

# Prepoznavanje dedno znižane aktivnosti antitrombina – ena metoda za vse?

## *Diagnosis of hereditary decreased antithrombin activity – one method for all?*

Tamara Rojnik<sup>1</sup>, Mojca Božič Mijovski<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični oddelek za žilne bolezni, Laboratorij za hemostazo in aterotrombozo

<sup>2</sup>Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo

Avtor za korespondenco:

**Tamara Rojnik, mag. lab. biomed.**

Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični oddelek za žilne bolezni, Laboratorij za hemostazo in aterotrombozo, Zaloška 7, 1000 Ljubljana, Slovenija,  
e-pošta: tamara.rojnik@kclj.si

### POVZETEK

Dedno znižana aktivnost antitrombina izmed vseh dednih dejavnikov predstavlja največje tveganje za tromboembolični dogodek. Veliko število različic antitrombina zaradi prisotnosti sprememb v genu *SERPINC1* predstavlja izziv za diagnostiko dedno znižane aktivnosti antitrombina, saj se občutljivost metod za merjenje njegove aktivnosti razlikuje glede na posamezne različice AT. Tako postaja pri odkrivanju dedno znižane aktivnosti antitrombina vedno bolj zaželeno uporaba molekularno genetskih metod. Slednje omogočajo enostavnejšo določitev tipa dedno znižane aktivnosti antitrombina ali genetske spremembe, kar lahko vpliva na odločitev o zdravljenju teh bolnikov. Poznavanje genetskega ozadja dedno znižane aktivnosti antitrombina v populaciji je ključno pri oblikovanju optimalnega diagnostičnega algoritma, ki bi vključeval tako metode za merjenje aktivnosti antitrombina kot tudi molekularno genetske metode.

**Ključne besede:** dedno znižana aktivnost antitrombina, različice antitrombina, funkcijske preiskave, molekularno genetske metode

### ABSTRACT

Hereditary decreased antithrombin activity is the most severe type of thrombophilia, since it poses the greatest risk of venous thromboembolism. Large number of antithrombin variants caused by alterations in *SERPINC1* gene make the diagnosis of hereditary decreased antithrombin activity challenging due to different diagnostic sensitivity of antithrombin activity assays to antithrombin variants. Thus, the use of molecular genetic methods in the detection of hereditary decreased antithrombin activity has recently increased as they enable easier determination of the type of hereditary decreased antithrombin activity or specific genetic variant, which may influence the decisions on the therapeutic approach. Information about genetic background of hereditary decreased antithrombin activity in the population is crucial in designing an optimal diagnostic algorithm that would include functional as well as molecular genetic methods.

**Key words:** hereditary decreased antithrombin activity, antithrombin variants, functional methods, molecular genetic methods



## UVOD

Antitrombin (AT) je najpomembnejši endogeni antikoagulant, saj zavira delovanje koagulacijskih faktorjev FXa in trombina (FIIa), ki sta ključni serinski proteazi v končnih stopnjah koagulacijske kaskade (1). Antikoagulacijska aktivnost AT je v prisotnosti heparina oz. heparinu podobnih molekul močno povečana. Zaradi pomembne vloge v hemostazi ne preseneča, da dedno znižana aktivnost AT predstavlja najhujšo obliko dedne trombofilije (tj. povečane nagnjenosti k trombozam), saj povzroči hiperkoagulabilno stanje, ki znatno zveča tveganje za vensko tromboembolijo (VTE). En do pet odstotkov bolnikov z VTE ima dedno znižano aktivnost AT, medtem ko je incidenca v splošni populaciji ocenjena na 0,02–0,2 % (2).

V večini primerov je dedno znižana aktivnost AT posledica zarodne genetske spremembe v genu za AT *SERPINC1*, ki se deduje avtosomno dominantno (3). Trenutno je v Bazi podatkov genskih mutacij človeškega genoma (HGMD, angl. *Human Gene Mutation Database*) opisanih 483 sprememb gena *SERPINC1* (4). Nesmiselne genetske spremembe, genetske spremembe s premikom bralnega okvirja, velike genetske spremembe in genetske spremembe z vplivom na izrezovanje intronov so povezane s kvantitativnim pomanjkanjem AT (tip I), pri katerem pride do zmanjšane nastajanja proteina. Najpogostejše pa so drugačnosmiselne spremembe, ki največkrat povzročijo kvalitativno pomanjkanje AT (tip II), za katerega sta značilni normalna koncentracija in znižana aktivnost proteina v plazmi. Genetske spremembe tipa II lahko: (i) okvarijo aktivni center AT in s tem ovirajo vezavo AT na substrat (genetske spremembe tipa IIRS, angl. *reactive site*), (ii) okvarijo vezavno mesto za heparin (genetske spremembe tipa IIHBS, angl. *heparin binding site*) in s tem oslabijo vezavo heparina, ali pa (iii) vplivajo na oboje (genetske spremembe tipa IIPE, angl. *pleiotropic effect*) (1). Večina genetskih sprememb tipa I se pojavlja le v posameznih družinah, medtem ko so nekatere genetske spremembe tipa II v določenih evropskih populacijah bolj pogoste, kot npr. AT Cambridge II (p.Ala384Ser) na Škotskem in v Španiji, AT Budapest III (p.Leu131Phe) na Madžarskem in AT Basel (p.Pro73Leu) na Finskem, pri čemer zadnji dve veljata za t. i. mutaciji ustanovitelja (angl. *founder mutation*) (2).

Takšna kategorizacija je pomembna, saj se klinična slika med tipi dedno znižane aktivnosti AT razlikuje in je fenotip lahko odvisen od posamezne genetske spremembe celo

znotraj istega tipa dedno znižane aktivnosti AT. Dedno znižana aktivnost AT tipa I prevladuje med simptomatskimi bolniki, saj predstavlja visoko tveganje za VTE. Za dedno znižano aktivnost AT tipa II pa je značilna večja klinična heterogenost. Genetske spremembe tipa IIRS in IIPE so po navadi povezane s hudo obliko bolezni, ki je primerljiva s tipom I. Po drugi strani pa tip IIHBS, ki velja za najpogostejšo obliko dedno znižane aktivnosti AT, predstavlja najmanjše tveganje za VTE, a večje za arterijsko trombozo v primerjavi z drugimi tipi dedno znižane aktivnosti AT. Čeprav homozigotna oblika dedno znižane aktivnosti AT tipa IIHBS ni letalna, pa homozigoti doživijo trombotični dogodek v zgodnejšem obdobju, pogostejši so tudi zapleti v nosečnosti in pojav tromboze na neobičajnih mestih (5–9).

Danes dedno znižano aktivnost AT prepoznavamo s funkcijskimi preiskavami, saj je aktivnost zmanjšana pri obeh tipih dedno znižane aktivnosti AT. Funkcijske preiskave temeljijo na merjenju plazemske aktivnosti AT v prisotnosti heparina posredno preko zaviranja FXa oz. trombina (FIIa), ki ga dodamo v presežku. Po dodatku za FXa ali FIIa specifičnega kromogenega substrata je izmerjena absorbanca obratno sorazmerna aktivnosti AT. O dedno znižani aktivnosti AT govorimo, ko je aktivnost približno 70 % aktivnosti AT pri zdravi odrasli populaciji ali nižja (2). Na voljo je več komercialnih različic funkcijske preiskave za spremljanje aktivnosti AT, ki se izvajajo na avtomatiziranih analizatorjih, in se poleg samega encima (FXa ali FIIa) razlikujejo tudi v njegovem izvoru (humani ali goveji), koncentraciji heparina, vrsti kromogenega substrata, redčitvi vzorca, inkubacijskem času in pufru (10). Občutljivost teh metod je za posamezne različice AT različna (11–16), kar otežuje diagnostiko dedno znižane aktivnosti AT in zaradi neustrezne obravnave lahko vodi do večjega tveganja za nastanek ali ponovitev VTE. Metode za merjenje aktivnosti AT preko FIIa naj bi bile občutljivejše na različice AT tipa IIRS, medtem ko naj bi bile nekatere metode za merjenje aktivnosti preko FIIa oz. FXa bolj uspešne kot druge pri odkrivanju dedno znižane aktivnosti tipa IIHBS, odvisno od posamezne genetske spremembe (2).

Zaradi številnih različic AT optimizacija ene funkcijske metode za vse različice AT v praksi ni možna. Zato se je vpeljava molekularno genetskih metod v diagnostiko dedno znižane aktivnosti AT zdela primerna rešitev za iz- »

boljšanje občutljivosti njenega odkrivanja. Poleg tega lahko klinično sliko bolje predvidimo na podlagi genotipa v primerjavi z izmerjeno aktivnostjo AT, saj ta ne sovпада vedno s tveganjem za VTE. Vendar pa tudi z molekularno genetskimi metodami ne moremo odkriti vseh bolnikov z dedno znižano aktivnostjo AT, bodisi zaradi omejitev molekularno genetskih metod, bodisi zaradi tega, ker so v znižano aktivnost AT vpleteni še drugi geni (1). Tako se je

pojaval predlog o vpeljavi algoritma za odkrivanje dedno znižane aktivnosti AT, ki vključuje funkcijske, imunske in molekularno genetske metode (1, 3, 17). Ta algoritem bi omogočal zanesljivo prepoznavanje bolnikov z dedno znižano aktivnostjo AT in opredelitev njenega tipa oz. genetske spremembe, s čimer odpira vrata za bolniku prilagojeno laboratorijsko medicino na tem področju.

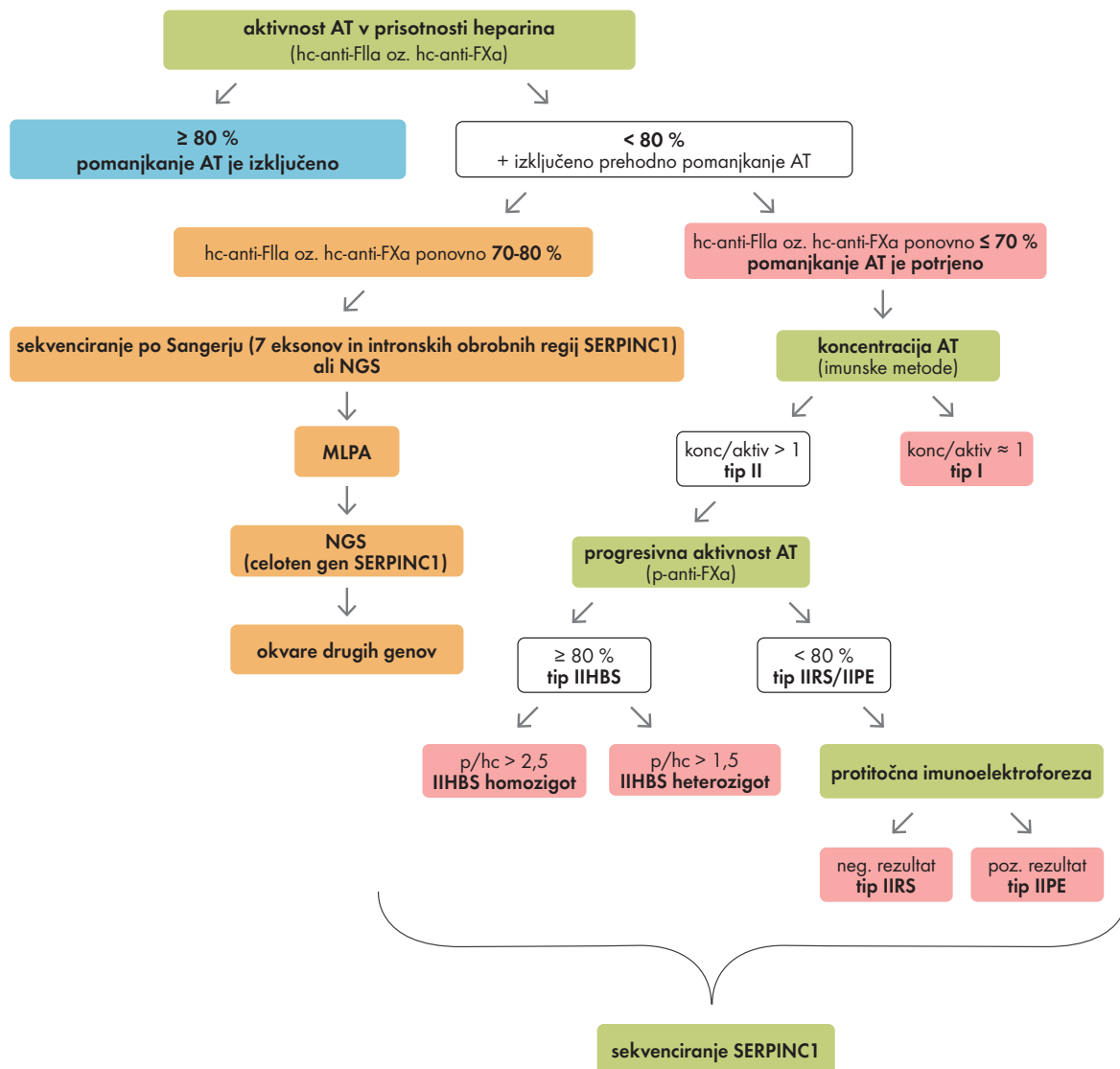
## PREDLOG ALGORITMA ZA ODKRIVANJE DEDNO ZNIŽANE AKTIVNOSTI ANTITROMBINA

V okviru predlaganega algoritma (Slika 1) je najprej treba ugotoviti, ali je aktivnost AT dedno znižana. Ta je potrjena, ko z eno od funkcijskih metod izmerimo znižano aktivnost AT v dveh časovno ločeno odvzetih vzorcih krvi. Sledi opredelitev tipa dedno znižane aktivnosti AT na podlagi razmerja med koncentracijo in aktivnostjo AT. Pri tipu I je razmerje blizu 1, pri tipu II pa nad 1. V primeru tipa II sledi določitev progresivne aktivnosti AT, pri kateri merimo aktivnost AT v odsotnosti heparina ob daljšem inkubacijskem času, s čimer lahko odkrijemo nosilce genetske spremembe tipa IIHBS, ki imajo z izjemo homozigotov in nekaterih genetskih sprememb (npr. AT Budapest III) najmanjše tveganje za VTE v primerjavi z nosilci drugih tipov genetskih sprememb (1, 3, 17). Pri nosilcih genetske spremembe tipa IIHBS je progresivna aktivnost AT normalna za razliko od nosilcev ostalih tipov dedno znižane aktivnosti AT, zato je razmerje med progresivno aktivnostjo AT in aktivnostjo AT v prisotnosti heparina pri nosilcih genetske spremembe tipa IIHBS povišano, najvišje je pri homozigotih (18). S protitočno imunoelektroforezo lahko ločimo med oblikami AT z visoko in nizko afiniteto do heparina in je tako primerna za razlikovanje med nosilci genetske spremembe tipa IIRS in IIPE, kjer normalna afiniteta do heparina kaže genetsko spremembo tipa IIRS. Ta metoda se danes uporablja skoraj izključno v raziskovalne namene, saj se tveganje za VTE z izjemo nekaterih genetskih sprememb (npr. AT Cambridge II) med opisanima tipoma dedno znižane aktivnosti AT ne razlikuje bistveno (1, 3, 17). Za določitev specifične genetske spremembe je treba določiti nukleotidno zaporedje gena *SERPINC1*. Kadar analize kažejo prisotnost genetske spremembe tipa I, je potrebna določitev nukleotidnega za-

poredja celotnega gena, saj se genetske spremembe tipa I lahko pojavljajo na različnih mestih v genu. Po drugi strani pa lahko genetske spremembe tipa II iščemo bolj ciljano. Genetske spremembe tipa IIHBS se po navadi nahajajo na eksonu 2 in 3, medtem ko spremembe tipa IIRS in IIPE najdemo na eksonu 7 (19). V primeru mejne aktivnosti AT (70–80 %) in kadar na podlagi klinične slike bolnika pomislimo na dedno znižano aktivnosti AT, je priporočljivo sekvenciranje po Sangerju vseh sedmih eksonov in intronskih obrobnihih regij ali pa določitev nukleotidnega zaporedja z uporabo metod sekvenciranja nove generacije (NGS). Pomanjkljivost trenutnih metod sekvenciranja je težavno odkrivanje večjih genetskih sprememb (npr. duplikacija celotnega eksona, delecija introna). Zato lahko v primeru negativnega rezultata s sekvenciranjem uporabimo metodo MLPA (angl. *Multiple Ligand Probe Amplification*), ki omogoča odkritje dodatnih 2–5 % primerov z dedno znižano aktivnostjo AT, ki imajo eno od poznanih večjih genetskih sprememb *SERPINC1*. S sekvenciranjem celotnega gena lahko odkrijemo nekaj dodatnih genetskih sprememb v regulatornih sekvencah (npr. v promotorju). Glede na ocene bi lahko opisani algoritem pomagal odkriti bolnike z dedno znižano aktivnostjo AT v približno 85 %. Dedno znižana aktivnost AT je namreč lahko tudi posledica okvar drugih genov, ki sodelujejo pri prepisovanju gena *SERPINC1*, epigenetski regulaciji, zvišanju proteina, posttranslacijskih modifikacijah ali odstranjevanju AT iz sistema. Pri petih odstotkih ljudi z dedno znižano aktivnostjo AT lahko najdemo genetske spremembe v genih, ki kodirajo proteine, pomembne za N-glikozilacijo AT (1, 3, 17).

»

Slika 1: Diagnostični algoritem odkrivanja dedno znižane aktivnosti AT (povzeto po (1, 3, 17)).  
 Figure 1: Diagnostic algorithm for hereditary decreased AT activity (summarized from (1, 3, 17)).



*hc-anti-FIIa*, preiskava za merjenje aktivnosti antitrombina v prisotnosti heparina, ki temelji na zaviranju trombina (angl. *Heparin cofactor antithrombin assay based on thrombin inhibition*);

*hc-anti-FXa*, preiskava za merjenje aktivnosti antitrombina v prisotnosti heparina, ki temelji na zaviranju FXa (angl. *Heparin cofactor AT assay based on FXa inhibition*);

*p-anti-FXa*, preiskava za določitev progresivne aktivnosti antitrombina (angl. *progressive antithrombin activity assay*);

*MLPA*, od ligacije odvisno hkratno pomnoževanje sond (angl. *Multiple Ligand Probe Amplification*);

*NGS*, sekvenciranje nove generacije (angl. *Next-generation sequencing*);

*konc/aktiv*, razmerje med koncentracijo in aktivnostjo antitrombina, določeno s preiskavo za merjenje aktivnosti antitrombina v prisotnosti heparina;

*p/hc*, razmerje med progresivno aktivnostjo antitrombina in aktivnostjo antitrombina v prisotnosti heparina »

## RAZPRAVA

Odkrivanje dedno znižane aktivnosti AT v Sloveniji izvajajo le v nekaterih specializiranih diagnostičnih laboratorijih, kjer uporabljajo eno izmed komercialnih funkcijskih preiskav. Glede na nova spoznanja o dedno znižani aktivnosti AT ugotavljamo, da s trenutnim diagnostičnim pristopom ne moremo prepoznati vseh bolnikov. Z razvojem tehnologije in večjo cenovno dostopnostjo genetskih preiskav bi morda ta vidik diagnostike lahko izboljšali. V prispevku predlagamo uporabo algoritma, ki vključuje tako funkcijske kot genetske preiskave. Njegovo uporabnost bo treba preizkusiti v klinični praksi in tako ugotoviti, koliko dodatnih bolnikov z dedno znižano aktivnostjo AT lahko na ta način še prepoznamo. Oceniti bo treba tudi stroškovno učinkovitost takega algoritma, ki se lahko zaradi vključitve velikega števila različnih metod pomembno poslabša. Po mnenju nekaterih strokovnjakov bi morala diagnostika dedno znižane aktivnosti AT sloneti na molekularno genetskih metodah (17). Te so trenutno na voljo le v specializiranih laboratorijih in so namenjene predvsem potrditvi dedno znižane aktivnosti AT. V klinični praksi se genska analiza še ne uporablja zaradi velike razpršenosti možnih mest genetskih sprememb, kar zahteva sekvenciranje celotnega gena, vendar pa sekvenciranje postaja vedno bolj cenovno ugodno. Glavna prednost molekularno genetskih metod pred funkcijskimi je, da omogočajo odkritje patoloških različic AT, ki jih s funkcijskimi preiskavami ne moremo zanesljivo odkriti, bodisi ker so slabše občutljive (kot je to v primeru AT Cambridge II in AT Budapest III) bodisi se patogeni značaj genetske spremembe izrazi samo v določenih okoliščinah, kot je npr. povišana telesna temperatura in nosečnost (AT Dublin, AT Wibble, AT Rouen VI) (2). Čeprav izmerjena aktivnost AT praviloma korelira s tveganjem za VTE (20), pa ravno zaradi slabše občutljivosti funkcijskih metod na določene genetske spremembe AT obstajajo izjeme (11–16). Samo z molekularno genetskimi metodami lahko določimo specifično genetsko spremembo in z gotovostjo odkrijemo homozigotne oblike pomanjkanja. Nenazadnje sekvenciranje za razliko od funkcijskih preiskav omogoča analizo v času akutne faze in antikoagulantnega zdravljenja.

Kljub obetavnosti molekularno genetskih metod se moramo zavedati njihovih pomanjklivosti: zahtevajo drago opremo, posebej usposobljen kader in, kar je najpomembnejše, pri določenem odstotku bolnikov z dedno zmanjšano aktivnostjo AT ne odkrijejo nobene genetske spremembe v *SERPINC1*. Delno so za to krive omejitve metod sekvenciranja pri odkrivanju večjih genetskih sprememb. Po drugi strani pa dedno znižana aktivnost AT ni vedno monogenetska bolezen, saj so v znižano aktivnost AT lahko vpleteni še drugi geni (1). Njihov vpliv na aktivnost AT pa uspešno odkrijemo s funkcijskimi preiskavami. Funkcijske preiskave so prav tako nepogrešljive v kliničnih laboratorijih pri spremljanju zdravljenja z zaviralci FXa in odkrivanju prehodno znižane aktivnosti AT.

Menimo, da so tako molekularno genetske kot funkcijske metode pomembne pri odkrivanju dedno znižane aktivnosti AT. Vendar pa bi bilo pri oblikovanju stroškovno najučinkovitejšega diagnostičnega algoritma njihovo uporabo smiselno prilagoditi genetskemu ozadju populacije, saj se zastopanost določenih genetskih sprememb glede na geografsko območje razlikuje (7, 9, 11, 13, 14).

Določitev tipa dedno znižane aktivnosti AT ali genetske spremembe bi lahko služila kot osnova za bolniku prilagojeno zdravljenje, saj bi na podlagi genetske spremembe lahko bolje napovedali potek bolezni in prilagodili zdravljenje. Navedene ugotovitve in predlogi sicer temeljijo na rezultatih kohortnih raziskav, v katerih so primerjali klinične slike med posameznimi tipi dedno znižane aktivnosti AT (5–9). Zato bi za potrditev povezave med tipom dedno znižane aktivnosti AT ali genetsko spremembo in pogostostjo trombotičnih dogodkov bile potrebne velike multicentrične študije. Na podlagi izsledkov bi nato lahko sklepali o potrebnosti antikoagulantnega zdravljenja pri bolnikih z določenim tipom dedno znižane aktivnosti AT. Tip dedno znižane aktivnosti AT bi tako lahko vključili med ostale dejavnike, kot je vrsta trombotičnega dogodka (sprožen/neprožen), družinska anamneza in zdravstveno stanje ter želje bolnika, na podlagi katerih trenutno temelji odločitev o vrsti in trajanju zdravljenja. »

## ZAKLJUČEK

Diagnostični pristop za odkrivanje dedno znižane aktivnosti AT je v trenutni klinični praksi pomanjkljiv. Pričakuje mo, da bomo s pomočjo kombinacije funkcijskih in genet-

skih preiskav prepoznali pomembno več bolnikov, in da bodo le-ti s poznavanjem genetskega ozadja svoje bolezni lahko ustreznejše zdravstveno obravnavani.

## LITERATURA

1. Corral J, de la Morena-Barrio ME, Vicente V. The genetics of antithrombin. *Thromb Res.* 2018;169:23-9.
2. Van Cott EM, Orlando C, Moore GW, Cooper PC, Meijer P, Marlar R. Recommendations for clinical laboratory testing for antithrombin deficiency; Communication from the SSC of the ISTH. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH.* 2020; 18(1): 17-22.
3. Bravo-Perez C, Vicente V, Corral J. Management of antithrombin deficiency: an update for clinicians. *Expert Rev Hematol.* 2019;12(6):397-405.
4. The Human Gene Mutation Database. Available from: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=SERPINC>
5. Alhenc-Gelas M, Plu-Bureau G, Hugon-Rodin J, Picard V, Horellou MH, Thrombophilia GsgoG. Thrombotic risk according to SERPINC1 genotype in a large cohort of subjects with antithrombin inherited deficiency. *Thromb Haemost.* 2017;117(6):1040-51.
6. Luxembourg B, Pavlova A, Geisen C, Spannagl M, Bergmann F, Krause M, et al. Impact of the type of SERPINC1 mutation and subtype of antithrombin deficiency on the thrombotic phenotype in hereditary antithrombin deficiency. *Thromb Haemost.* 2014;111(2):249-57.
7. Castaldo G, Cerbone AM, Guida A, Tandurella I, Ingino R, Tufano A, et al. Molecular analysis and genotype-phenotype correlation in patients with antithrombin deficiency from Southern Italy. *Thromb Haemost.* 2012;107(4):673-80.
8. Croles FN, Borjas-Howard J, Nasserinejad K, Leebeck FWG, Meijer K. Risk of Venous Thrombosis in Antithrombin Deficiency: A Systematic Review and Bayesian Meta-analysis. *Semin Thromb Hemost.* 2018;44(4):315-26.
9. Gindele R, Selmeczi A, Olah Z, Ilonczai P, Pfliegler G, Marjan E, et al. Clinical and laboratory characteristics of antithrombin deficiencies: A large cohort study from a single diagnostic center. *Thromb Res.* 2017;160:119-28.
10. Berczky Z, Gindele R, Speker M, Kallai J. Deficiencies of the Natural Anticoagulants - Novel Clinical Laboratory Aspects of Thrombophilia Testing. *EJIFCC.* 2016;27(2):130-46.
11. Puurunen M, Salo P, Engelbarth S, Javela K, Perola M. Type II antithrombin deficiency caused by a founder mutation Pro73Leu in the Finnish population: clinical picture. *J Thromb Haemost.* 2013;11(10):1844-9.
12. Sanchez C, Alessi MC, Saut N, Aillaud MF, Morange PE. Relation between the antithrombin Cambridge II mutation, the risk of venous thrombosis, and the endogenous thrombin generation. *J Thromb Haemost.* 2008;6(11):1975-7.
13. Navarro-Fernandez J, de la Morena-Barrio ME, Padilla J, Minano A, Bohdan N, Aguila S, et al. Antithrombin Dublin (p.Val30Glu): a relatively common variant with moderate thrombosis risk of causing transient antithrombin deficiency. *Thromb Haemost.* 2016;116(1):146-54.
14. Orlando C, Heylen O, Lissens W, Jochmans K. Antithrombin heparin binding site deficiency: A challenging diagnosis of a not so benign thrombophilia. *Thromb Res.* 2015;135(6):1179-85.
15. Javela K, Engelbarth S, Hiltunen L, Mustonen P, Puurunen M. Great discrepancy in antithrombin activity measured using five commercially available functional assays. *Thromb Res.* 2013;132(1):132-7.
16. Kovacs B, Berczky Z, Olah Z, Gindele R, Kerenyi A, Selmeczi A, et al. The superiority of anti-FXa assay over anti-FIIa assay in detecting heparin-binding site antithrombin deficiency. *Am J Clin Pathol.* 2013;140(5):675-9.
17. Bravo-Pérez C, De la Morena-Barrio ME, Vicente V, Corral J. Antithrombin deficiency as a still underdiagnosed thrombophilia: a primer for internists. *Pol Arch Intern Med.* 2020; 130(10):868-877.
18. Kovacs B, Berczky Z, Selmeczi A, Gindele R, Olah Z, Kerenyi A, et al. Progressive chromogenic anti-factor Xa assay and its use in the classification of antithrombin deficiencies. *Clin Chem Lab Med.* 2014;52(12):1797-806.
19. Cooper PC, Coath F, Daly ME, Makris M. The phenotypic and genetic assessment of antithrombin deficiency. *Int J Lab Hematol.* 2011;33(3):227-37.
20. Sokol J, Timp JF, Le Cessie S, Van Hylckama-Vlieg A, Rosendaal FR, Kubisz P, et al. Mild antithrombin deficiency and risk of recurrent venous thromboembolism: results from the MEGA follow-up study. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH.* 2018; 16(4): 680-8.