (gruppo "carenti noti"), in confronto ad una popolazione di controllo impiegata per la definizione degli intervalli di riferimento.

I valori di AT anti-Xa e AT anti-IIa ottenuti per la popolazione di controllo, da cui derivano gli IR, si distribuiscono in un ambito di misure ristretto rispetto alla popolazione in studio (figure 2 e 3).

I valori di AT anti-Xa e AT anti-IIa sono risultati significativamente correlati ( $\rho$  di Spearman  $>0.7$ ,  $p < 0.001$ ) in tutti i gruppi di soggetti. I risultati delle regressioni di Deming e di Passing e Bablok indicano che non ci sono differenze sistematiche o proporzionali tra i due metodi nella popolazione di riferimento e nel gruppo "routine e trombofilici"; invece, nel gruppo "carenti noti" il metodo AT anti-IIa tende a sovrastimare per valori di AT  $< 80\%$  circa e tende a sottostimare per valori  $> 80\%$ .

Nonostante i metodi AT anti-Xa e AT anti-IIa presentino una eccellente concordanza nel gruppo "routine e trombofilici" e una buona concordanza nel gruppo "carenti noti" (indice K di Cohen), sono stati riscontrati 8 casi discrepanti: 6 con valori di AT anti-Xa patologici vs. valori di AT anti-IIa normali (2 nel gruppo "routine e trombofilici" e 4 nel gruppo "carenti noti"), 2 con valori di AT anti-Xa normali vs. valori di AT anti-IIa patologici (1 nel gruppo "routine e trombofilici" e 1 nel gruppo "carenti noti").

L'analisi genetica ha confermato la presenza di un difetto nel gene SERPINC1 in 5/5 casi discrepanti indagati:

- in 3 casi correlati (probanda, madre e figlia 3 della famiglia 7) si è riscontrata la mutazione c.391C>T che altera il dominio HBS dell'AT (p.Leu131Phe);

- in 2 casi (probanda della famiglia 4 e soggetto #11) si è riscontrata la mutazione Cambridge II (c.1246G>T, p.Ala416Ser).

La mutazione c.391C>T, p.Leu131Phe non viene rilevata dal test AT anti-IIa: il dato conferma la maggior sensibilità del test AT anti-Xa per questa variante [38]. La mutazione Cambridge II non viene rilevata dal test AT anti-Xa, come già descritto da Perry [26].

Entrambi i test amidolitici hanno fornito risultati patologici di AT % in soggetti con carenza di tipo I (confermata anche dai livelli di antigene). Le mutazioni riscontrate sono: 1 mutazione *nonsense* (c.490C>T, p.Arg164\*), 2 mutazioni *in-frame* (c.1033\_1035delGAG, p.Glu345del e c.462\_464delTTC, p.Phe155del), 1 mutazione che coinvolge la prima base dell'introne 4 (c.762+1G>A) e 1 delezione completa del gene. Valori patologici di attività AT sono stati ottenuti con entrambi i metodi anche per la mutazione c.235C>T, p.Arg79Cys, che interessa l'HBS dell'AT. Invece, in altri 2 casi con mutazioni che determinano una alterazione del sito HBS (c.218C>T, p.Pro73Leu e c.236G>A, p.Arg79His) entrambi i test hanno fornito valori di attività AT nella norma. La scarsa sensibilità di alcuni test alla presenza di alcune alterazioni del sito HBS dell'AT, riportata in una comunicazione presentata al XXIX Congresso della International Society on Thrombosis and Haemostasis [39], dipende da variabili analitiche, quali la diluizione del campione, il tempo di inattivazione della proteasi da parte dell'AT e le unità di trombina [24]. In particolare, le molecole di AT con alterazioni del sito HBS possono essere distinte dalle molecole normali solo se nei test analitici vengono impostati tempi brevi per la fase di inattivazione della trombina o del FXa da parte dell'AT, in modo che l'AT non riesca a esprimere la sua attività progressiva. Pertanto, per verificare la possibilità di evidenziare questi casi di carenza di AT di tipo II HBS, è stato ridotto il tempo di inattivazione del FXa nel test dell'ACL TOP portandolo da 110-140 secondi (parametro impostato dal produttore) a 28-30 secondi. Anche in queste condizioni, però, si sono ottenuti, per le carenze di tipo II HBS sopra indicate, valori di AT anti-Xa nella norma.

In 1 soggetto (famiglia 6, probanda) con carenza funzionale dell'AT non sono stati riscontrati difetti nel gene SERPINC1. La letteratura riporta che possono non essere individuate mutazioni anche in circa il 20% dei pazienti con carenza di AT [40]. La paziente indagata, tuttavia, presenta anche ridotta funzionalità dei fattori V e XI della coagulazione e appartiene a una famiglia con difetti multipli (la sorella presenta, oltre alla carenza di AT, FV e FXI, anche un deficit di Proteina C). E' stata pertanto avanzata

l'ipotesi che la probanda della famiglia 6 possa essere affetta da un disordine congenito di glicosilazione.

La carenza di AT si esprime con un fenotipo variabile in termini di quantità di proteina e di attività anti-Xa e anti-IIa: nella popolazione studiata, i portatori della mutazione Cambridge II e quelli delle mutazioni II HBS p.Leu131Phe e p.Pro73.Leu hanno differenti valori di attività e di antigene. Questa variabilità potrebbe essere legata a determinanti che non risiedono nel gene SERPINC1 [41-43].

Anche le manifestazioni cliniche sono differenti: nei componenti della famiglia 7 dove è stata verificata la presenza della mutazione c.391C>T, p.Leu131Phe, 2 soggetti sono asintomatici, 2 hanno sviluppato un evento trombotico venoso in età giovanile (con ricorrenza), e 1 soggetto ha avuto un evento trombotico in età adulta.

Luxembourg ha suddiviso le mutazioni riscontrate in mutazioni *null* (mutazioni *nonsense*, piccole delezioni/inserzioni/duplicazioni, mutazioni nelle regioni di *splicing*, grandi delezioni) e in mutazioni *missense*, e ha studiato l'effetto del tipo di mutazione e di carenza di AT sulle manifestazioni tromboemboliche [21]. L'Autore ha trovato che i portatori di mutazioni *missense*, che sono responsabili della maggior parte delle carenze di tipo II, hanno un fenotipo di tromboembolismo venoso meno grave, rispetto ai soggetti portatori di mutazioni *null*, e con un rischio per TVP ridotto del 60%. Nella popolazione oggetto di questo studio tutti i soggetti caratterizzati dalla presenza di una mutazione *null* hanno avuto eventi tromboembolici (TVP, EP), anche con ricorrenza, con l'eccezione del portatore della delezione completa del gene; i portatori di mutazioni *missense* (che presentano una carenza di tipo II HBS o II RS, Cambridge II) hanno una storia clinica negativa per eventi tromboembolici, ad eccezione di alcuni componenti della famiglia 7, portatori della mutazione HBS c.391C>T, p.Leu131Phe, che hanno avuto TVP o EP.

Per quanto riguarda le manifestazioni trombotiche arteriose, la letteratura riporta dati contrastanti. Luxembourg ha osservato l'associazione tra eventi tromboembolici arteriosi e la presenza di mutazioni *missense*, in particolare di tipo II HBS [21]. Nella popolazione oggetto dello studio gli eventi trombotici arteriosi si sono osservati nelle famiglie 6, 8, 19, 21 e 22. Nelle famiglie 19, 21 e 22 il difetto molecolare è nell'HBS dell'AT.

Nella popolazione indagata, entrambi i test identificano correttamente e concordemente le carenze di tipo I mentre mostrano una diversa sensibilità per le carenze di tipo II HBS e II RS Cambridge II (figura 7). Pertanto, l'esecuzione di uno solo dei due test amidolitici permette di individuare un numero limitato di carenze ereditarie di AT, come indicato dalla sensibilità ridotta di entrambi i test (61.1% per AT anti-Xa e 55.6% per AT anti-IIa).

L'utilizzo combinato di entrambi i test permette di aumentare la sensibilità diagnostica (72.2%). Se viene utilizzato anche l'IR del rapporto AT anti-IIa/AT-anti-Xa, la sensibilità diagnostica aumenta ulteriormente (88.9%). Infatti, i 2 casi con mutazione Cambridge II allo stato eterozigote (genitori della probanda della famiglia 4), per i quali entrambi i test hanno fornito valori di AT normali, presentano un rapporto AT anti-IIa/AT anti-Xa  $<0.85$  (tabella 6); valori analoghi sono osservabili per gli altri due soggetti con mutazione Cambridge II che, però, hanno un valore di AT anti-IIa patologico (probanda della famiglia 4, omozigote per il difetto, e soggetto #1). Anche un soggetto con carenza di tipo II HBS viene identificato dal rapporto  $>1.10$  (probanda della famiglia 21) (figura 8).

I risultati di questo studio, pur se ottenuti su una popolazione limitata di carenze, sono in accordo con i recenti dati della letteratura [44,45], relativi alla differente sensibilità (dipendente non solo dal tipo di enzima impiegato, ma anche dalle variabili analitiche del test) dei kit commerciali, alcuni dei quali non sono in grado di identificare tutte le carenze di AT. Questi dati rendono auspicabile la rivalutazione dei risultati di validazione di questi metodi, che probabilmente era stata condotta su un numero limitato di carenze, soprattutto di tipo I, più facilmente individuabili, e su pochi casi di tipo II, in particolare quelli che coinvolgono l'HBS dell'AT.

L'identificazione anche delle carenze che, sulla base dei dati della letteratura, sono associate a un minore rischio trombotico è di rilevanza clinica perché ad esse si possono aggiungere altri fattori di rischio, congeniti (ad es. Fattore V Leiden) e/o acquisiti (es. gravidanza), che possono aumentare il rischio trombotico totale; oppure possono essere trasmesse alla discendenza e combinarsi in eterozigoti composti [46] o omozigoti con rischio potenzialmente aumentato.

Il principale limite di questo studio è il numero esiguo di carenze di AT caratterizzate geneticamente: ciò ha impedito di effettuare correlazioni più accurate con il fenotipo ed è testimoniato dagli ampi intervalli di confidenza dei parametri di accuratezza diagnostica (Sensibilità, Specificità, VPP, VPN, AUC ROC). Inoltre, i campioni provenienti dal laboratorio di Bruxelles sono stati selezionati e non sono rappresentativi della reale distribuzione nella popolazione. L'analisi di soggetti con altri tipi di mutazioni avrebbe potuto portare a risultati di accuratezza diagnostica differenti.

Un altro limite consiste nell'aver confrontato un solo metodo basato sul FXa e un solo metodo basato sul FIIa. Metodi con proprietà differenti possono portare ad una diversa valutazione diagnostica.

Questo lavoro ha il pregio di aver prodotto i dati sull'utilizzo parallelo di due test amidolitici di screening (un test basato sull'inibizione del FXa e un test basato sull'inibizione della trombina) applicati nella routine per l'identificazione della carenza di AT. L'utilizzo combinato dei due test ha permesso di identificare un soggetto con carenza di AT di tipo II RS, Cambridge II (1 caso/500 soggetti circa).

In conclusione, l'utilizzo contemporaneo di due test per il dosaggio dell'AT, uno basato sull'inibizione del FXa e uno basato sull'inibizione della trombina, permetterebbe di identificare un maggior numero di carenze di questo importante inibitore fisiologico della coagulazione. L'utilizzo anche del rapporto tra i risultati ottenuti per i due test permetterebbe di aumentare il potere diagnostico dei dosaggi e quindi di individuare pazienti potenzialmente a rischio trombotico.

La possibilità di studiare una casistica più ampia di carenze di AT e la disponibilità di reagenti/kit commerciali con una maggiore sensibilità ai diversi difetti dell'AT consentirebbero una migliore valutazione dell'accuratezza diagnostica dei singoli metodi di dosaggio dell'attività dell'AT e del loro uso combinato.

L'utilizzo, nella pratica routinaria di laboratorio, di due metodi per lo screening della funzionalità dell'AT deve comunque tener conto dell'impatto economico e del relativo costo/beneficio.

## TABELLE e FIGURE

**Tabella 1**

**Gruppo “carenti noti”, storia clinica**

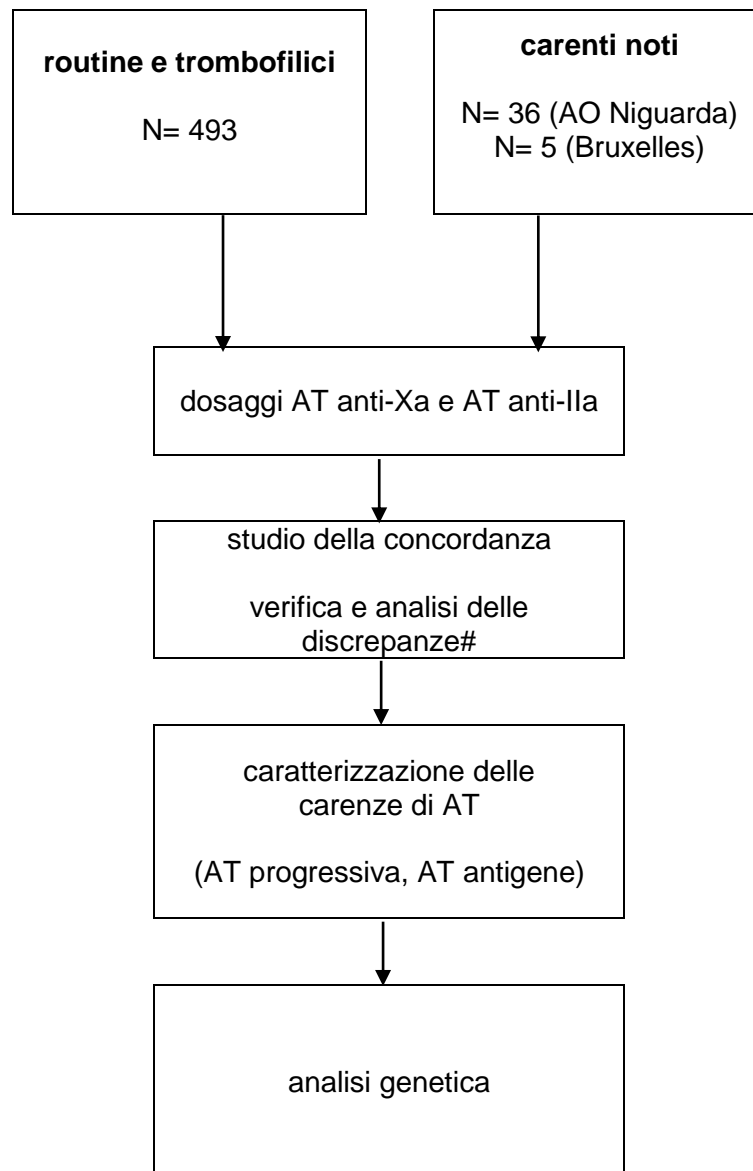
Fam.	soggetto	Primo evento (età)	fattori di rischio	Ricorrenza (età)	fattori di rischio
1	probanda madre	EP (30) EP (28) †	gravidanza puerperio	TVP (51) -	nessuno -
2	probanda fratello	TVP (32) EP	puerperio nd	nessuna nd	- -
3	probando madre	TVP+EP (27) TVP (69)	nessuno nessuno	TVP+EP (31) nessuna	nessuno -
4	probanda madre padre	nessuno nessuno nessuno	- - -	- - -	- - -
5	probando madre padre	TVP (5) nessuno nessuno	infezione (febbre) - -	nessuna - -	- - -
6	probanda sorella fratello	TIA (47) nessuno nd	nessuno - -	TIA (49) - -	sospensione antiaggregante - -
7	probanda sorella figlia 1 figlia 2 figlia 3 madre	TVP (19) TVP (23)* nessuno nessuno nd TVP (57)	puerperio nd - - - nessuno	TVP (31) - EP nd - - - nessuna	gravidanza – dopo tagliocesareo - - - - -
8	probando padre	nessuno TIA (54)	- nessuno	- nd	- -
9	probanda	nd	-	-	-
10	probanda fratello madre	nessuno nd nd	- - -	- - -	- - -
11	probanda	nessuno	-	-	-
12	probanda	nessuno	-	-	-
13	probanda	TVP+EP (52)	trauma	nd	-
14	probanda	nd	-	-	-
15	probanda figlia madre sorella	TVP+EP (21) nd nessuno aborto spontaneo#	chirurgia + estroprog. - - nessuno	nd - - -	- - - -
16	probanda	TVP (45)	chirurgia	EP (46)	nd
17	probanda	nessuno	-	-	-
18	probanda	nessuno	-	-	-
19	probanda madre nonno	nessuno IMA (51) † EP	- nd nd	- - nd	- - -
20	probando fratello sorella zio 1 zio 2 nonna	nessuno nessuno nessuno TVP+EP (<30) TVP+EP (<30) TVP	- - - nd nd nd	- - - - - TVP	- - - - - nd
21	probanda padre	TIA (36) IMA (56)	nessuno nd	nessuna IMA (57)	- -
22	probanda madre	nessuno IMA (51)	G20210A (etz) nd	- -	- -
23	probanda madre	nessuno EP (34)	- nd	- EP (35)	- -

Le famiglie 19-23 sono state studiate c/o il Laboratorio di Bruxelles.

TVP: trombosi venosa profonda; EP: embolia polmonare; IMA: infarto miocardico acuto; TIA: attacco ischemico transitorio; etz: eterozigote; \* 6 mesi dopo il parto; # 20<sup>a</sup> settimana di gestazione; nd: non disponibile.

**Figura 1**

**Diagramma di studio**



# Definizione di discrepanza: attività AT anti-Xa entro il relativo intervallo di riferimento vs. attività AT anti-IIa al di fuori del relativo intervallo di riferimento o *vice versa*

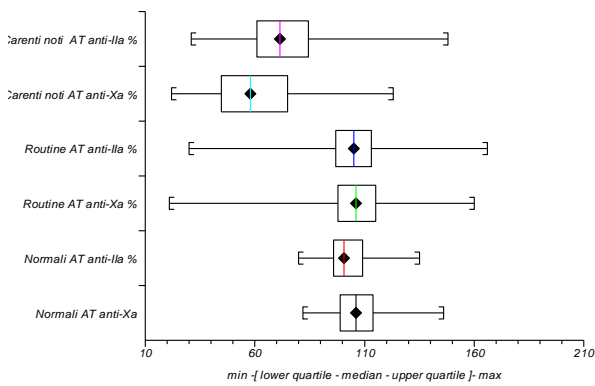
**Tabella 2**

**AT anti-Xa (%), AT anti-IIa (%), e ratio AT anti-IIa/AT anti-Xa nella popolazione di riferimento e nei gruppi “routine e trombofilici” e “carenti noti”**

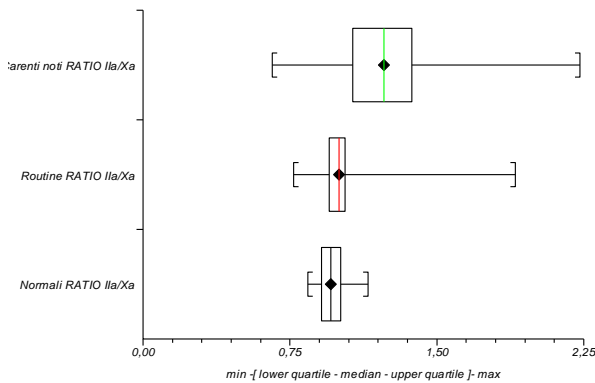
	Popolazione di riferimento (N= 100)			Gruppo “routine e trombofilici” (N= 493)			Gruppo “carenti noti” (N= 38)		
	AT anti-Xa	AT anti-IIa	Ratio	AT anti-Xa	AT anti-IIa	Ratio	AT anti-Xa	AT anti-IIa	Ratio
	%	%		%	%		%		
Min	82	80	0.84	21	30	0.77	22	31	0,66
I quartile	99	96	0.91	98	97	0.95	45	61	1.07
Mediana	106	101	0.96	106	105	1.00	58	72	1.23
III quartile	114	109	1.01	115	113	1.03	75	84	1.37
Max	146	135	1.15	160	166	1.90	123	148	2.23

Ratio= AT anti-IIa (%)/AT anti-Xa (%)

**Figura 2 - Box and Whisker plot per AT anti-Xa (%) e AT anti-IIa (%)**



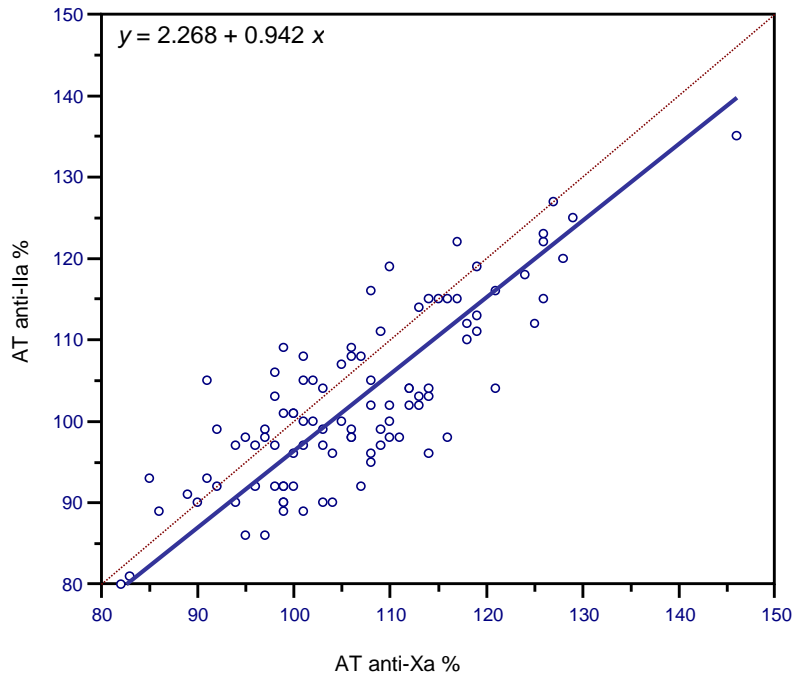
**Figura 3 - Box and Whisker plot per AT anti-IIa/AT anti-Xa**



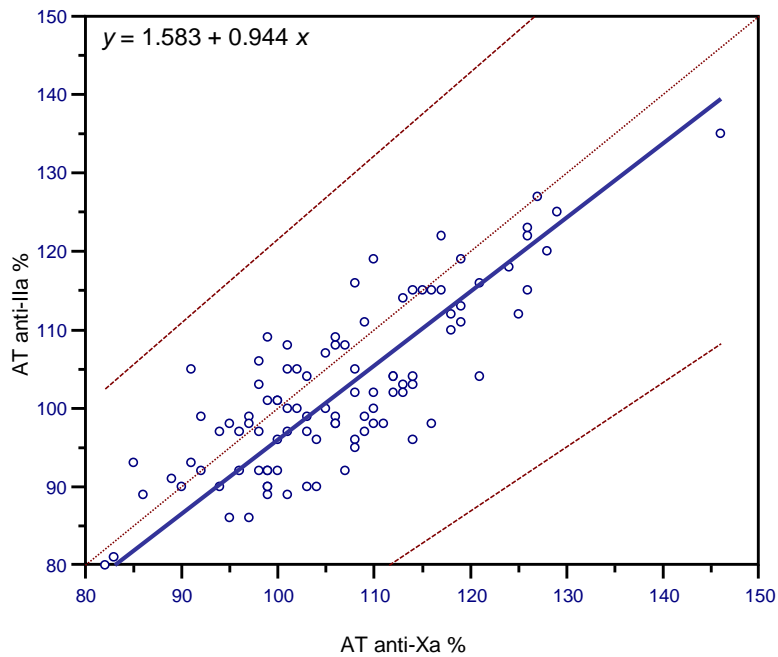
**Figura 4**

**Regressioni di Deming e di Passing e Bablok per AT anti-IIa (%) vs. AT anti-Xa (%) nella popolazione di riferimento (N= 100)**

**Figura 4a – Regressione di Deming**



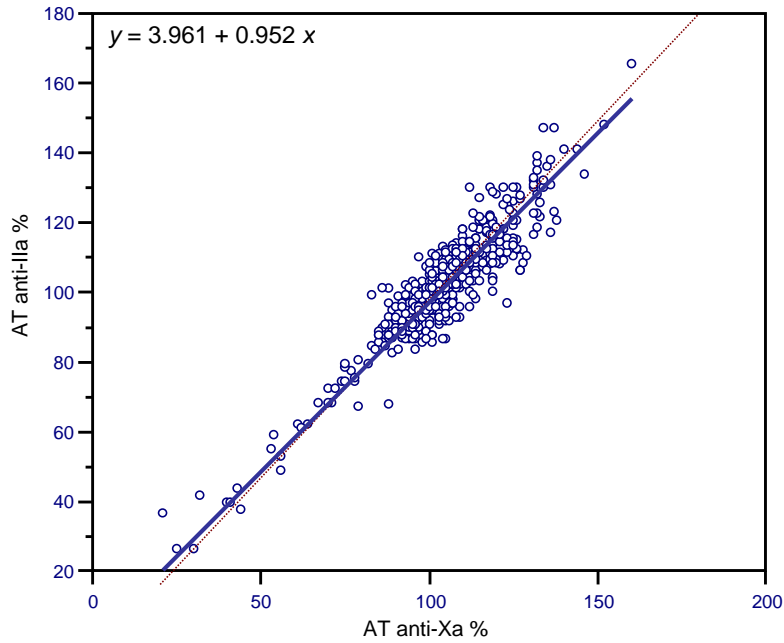
**Figura 4b – Regressione di Passing e Bablok**



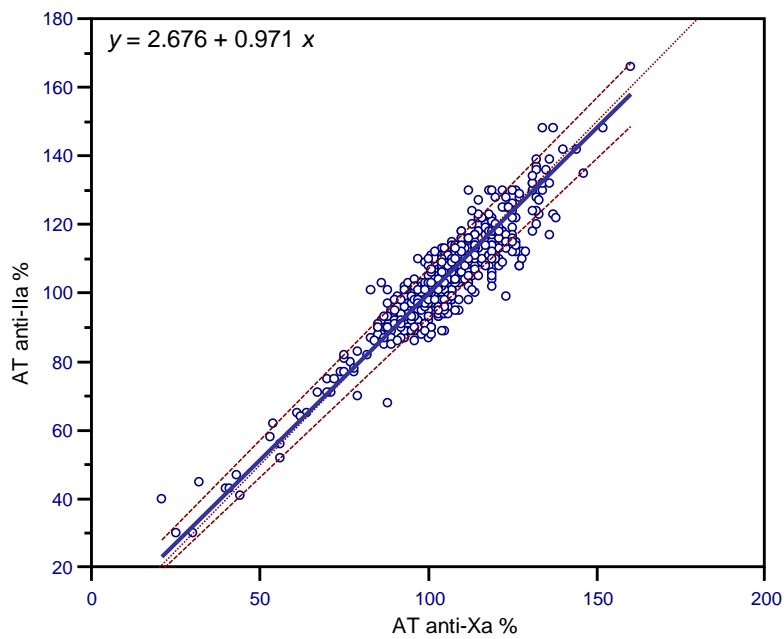
**Figura 5**

**Regressioni di Deming e di Passing e Bablok per AT anti-IIa (%) vs. AT anti-Xa (%) nel gruppo "routine e trombofilici" (N= 493)**

**Figura 5a – Regressione di Deming**



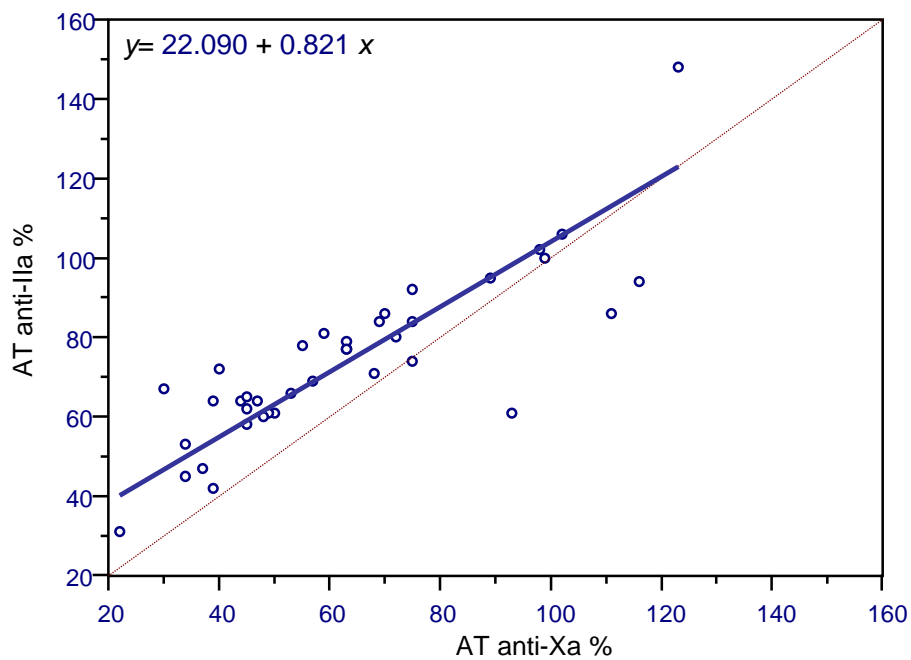
**Figura 5b – Regressione di Passing e Bablok**



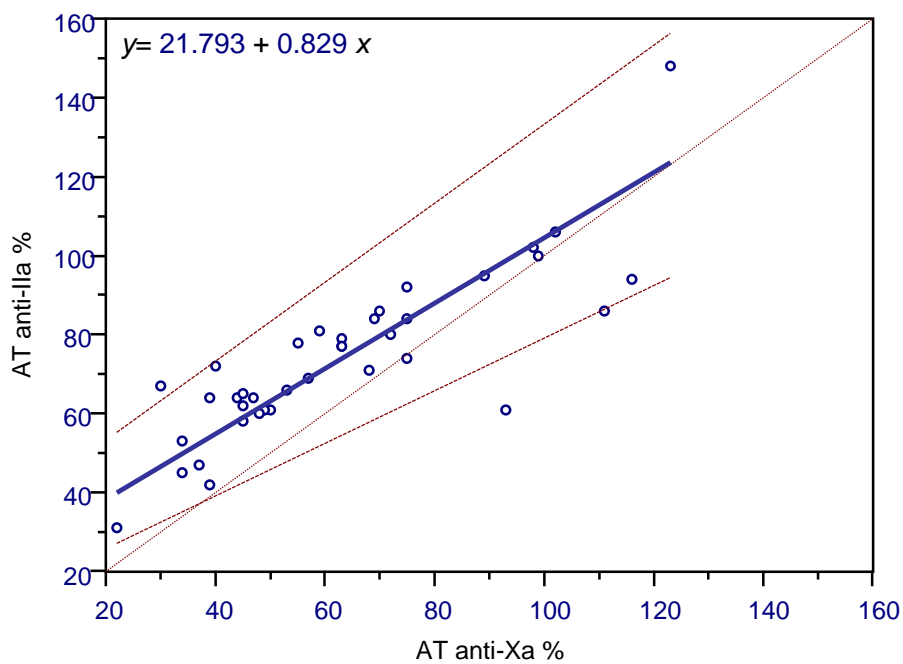
**Figura 6**

**Regressioni di Deming e di Passing e Bablok per AT anti-IIa (%) vs. AT anti-Xa (%) nel gruppo "carenti noti" (N=38)**

**Figura 6a – Regressione di Deming**



**Figura 6b – Regressione di Passing e Bablok**



**Tabella 4**

**Valori di attività AT anti-Xa (%) e AT anti-IIa (%) concordi nel gruppo “routine e trombofilici”**

<b>Valori concordi</b>		<b>AT anti-Xa %</b>	<b>AT anti-IIa %</b>	<b>Ratio</b>
<b>all'interno dell'IR</b> <b>N= 460</b>	min	84	85	0.80
	I quartile	100	98	0.95
	mediana	107	106	0.99
	III quartile	116	114	1.03
	max	160	166	1.20
<b>al di sotto del limite inferiore dell'IR</b> <b>N= 30</b>	min	21	30	0.89
	I quartile	44	47	1.00
	mediana	66	68	1.04
	III quartile	75	77	1.08
	max	82	83	1.90
<b>TUTTI</b> <b>N= 490</b>	min	21	30	0.80
	I quartile	99	97	0.95
	mediana	106	105	1.00
	III quartile	115	113	1.03
	max	160	166	1.90
Intervallo di Riferimento		84-129%	84-126%	0.85-1.10

Ratio= AT anti-IIa (%) / AT anti-Xa (%)

**Tabella 5****Valori di attività AT anti-Xa (%) e anti-IIa (%) discrepanti nel gruppo “routine e trombofilici”**

Soggetto #	Prima determinazione			Verifica della discrepanza		
	AT anti-Xa %	AT anti-IIa %	Ratio	AT anti-Xa %	AT anti-IIa %	Ratio
1	88	68	0.77	88	68	0.77
2	79	84	1.06	83	87	1.05
3	82	90	1.10	83	101	1.22
Intervallo di Riferimento	84-129%	84-126%	0.85-1.10	84-129%	84-126%	0.85-1.10

Ratio= AT anti-IIa (%) / AT anti-Xa (%)

Definizione di discrepanza: attività AT anti-Xa (%) entro il relativo intervallo di riferimento (IR) vs. attività anti-IIa (%) al di fuori del relativo intervallo di riferimento o *vice versa*

**Tabella 6**

**Misure dell'AT nel gruppo "carenti noti"**

Fam.	soggetto	AT anti-Xa (%)	AT anti-IIa (%)	AT Antigene (%)	AT progressiva (%)	Ratio
1	probanda	50	61	50	66	1.22
2	probanda	30	67	42	43	2.23
	fratello	40	72	45	76	1.80
3	probando	45	62	42	58	1.38
	madre	55	78	54	61	1.42
4	probanda	93	61	91	125	0.66
	madre	111	86	108	123	0.77
	padre	116	94	107	124	0.81
5	probando	48	60	45	57	1.25
	madre*	112	109	107	98	0.97
	padre*	117	113	111	113	0.97
6	probanda	34	45	28	53	1.32
	sorella	39	42	33	46	1.07
	fratello*	113	118	122	104	1.04
7	probanda	75	92	85	86	1.23
	figlia 1	72	80	90	85	1.11
	figlia 2	68	71	76	75	1.04
	figlia 3	75	84	96	86	1.12
	madre	70	86	83	78	1.23
8	probando	69	84	94	97	1.22
	padre	63	77	81	79	1.22
9	probanda	75	74	133	126	0.98
10	probanda	34	53	41	40	1.56
	fratello	89	95	102	92	1.07
	madre	47	64	48	48	1.34
11	probanda	37	47	40	48	1.25
12	probanda	57	69	66	76	1.22
13	probanda	44	64	50	60	1.45
14	probanda	63	79	79	71	1.27
15	probanda	45	65	48	53	1.44
	figlia	22	31	26	30	1.44
	sorella	39	64	43	58	1.64
	madre	98	102	97	103	1.04
16	probando	63	77	69	71	1.22
17	probanda	45	58	48	49	1.28
18	probanda	53	66	53	49	1.26
19	probanda	102	106	132	113	1.04
20	probando	49	61	55	67	1.24
21	probanda	123	148	152	134	1.20
22	probanda	59	81	145	129	1.37
23	probanda	99	100	119	106	1.01
Intervallo di Riferimento		84-129%	84-126%	80-139%	79-128%	0.85-1.10

Ratio= AT anti-IIa (%) / AT anti-Xa (%)

\*soggetti non carenti fenotipicamente e/o genotipicamente, esclusi dalle analisi

**Tabella 7**

**Concordanza tra i test AT anti-IIa e AT anti-Xa**

**Gruppo “routine e trombofilici”**

test	AT anti-IIa ↓	AT anti-IIa ↔	Tot
AT anti-Xa ↓	30	2	32
AT anti-Xa ↔	1	460	461
Tot	31	462	493

**Gruppo “carenti noti”**

test	AT anti-IIa ↓	AT anti-IIa ↔	Tot
AT anti-Xa ↓	26	4	30
AT anti-Xa ↔	1	7	8
Tot	27	11	38

↓ Valore di attività AT al di sotto del limite inferiore del relativo intervallo di riferimento

↔ Valore di attività AT entro il relativo intervallo di riferimento

**Tabella 8****Risultati dell'analisi genetica**

Fam.	soggetto	eventi	Mutazione	esone	proteina	carenza di tipo
1	probanda	+	c.1033_1035delGAG	5	p.Glu345del	I
2	probanda	+	c.462_464delTTC	3	p.Phe155del	I
3	probando	+	c.490C>T	3	p.Arg164*	I
	madre	+	c.490C>T	3	p.Arg164*	I
4	probanda	-	c.1246G>T	7	p.Ala416Ser	II RS (Cambridge II)
	madre	-	c.1246G>T	7	p.Ala416Ser	II RS (Cambridge II)
	padre	-	c.1246G>T	7	p.Ala416Ser	II RS (Cambridge II)
5	probando	+	c.762+1G>A	Introne 4	-	I
	madre	-	nessuna	-	-	-
	padre	-	nessuna	-	-	-
6	probanda	+	nessuna	-	-	-
7	probanda	+	c.391C>T	2	p.Leu131Phe	II HBS
	figlia 1	-	c.391C>T	2	p.Leu131Phe	II HBS
	figlia 3	nd	c.391C>T	2	p.Leu131Phe	II HBS
	madre	+	c.391C>T	2	p.Leu131Phe	II HBS
19	probanda	-	c.218C>T	2	p.Pro73Leu	II HBS
20	probanda	-	Delezione intero gene	-	-	I
21	probanda	-	c.218C>T	2	p.Pro73Leu	II HBS
22	probanda	-	c.235C>T	2	p.Arg79Cys	II HBS
23	probanda	-	c.236G>A	2	p.Arg79His	II HBS
	Sogg. #1	-	c.1246G>T	7	p.Ala416Ser	II RS (Cambridge II)

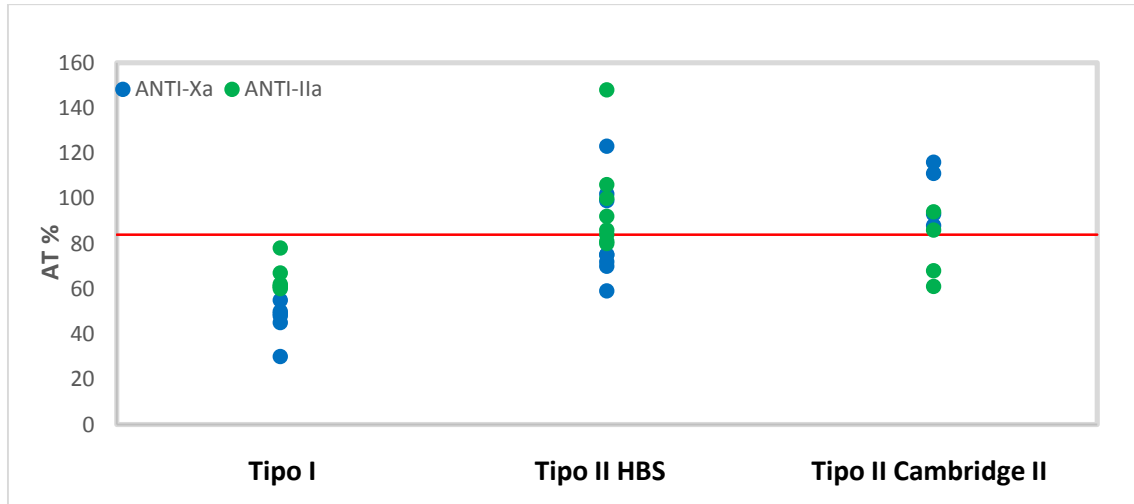
**Tabella 9****Misure di accuratezza diagnostica**

<b>Criterio diagnostico</b>	<b>AT anti-Xa</b>	<b>AT anti-IIa</b>	<b>AT anti-Xa AT anti-IIa</b>	<b>AT anti-Xa AT anti-IIa Ratio AT anti-IIa/AT anti-Xa</b>
sensibilità	61.1%	55.6%	72.2%	88.9%
95%CI	35.7%-82.7%	30.8%-78.5%	46.5%-90.3%	65.3%-98.6%
specificità	66.7%	66.7%	66.7%	66.7%
95%CI	9.4%-99.2%	9.4%-99.2%	9.4%-99.2%	9.4%-99.2%
VPP	91.7%	90.9%	92.9%	94.1%
95%CI	61.5%-99.8%	58.7%-99.8%	66.1%-99.8%	71.3%-99.9%
VPN	22.2%	20.0	28.6%	50%
95%CI	2.8%-60.0%	2.5%-55.6%	3.7%-71.0%	6.8%-93.2%
AUC (ROC)	0.639	0.611	0.694	0.778
95%CI	0.292-0.985	0.264-0.958	0.351-1.000	0.443-1.000

VPP, Valore Predittivo Positivo; VPN, Valore Predittivo Negativo; AUC (ROC), *Area Under Curve* (ROC).

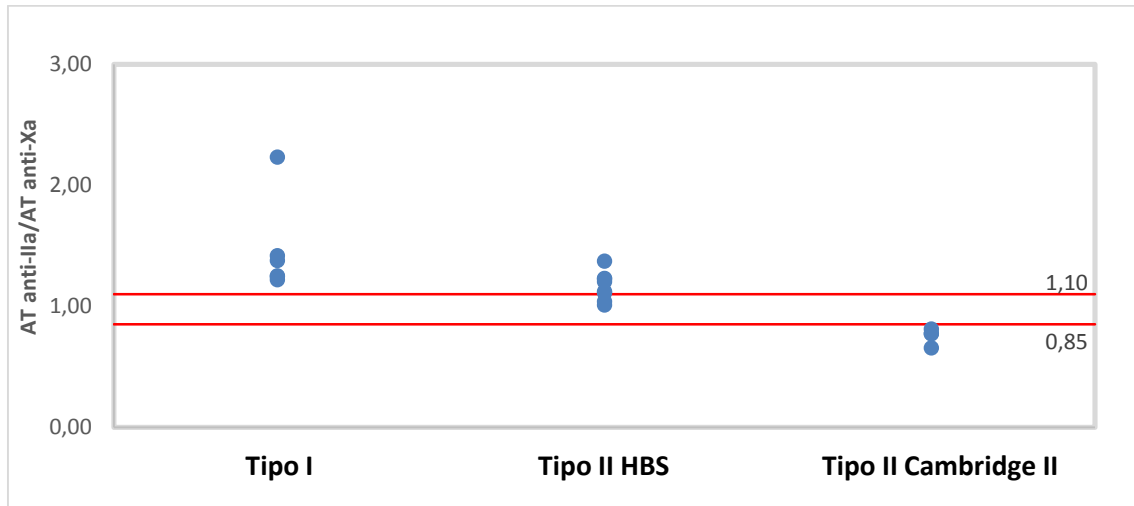
**Figura 7**

**Test AT anti-Xa (%) e AT anti-IIa (%) vs. tipo di mutazione**



**Figura 8**

**Rapporto AT anti-IIa/AT anti-Xa vs. tipo di mutazione**



## RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Abildgaard U. Antithrombin – Early prophecies and present challenges. *Thromb Haemost* 2007;98:97-104.
2. Kottke-Marchant K, Duncan A. Antithrombin deficiency. Issues in laboratory diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126:1326-36.
3. Roemisch J, Gray E, Hoffmann JN, Wiedermann CJ. Antithrombin: a new look at the actions of a serine protease inhibitor. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002;13:657-70.
4. Olds RJ, Lane DA, Chowdhury V, De Stefano V, Leone G, Thein SL. Complete nucleotide sequence of the antithrombin gene: evidence for homologous recombination causing thrombophilia. *Biochemistry* 1993;32:4216-24.
5. Olson ST, Richard B, Izaguirre G, Schedin-Weiss S, Gettins PGW. Molecular mechanisms of antithrombin-heparin regulation of blood clotting proteases. A paradigm for understanding proteinase regulation by serpin family protein proteinase inhibitors. *Biochimie* 2010;92:1587-96.
6. Corral J, Vicente V, Carrell RW. Thrombosis as a conformational disease. *Haematologica* 2005;90:238-46.
7. Bock SC, Harris JF, Balazs I, Trent JM. Assignment of the human antithrombin III structural gene to chromosome 1q23-25. *Cytogenet Cell Genet* 1985;39:67-9.
8. Khor B, Van Cott EM. Laboratory tests for antithrombin deficiency. *Am J Hematol* 2010;85:947-50.
9. Muszbek L, Bereczky Z, Kovács B, Komáromi I. Antithrombin deficiency and its laboratory diagnosis. *Clin Chem Lab Med* 2010; 48:S67-78.
10. Maclean PS, Tait RC. Hereditary and acquired antithrombin deficiency. Epidemiology, pathogenesis and treatment options. *Drugs* 2007;67:1429-40.
11. Patnaik MM, Moll S. Inherited antithrombin deficiency: a review. *Haemophilia* 2008;14:1229-39.
12. Bucciarelli P, Passamonti SM, Biguzzi E, Gianniello F, Franchi F, Mannucci PM, Martinelli I. Low borderline plasma levels of antithrombin, protein C and protein S are risk factors for venous thromboembolism. *J Thromb Haemost* 2012;10:1783-91.
13. Di Minno MND, Dentali F, Veglia F, Russolillo A, Tremoli E, Ageno W. Antithrombin levels and the risk of a first episode of venous thromboembolism. A case control-study. *Thromb Haemost* 2013;109:167-9.
14. Di Minno MND, Dentali F, Lupoli R, Ageno W. Mild antithrombin deficiency and the risk of recurrent venous thromboembolism: a prospective cohort study. *Circulation* 2014;129:497-503.
15. Lane DA, Bayston T, Olds RJ, Fitches AC, Cooper DN, Millar DS, Jochmans K, Perry DJ, Okajima K, Thein SL, Emmerich J. Antithrombin mutation database: 2<sup>nd</sup> (1997) update. For the Plasma Coagulation Inhibitors Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* 1997;77:197-211.
16. <http://www.hgmd.cf.ac.uk>, ultimo accesso: febbraio 2014
17. <http://www1.imperial.ac.uk/departamentofmedicine/divisions/experimentalmedicine/haematology/coag/antithrombin/>, ultimo accesso: febbraio 2014.
18. Caspers M, Pavlova A, Driesen J, Harbrecht U, Klamroth R, Kadar J, Fischer R, Kemkes-Matthes B, Oldenburg J. Deficiencies of antithrombin, protein C and protein S – practical experience in genetic analysis of a large patient cohort. *Thromb Haemost* 2012;108:247-57.
19. Fischer R, Sachs UJ, Heidinger KS, Eisenburger D, Kemkes-Matthes B. Prevalence of hereditary antithrombin mutations is higher than estimated in patients with thrombotic events. *Blood Coagul*

- Fibrinolysis 2013;24:444-8.
20. Finazzi G, Caccia R, Barbui T. Different prevalence of thromboembolism in the subtypes of congenital antithrombin III deficiency: review of 404 cases. *Thromb Haemost* 1987;18:1094.
  21. Luxembourg B, Pavlova A, Geisen C, Spannagl M, Bergmann F, Krause M, Alesci S, Seifried E, Lindhoff-Last E. Impact of the type of SERPINC1 mutation and subtype of antithrombin deficiency on the thrombotic phenotype in hereditary antithrombin deficiency. *Thromb Haemost* 2014;111:249-57.
  22. Mackie I, Cooper P, Lawrie A, Kitchen S, Gray E, Laffan M, on behalf of British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the laboratory aspects of assays used in haemostasis and thrombosis. *Int J Lab Hematol*. 2013;35:1-13. doi: 10.1111/ijlh.12004.
  23. Demers C, Henderson P, Blajchman MA, Wells MJ, Mitchell L, Johnston M, Ofosu FA, Fernandez-Rachubinski F, Andrew M, Hirsch J, Ginsberg JS. An antithrombin III assay based on Factor Xa inhibition provides a more reliable test to identify congenital antithrombin III deficiency than an assay based on thrombin inhibition. *Thromb Haemost* 1993;69:231-5.
  24. Cooper PC, Coath F, Daly ME, Makris M. The phenotypic and genetic assessment of antithrombin deficiency. *Int Jnl Lab Hem* 2011;33:227-37.
  25. Harper PL, Daly M, Price J, Edgar PF, Carrell RW. Screening for heparin binding variants of antithrombin. *J Clin Pathol* 1991;44:477-9.
  26. Perry DJ, Daly ME, Harper PL, Tait RC, Price J, Walker ID, Carrell RW. Antithrombin Cambridge II 384 Ala to Ser. Further evidence of the role of the reactive centre loop in the inhibitory function of the serpins. *FEBS Letts* 1991;285:248-50.
  27. Ungerstedt JS, Schulman S, Egberg N, Antovic J, Blombäck M. Discrepancy between antithrombin activity methods revealed in Antithrombin Stockholm: do factor Xa-based methods overestimate antithrombin activity in some patients? *Blood* 2002;99:2271-2.
  28. Tripodi A. A review of the clinical and diagnostic utility of laboratory tests for the detection of congenital thrombophilia. *Semin Thromb Hemost* 2005;31:25-32.
  29. Gräsbeck R. The evolution of the reference value concept. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:692-7.
  30. Abildgaard U, Lie M, Ødegård OR. Antithrombin (Heparin Cofactor) assay with "new" chromogenic substrates (S-2238 and Chromozym TH). *Thromb Res* 1977;11:549-53.
  31. Bauer KA, Teitel JM, Rosenberg RD. Assays for the quantitation of Antithrombin III Thrombin-Antithrombin complex and Prothrombin activation fragments. In "Disorders of thrombin formation" (RW Colman, ed.). Churchill Livingstone, Edinburgh and London, 1983.
  32. Laurell CB. Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gels containing antibodies. *Analytical Biochem* 1966;15:45-52.
  33. Monthey JF, Wallace EG, Allen DM. A non-barbital buffer for immunoelectrophoresis and zone electrophoresis in agarose gels. *Clin Chem* 1978;24:1825-7.
  34. Sas G, Pepper DS, Cash JD. Plasma and serum Antithrombin-III: differentiation by crossed immunoelectrophoresis. *Thromb Res* 1975;6:87-91.
  35. Jochmans K, Lissen W, Vervoort R, Peeters S, De Waele M, Liebaers I. Antithrombin-Gly 424 Arg: a novel point mutation responsible for type 1 antithrombin deficiency and neonatal thrombosis. *Blood* 1994;83:146-51.
  36. Geffré A, Concordet D, Braun JP, Trumel C. Reference Value Advisor: a new freeware set of macroinstructions to calculate reference intervals with Microsoft Excel. *Vet Clin Pathol*. 2011; 40:107-12.

37. Chowdhury V, Olds RJ, Lane DA, Conard J, Pabinger I, Ryan K, Bauer KA, Bhavnani M, Abildgaard U, Finazzi G. Identification of nine novel mutations in type I antithrombin deficiency by heteroduplex screening. *B J Haematol* ,1993;84:656-61.
38. Kovács B, Bereczky Z, Oláh Z, Gindele R, Kerényi A, Selmeczi A, Boda Z, Muszbek L. The superiority of anti-FXa assay over anti-FIIa assay in detecting heparin-binding site antithrombin deficiency. *Am J Clin Pathol* 2013;140:675-9.
39. Heylen O, Orlando C, Jochmans K. Challenges in the diagnosis of type II antithrombin deficiency with heparin-binding site defects. XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Poster PB 4.72-2.
40. Luxembourg B, Delev D, Geisen C, Spannagl M, Krause M, Miesbach W, Heller C, Bergmann F, Schmeink U, Grossmann R, Lindhoff-Last E, Seifried E, Oldenburg J, Pavlova A. Molecular basis of antithrombin deficiency. *Thromb Haemost* 2011;105:635-46.
41. Antón AI, Teruel R, Corral J, Miñano A, Martínez-Martínez I, Ordóñez A, Vicente Vicente, Sánchez-Vega B. Functional consequences of the prothrombotic SERPINC1 rs2227589 polymorphism on antithrombin levels. *Haematologica* 2009;94:589-92.
42. De la Morena-Barrio ME, Antón AI, Martínez-Martínez I, Padilla J, Miñano A, Navarro-Fernández J, Águila S, López MF, Fontcuberta J, Vicente Vicente, Corral J. Regulatory regions of SERPINC1 gene: identification of the first mutation associated with antithrombin deficiency. *Thromb Haemost* 2012;107:430-7.
43. De la Morena-Barrio ME, Buil A, Antón AI, Martínez-Martínez I, Miñano A, Gutiérrez-Gallego R, Navarro-Fernández J, Águila S, Souto JC, Vicente Vicente, Soria JM, Corral J. Identification of antithrombin-modulating genes. Role of LARGE, a gene encoding a bifunctional glycosyltransferase, in the secretion of proteins? *PlosOne* 2013;8:e64998.
44. Merz M, Böhm-Weigert M, Braun S, Cooper PC, Fischer R, Hickey K, Steffan A, Kemkes-Matthes B, Kitchen S. Clinical multicenter evaluation of a new FXa-based antithrombin assay. *Int Jnl Lab Hem* 2011;33:498-506.
45. Javela K, Engelbarth S, Hiltunen L, Mustonen P, Puurunen M. Great discrepancy in antithrombin activity measured using five commercially available functional assays. *Throm Res* 2013;132:132-7.
46. Águila S, Martínez-Martínez I, Collado M, Llamas P, Antón AI, Martínez-Redondo C, Padilla J, Miñano A, de la Morena-Barrio ME, García-Avello A, Vicente Vicente, Soria JM, Corral J. Compound heterozygosity involving Antithrombin Cambridge II (p.Ala416Ser) in antithrombin deficiency. *Thromb Haemost* 2013;109:556-8.