



ASSOCIAZIONE ITALIANA CENTRI EMOFILIA

RICERCA E TITOLAZIONE DEGLI INIBITORI ANTI FVIII E FIX

**A CURA DEL GRUPPO DI LAVORO QUALITÀ DEI
LABORATORI DELL'AICE**

Autori: Tiziano Martini, Angelo Claudio Molinari, Alberto Catalano, Laura Contino, Raimondo De Cristofaro, Augusto B. Federici, Marina Marchetti, Ilaria Quaglia, Rossana Rossi, Armando Tripodi, Alessandra Valpreda, Rita Carlotta Santoro.

EDIZIONE 2024

RICERCA E TITOLAZIONE DEGLI INIBITORI ANTI FVIII E FIX

INTRODUZIONE

La complicità più temibile della terapia sostitutiva dell'emofilia A e B è lo sviluppo di anticorpi inibitori diretti contro il fattore VIII o IX esogeno somministrato; questi alloanticorpi (detti "inibitori") sono in grado di inattivare il fattore infuso, riducendo oppure abolendo del tutto l'efficacia del trattamento sostitutivo [1]. L'inefficacia della terapia con concentrato di fattore può determinare un aumento dell'incidenza di sanguinamenti e di danno articolare, con conseguente compromissione della qualità di vita del paziente [2];

Il rischio a lungo termine di sviluppo di inibitore è del 25-30% per i pazienti con emofilia A e del 3-5% per i pazienti con emofilia B [3]; la suscettibilità allo sviluppo dell'inibitore dipende da fattori propri del paziente (gravità dell'emofilia, etnia, familiarità per inibitore, mutazione causativa del difetto coagulativo ecc.) e da fattori correlati alla terapia sostitutiva (giorni di esposizione, trattamento intensivo, ecc.) [1]. Il monitoraggio per lo sviluppo di inibitore del paziente emofilico in trattamento sostitutivo è pertanto raccomandato (alla luce delle linee guida internazionali più aggiornate) con regolare cadenza [4,5].

La ricerca e la misurazione dell'inibitore rappresentano ancora oggi una sfida per il laboratorio di emostasi.

I test disponibili per individuare la presenza di inibitori sono:

- **aPTT TEST DI MISCELA**, che può essere considerato un primo test di screening;
- **TEST FUNZIONALI**, che consentono di quantificare l'attività inibente dell'anticorpo. Rientrano in questa categoria i metodi Bethesda e Nijmegen, considerati i test cardine per la ricerca dell'inibitore;
- **TEST IMMUNOLOGICI**, che possono rilevare sia anticorpi neutralizzanti l'attività del fattore che non neutralizzanti (e pertanto da utilizzare anch'essi principalmente come test di screening).

TEST DI MISCELA PER APTT

Il test di miscela è un test di screening rapido e semplice per indagare la presenza di un inibitore in un plasma che presenta un allungamento del tempo di tromboplastina parziale attivata (aPTT) e quindi anche in quello di un paziente emofilico [6]: la mancata correzione del prolungamento dell'aPTT nel test di miscela con plasma normale è indice della presenza di un inibitore.

Per quanto concerne l'utilizzo e l'interpretazione del test di miscela nell'ambito della ricerca degli inibitori dei pazienti emofilici, occorre tener presente che gli inibitori anti-FVIII (come descritto nel prossimo paragrafo) esercitano un'inibizione che è tempo e temperatura dipendente e che si traduce in una iniziale correzione (o parziale correzione) della miscela, con un prolungamento dopo incubazione della miscela per 2 ore a 37°C; al contrario gli inibitori anti-FIX (così come l'anticoagulante lupico) hanno un'azione inibitoria immediata, che si traduce in un aPTT nella miscela che risulta immediatamente non corretto [7,8].

Per la descrizione e l'interpretazione del test si rimanda allo specifico documento AICE pubblicato nel 2022 [9].

TEST FUNZIONALI

1. Principio

Gli inibitori sviluppati dai pazienti emofilici contro il FVIII esogeno sono generalmente IgG dotate di un pattern lineare di inattivazione (cinetica di 1° ordine); ciò li distingue dagli inibitori dei pazienti con emofilia A acquisita: gli anticorpi prodotti in questo disordine autoimmune sono infatti dotati di una cinetica di 2° ordine, con una inattivazione non lineare del FVIII, caratterizzata da una rapida inibizione iniziale seguita da una fase lenta di equilibrio in cui si osserva una attività residua del FVIII [10].

Non tutti gli anticorpi anti-fattore riscontrati nell'emofilia congenita hanno un'azione inibitoria; la sottoclasse di IgG maggiormente correlata con la funzione inibente è la IgG4 [11,12].

Il primo tentativo di standardizzare la ricerca e la titolazione dell'inibitore è datato 1975, e fu messo a punto durante un meeting a Bethesda, nel Maryland [13]. La modifica del metodo **Bethesda** (Fig 1) secondo Nijmegen è stata introdotta nel 1995 con lo scopo di ridurre l'incidenza di falsi positivi ed incrementare la standardizzazione del test (metodo **Nijmegen**) (Fig 2) [14].

In questo documento la descrizione dei metodi Bethesda e Nijmegen è riferita agli inibitori del FVIII, ma vengono segnalate, per i passaggi in cui sono presenti, le differenze nella procedura per gli inibitori del FIX.

Sia il metodo Bethesda che quello Nijmegen si basano sulla misurazione del FVIII residuo, che si genera a seguito di incubazione prefissata con una fonte di FVIII ad attività nota.

A tale scopo viene realizzata una miscela (**miscela test**) di eguali volumi di:

- **plasma del paziente** opportunamente diluito (una miscela per ogni diluizione)
- **pool di plasma normale (PPN)** come fonte di FVIII; in particolare si usa:
 - a. PPN nel metodo Bethesda
 - b. PPN addizionato con tampone (Imidazolo) nel metodo Nijmegen per minimizzare l'inattivazione aspecifica del FVIII dovuta alla sua termolabilità.

Le miscele test sono incubate a 37°C per 2 ore. Al termine dell'incubazione viene misurata l'attività del FVIII mediante metodo coagulante a uno stadio o cromogenico. L'attività residua del FVIII nella miscela test è poi determinata in comparazione con quella della **miscela di controllo**, trattata e incubata nelle stesse condizioni e su cui analogamente viene misurata l'attività del FVIII. La miscela di controllo è così costituita:

- PPN in rapporto 1:1 con
 - a. tampone imidazolo a PH 7.4 nel metodo Bethesda
 - b. plasma carente di FVIII nel metodo Nijmegen

Le modifiche apportate nel metodo Nijmegen nell'insieme migliorano la stabilità del FVIII durante l'incubazione e ne prevengono una riduzione dell'attività, frutto di un artefatto della metodica che potrebbe essere falsamente interpretata come dovuta alla presenza dell'inibitore [15].

Il metodo Nijmegen è stato raccomandato nel 1998 da ISTH [16] ed è attualmente considerato il gold standard secondo la più recente raccomandazione della WFH [5]

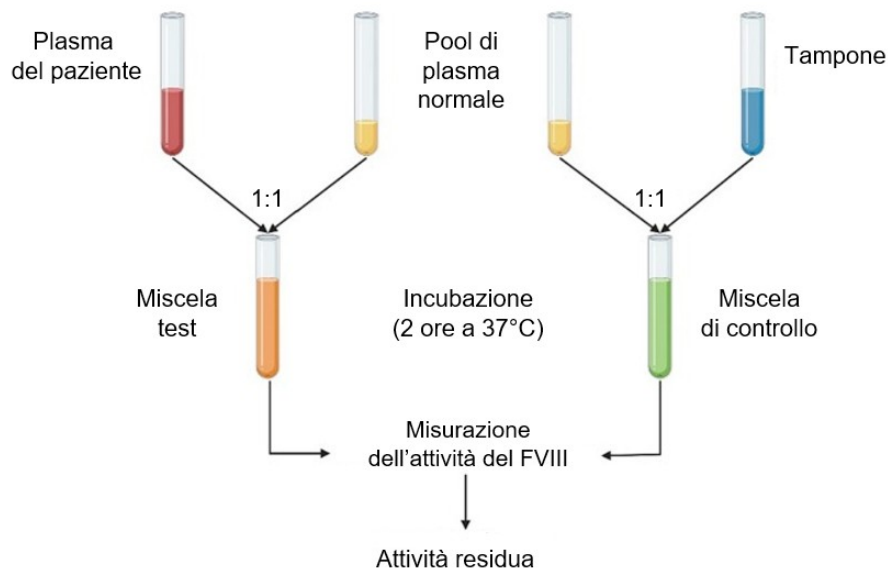


Figura 1: Metodo Bethesda per la misurazione dell'inibitore

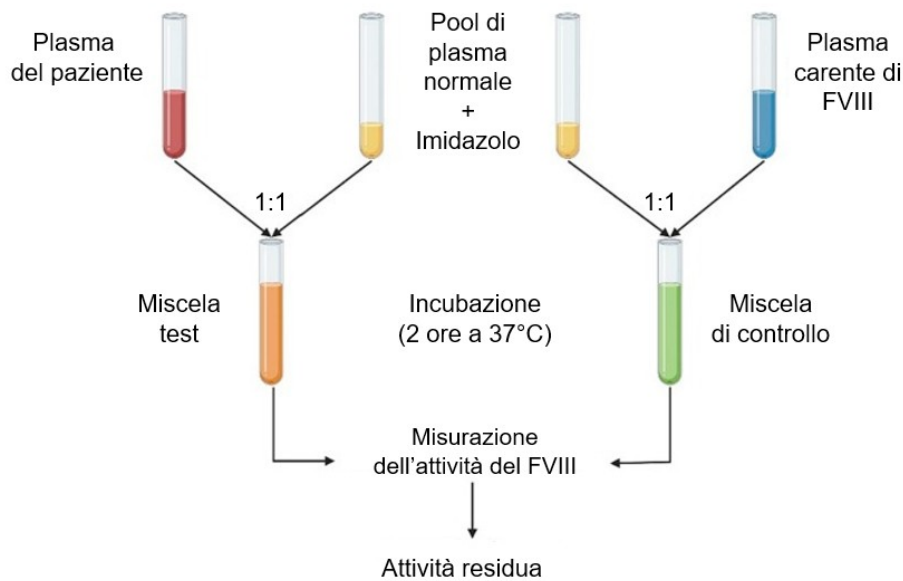


Figura 2: Metodo Nijmegen per la misurazione dell'inibitore

2. Metodo Nijmegen

2.1 Materiali

- 1-1,5 ml di plasma paziente
- bagno termostatico a temperatura regolabile
- pool di plasma normale (PPN) tamponato a PH 7.4 con tampone imidazolo o tampone Hepes.
- plasma carente di FVIII (o di FIX) per la miscela di controllo e per diluire il plasma campione oppure tampone albumina bovina al 4%
- controllo negativo e controllo positivo a titolo noto di inibitore

- reagenti necessari a processare un dosaggio di routine di FVIII (o FIX) con metodo coagulante a uno stadio o metodo cromogenico

Requisiti del campione

- può essere utilizzato sia plasma fresco che congelato
- sul campione devono essere eseguiti PT, aPTT e TT, che possono svelare la presenza di terapie anticoagulanti; in tal modo si evita di allestire il test funzionale su campioni non idonei, che porterebbero ad evidenziare false positività. Una misura dell'attività anti-FX_a può aiutare a svelare la presenza di un DOAC.
- Il campione da sottoporre al test deve essere prelevato, ove possibile, dopo adeguato wash out e comunque sempre prima di una nuova infusione di fattore sostitutivo. In presenza di alte quantità di FVIII, l'inibitore si lega al fattore per adsorbimento e il pretrattamento del campione al calore non assicura la separazione degli immunocomplessi preformati, pertanto il titolo dell'inibitore con metodo Nijmegen può risultare sottostimato o fallire, in particolare nei plasmi con ridotti livelli di inibitore [17].

Requisiti del PPN

Nei test funzionali il PPN è l'elemento principale. Il PPN è infatti utilizzato come sorgente di FVIII che viene miscelata 1:1 con il plasma paziente per valutare l'inattivazione esercitata dall'inibitore presente nel campione. Il test di inibizione è però pH-dipendente; dal momento che il FVIII è termolabile, durante le 2 ore di incubazione delle miscele a 37°C è possibile una perdita di attività del FVIII a causa dell'incremento del pH (inattivazione non specifica) che esita in una possibile sovrastima del livello di inibitore. Per questo motivo il metodo Nijmegen prevede l'uso di un PPN tamponato.

Le caratteristiche fondamentali del PPN nel metodo Nijmegen sono:

- un livello di FVIII più vicino possibile al 100% (1 IU/ml); livelli bassi possono indurre una sovrastima dell'inibitore, livelli alti una sottostima.
- tamponato a pH 7.4; se si usano pool liofilici commerciali è da verificare, da indicazione del produttore, che siano tamponati stabilmente a PH 7.4 una volta ricostituiti. Se si utilizzano PPN preparati in casa è necessario aggiungere il tampone imidazolo alla concentrazione finale di 0,1 M oppure tampone Hepes ed eventualmente aggiustare il pH a 7.4 con l'aggiunta di HCl 1N.

Il FIX invece è meno termolabile e, oltretutto, il test per l'inibitore non prevede un'incubazione lunga come per il FVIII.

Requisiti del plasma carente

Il plasma carente di FVIII viene utilizzato per preparare la miscela di controllo nel test di inibizione (miscelando 1:1 PPN con plasma carente) e per le eventuali diluizioni del plasma paziente.

Il tipo di plasma carente utilizzato influenza i risultati del test per gli inibitori.

Il plasma carente utilizzato per il metodo Nijmegen deve essere:

- congenito o immunodepleto – il carente chimicamente depleto è sconsigliato [18] (il processo di produzione può rilasciare piccole quantità di FV_a che porterebbero nella miscela di controllo ad aumentarne la capacità coagulante con ripercussioni sulla stima dell'inibitore nel plasma paziente.
- con livelli normali di fattore di von Willebrand (criterio non applicabile per il plasma carente di FIX). Il carente congenito contiene fattore di von Willebrand, quello immunodepleto può contenerlo oppure no.

L'uso di un carente con normali livelli di fattore von Willebrand è fortemente raccomandato [18]. Nonostante la validità di questa raccomandazione, si è pensato alla possibilità di sostituire il plasma carente sulla base delle seguenti considerazioni:

- il fattore von Willebrand è già presente nel PPN per cui non è indispensabile che il diluente usato per la miscela di controllo (e per le diluizioni del plasma paziente) contenga anch'esso Willebrand [19].
- il plasma carente è costoso.

Pertanto è attualmente accettata la modifica, già proposta da Verbruggen e collaboratori, di sostituire il plasma carente con una soluzione al 4% di albumina bovina in tampone imidazolo [20, 21].

Requisiti dei plasmi usati per il controllo qualità

Possono essere utilizzati

- plasmi del commercio positivi, con inibitore a titolo noto, e negativi, che non contengono né FVIII (o FIX) né l'inibitore;
- plasmi di pazienti con titolo conosciuto di inibitore o sicuramente negativi, provenienti dalla plasmoteca del laboratorio, se correttamente conservati.

2.2 Metodi

Gli step del metodo Nijmegen sono di seguito elencati e successivamente descritti in dettaglio.

1. Pretrattamento del plasma campione a 56°C
2. Centrifugazione dei campioni pretrattati
3. Preparazione delle miscele
4. Incubazione delle miscele per 2 ore a 37°C
5. Trasferimento delle miscele in bagno di ghiaccio
6. Misura della attività residua di FVIII
7. Calcolo del titolo di inibitore

1. Pretrattamento al calore

Il plasma paziente e i plasmi per il controllo qualità devono essere incubati in bagno termostatico a 56°C per almeno 30' o 1 ora, al fine di eliminare totalmente il FVIII che potrebbe ancora residuare nel campione. Il pretrattamento al calore è un passaggio importante perché assicura che durante l'esecuzione del test di inibizione, il FVIII che si va a determinare nella miscela sia solo quello proveniente dal PPN.

E' stato dimostrato che tale trattamento è in grado di eliminare anche i fattori sostitutivi ricombinanti a lunga emivita [22,23], ma non la presenza di Emicizumab (vedi il dettaglio del paragrafo "Misurazione dell'inibitore nei pazienti in terapia con Emicizumab").

Ovviamente il trattamento al calore non inattiva l'inibitore.

2. Centrifugazione del campione pretrattato

Terminata l'incubazione a 56°C si procede con una centrifugazione per eliminare i detriti formati in seguito al trattamento. La centrifugazione può avvenire ad alta velocità per un tempo breve (ad esempio 14.000 rpm per 2'), oppure a velocità minore per un tempo più lungo (ad esempio 3000 rpm per 15').

3. Preparazione delle miscele

Miscela di controllo: plasma carente (o soluzione al 4% di albumina bovina) + PPN tamponato in rapporto 1:1 (200 µl + 200 µl)

Miscela/e paziente: plasma paziente + PPN tamponato in rapporto 1:1 (200 µl + 200 µl). Se il campione deve essere diluito si eseguono, prima delle miscele, diluizioni scalari con plasma carente (o soluzione al 4% di albumina bovina).

La scelta sul numero delle diluizioni del plasma paziente è dettata da alcune considerazioni [24]. Ad esempio, per un paziente con una storia di negatività per l'inibitore che fa un controllo di routine, oltre al plasma indiluito, può bastare soltanto una diluizione 1:2; per un paziente con positività nota, il titolo della precedente determinazione può guidare la scelta del numero di diluizioni scalari (1:2 – 1:4 – 1:8 – 1:16, o molte di più se si prevede un alto titolo): Anche nel caso di un paziente sconosciuto è bene iniziare con alcune diluizioni.

Miscele per il controllo qualità:

- plasma positivo a titolo noto + PPN tamponato in rapporto 1:1 (200 µl + 200 µl); a seconda del titolo si diluisce, prima della miscela, in modo da ottenere un livello di inibitore nel controllo positivo pari a 1 UB/ml.
- plasma negativo + PPN tamponato in rapporto 1:1 (200 µl + 200 µl).

È importante sottolineare che il livello di FVIII è uguale in tutte le miscele così preparate perché è solo quello fornito dal PPN; siccome requisito del PPN è di avere un livello di fattore intorno al 100%, tutte le miscele, essendo preparate in rapporto 1:1 con PPN, hanno in partenza un livello di FVIII di circa il 50%.

4. Incubazione delle miscele

Tutte le miscele (miscela di controllo. miscele paziente, miscele per il controllo qualità) vengono incubate per 2 ore in un bagno termostatico a 37°C.

Per l'inibitore del FIX, che non ha una cinetica tempo dipendente, è sufficiente una incubazione delle miscele a 37°C per 15'.

5. Trasferimento in bagno di ghiaccio

Alla fine dell'incubazione tutte le miscele vengono trasferite in bagno di ghiaccio.

Tale trattamento serve a bloccare la reazione di inibizione fino all'esecuzione del test.

6. Misura dell'attività residua del fattore

Per la miscela di controllo e per tutte le miscele paziente e controlli qualità viene eseguita la misura del FVIII residuo.

Può essere usato sia il metodo coagulativo ad un tempo sia il metodo cromogenico. La scelta del metodo può essere dettata da alcune considerazioni:

- innanzitutto dalla disponibilità del test utilizzato in routine
- nel caso in cui si utilizzi il metodo coagulante si deve tener presente che questo metodo è soggetto ad alcune interferenze [25], quali la presenza di eparina non frazionata [26, anticoagulante lupico [27] ed eventuali inibitori aspecifici.

- la possibilità di utilizzare il metodo cromogenico risolve il problema delle suddette interferenze [28] Inoltre, il metodo cromogenico, con reattivi di origine bovina, è l'unico utilizzabile per gli emofilici A in profilassi con Emicizumab.

Il FVIII della miscela di controllo, che non contiene inibitore, è previsto si mantenga su un livello vicino al 50%, ossia a quello di partenza.

Per le miscele test, in cui può essere presente l'inibitore, si deve calcolare l'**attività residua** ottenuta dal rapporto tra la misura del FVIII della miscela paziente e la misura del FVIII della miscela di controllo [17], moltiplicando per 100 per esprimerla in percentuale.

$$\text{Attività residua} = \frac{\text{FVIII miscela paziente}}{\text{FVIII miscela controllo}} \times 100$$

Se il plasma paziente non contiene inibitore, l'attività residua è teoricamente 100%, se invece è presente l'inibitore, l'attività è sicuramente inferiore al 100% e risulta più o meno bassa in ragione del titolo di inibitore.

7. Calcolo del titolo di inibitore

Per convertire la % di attività residua di fattore in unità di inibitore, ci si riferisce ad un modello cinetico teorico che prevede una correlazione lineare tra il logaritmo dell'attività residua e la concentrazione dell'inibitore [29]; secondo questo modello ogni valore di attività residua misurata può essere direttamente convertito in un valore di titolo di inibitore, espresso in **unità Bethesda (UB)**.

Per definizione 1 UB di inibitore è la quantità di inibitore contenuto in 1 ml di plasma in grado di inattivare il 50% del FVIII presente nella miscela test dopo incubazione a 37°C per 2 ore (ovvero in grado di determinare una attività residua del 50%).

Sulla scorta della correlazione lineare tra attività residua e titolo dell'inibitore è possibile rappresentare queste due grandezze su un grafico semilogaritmico che ha sull'asse orizzontale le Unità Bethesda dell'inibitore e sull'asse verticale l'attività residua del fattore (figura 3): è così possibile estrapolare il titolo dell'inibitore partendo dall'attività residua della miscela del plasma paziente. Chiaramente se sono state fatte diluizioni del plasma paziente nelle miscele il titolo di inibitore va moltiplicato per il rispettivo fattore di diluizione.

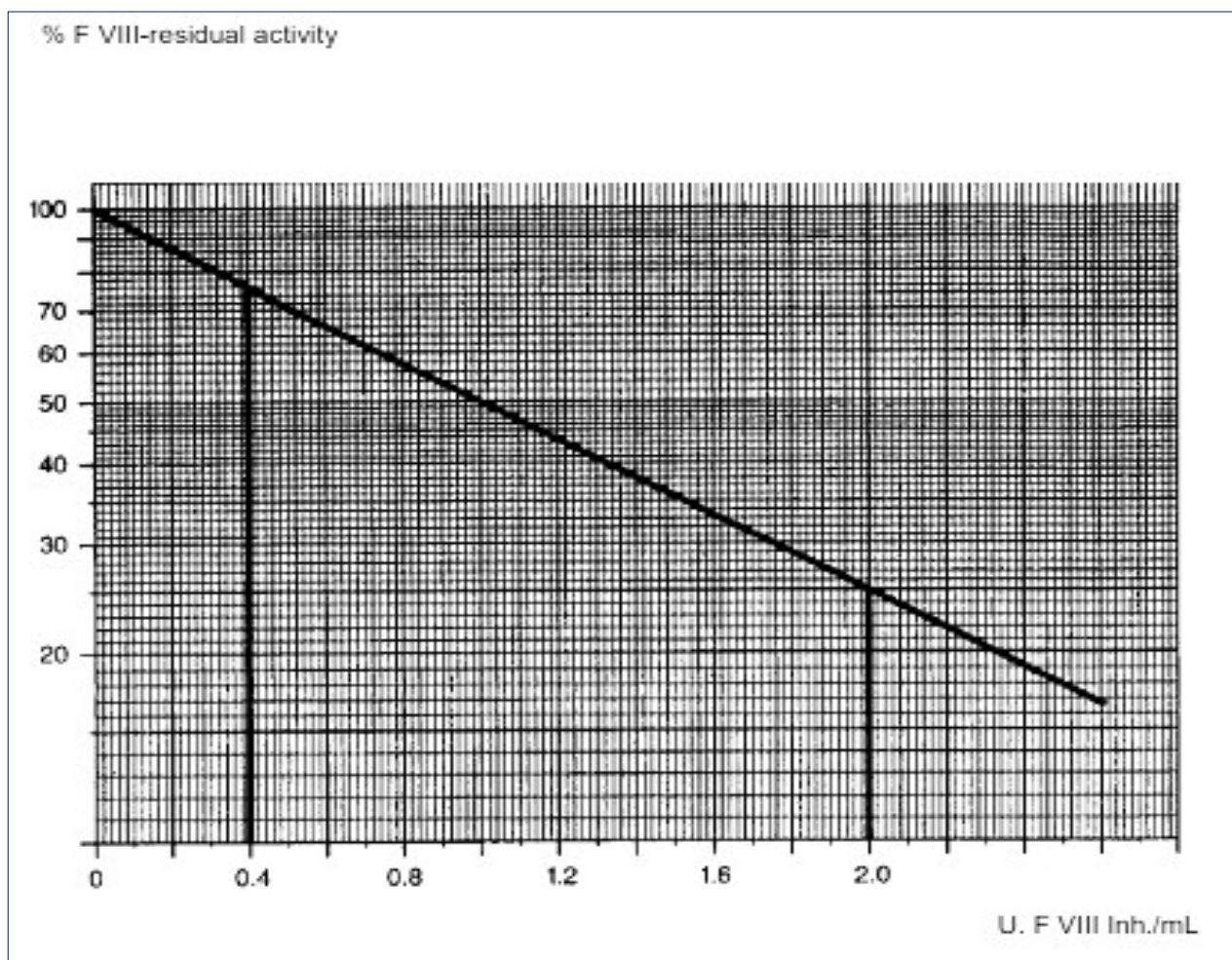


Figura 3: grafico per l'estrapolazione del titolo di inibitore sulla base dell'attività residua

Secondo le raccomandazioni della WFH (World Federation of Haemophilia) [5] la regressione lineare teorica consente di calcolare con sufficiente precisione l'inibitore considerando solo le attività residue comprese tra il 25% che corrisponde a 2 BU/ml e il 75% che corrisponde a 0.4 UB/ml e che rappresenta il limite di sensibilità del metodo.

Se risultano più diluizioni delle miscele test con una attività residua tra 25% e 75% due sono le possibilità di calcolare il titolo di inibitore [30]:

- si considera solo la diluizione più vicina al 50% di attività residua e si referta il titolo corrispondente.
- si considerano le diluizioni che rientrano tra il 25% e il 75% e si referta la media dei titoli di inibitore corrispondenti.

La maggior parte dei laboratori utilizza per il calcolo del titolo la diluizione con attività residua più vicina a 50%.

TEST IMMUNOLOGICI

Si basano tutti sulla capacità degli anticorpi, eventualmente presenti nel plasma emofilico, di legare il FVIII anche senza esercitare un effetto neutralizzante.

Dagli anni 1990 ad oggi diversi metodi sono stati sviluppati per la rilevazione degli anticorpi anti FVIII e anti FIX: test ELISA [31,32], test di immunoprecipitazione [33], test in immunofluorescenza [34] e test con tecnologie più recenti [35].

I test immunologici, a differenza dei test funzionali, presentano le seguenti caratteristiche vantaggiose:

- rivelano sia gli anticorpi neutralizzanti che quelli non neutralizzanti, come ad esempio quelli che, pur non avendo attività inibente, potrebbero contribuire ad aumentare la clearance del fattore
- sono più sensibili verso i bassi titoli di inibitore
- utilizzano siero anziché plasma e richiedono quantità esigue di campione
- non risentono dell'interferenza di eparina, anticoagulante lupico ed eventuali altri inibitori

D'altra parte però, proprio per il fatto che non discriminano anticorpi inibenti e non inibenti, sono poco usati nella pratica clinica perché non possono sostituire il test funzionale nel monitoraggio dell'inibitore.

Pertanto l'utilizzo dei test immunologici viene suggerito [26] per:

- screening dei campioni per i quali è effettivamente richiesto il test funzionale, al fine di non allestire una titolazione dell'inibitore su campioni negativi.
- conferma della presenza di una determinata sottoclasse di IgG, in particolare IgG4 cui è più spesso legata l'attività inibitoria.

MISURAZIONE DELL'INIBITORE NEI PAZIENTI IN TERAPIA CON EMICIZUMAB

Emicizumab, un anticorpo monoclonale bispecifico umanizzato, attualmente registrato in diversi paesi per la profilassi di pazienti con emofilia A con e senza inibitore, è in grado di mimare l'attività del FVIII attivato legandosi al FIX attivato ed al FX ripristinando una efficace emostasi [36]. Emicizumab è in grado di interferire con numerosi test della coagulazione, sia con test di screening che con test di secondo livello, inclusa la misurazione dell'inibitore [37]: infatti, in entrambi i metodi funzionali per l'inibitore, se viene utilizzato il metodo coagulante, l'Emicizumab può determinare un risultato falsamente negativo in quanto non viene inattivato dal trattamento con calore ed è in grado di attivare la cascata coagulativa anche in presenza di inibitori [38]; tale metodica non deve pertanto essere impiegata nella misurazione dell'inibitore. Per quanto riguarda invece i metodi per l'inibitore che impiegano il metodo cromogenico, l'utilizzo di reagenti di derivazione bovina rende il test insensibile alla presenza di Emicizumab; questo è dunque il metodo attualmente raccomandato per la misurazione dell'inibitore nei pazienti trattati con Emicizumab [5].

Bibliografia

1. Lillicrap, D.; Fijnvandraat, K.; Young, G.; Mancuso, M.E. Patients with Hemophilia A and Inhibitors: Prevention and Evolving Treatment Paradigms. *Expert Rev Hematol* 2020, 13, 313–321, doi:10.1080/17474086.2020.1739518.
2. Rocino, A.; Franchini, M.; Coppola, A. Treatment and Prevention of Bleeds in Haemophilia Patients with Inhibitors to Factor VIII/IX. *J Clin Med* 2017, 6, 46, doi:10.3390/jcm6040046.
3. Español, M.G.; Mistretta, J.N.; Tarantino, M.D.; Roberts, J.C. The Evolution of Hemophilia Therapeutics: An Illustrated Review. *Res Pract Thromb Haemost* 2024, 102308, doi:10.1016/j.rpth.2023.102308.
4. Gruppo di Lavoro AICE *Principi Di Trattamento e Aggiornamento Delle Raccomandazioni per La Terapia Sostitutiva Dell'emofilia A e B*; 2018;
5. Srivastava, A.; Santagostino, E.; Dougall, A.; Kitchen, S.; Sutherland, M.; Pipe, S.W.; Carcao, M.; Mahlangu, J.; Ragni, M. V.; Windyga, J.; et al. WFH Guidelines for the Management of Hemophilia, 3rd Edition. *Haemophilia* 2020, 26, 1–158, doi:10.1111/hae.14046.
6. Kershaw, G.; Orellana, D. Mixing Tests: Diagnostic Aides in the Investigation of Prolonged Prothrombin Times and Activated Partial Thromboplastin Times. *Semin Thromb Hemost* 2013, 39, 283–290, doi:10.1055/s-0033-1336832.
7. Blanco, A.N.; Cardozo, M.A.; Candela, M.; Santarelli, M.T.; Pérez Bianco, R.; Lazzari, M.A. Anti-Factor VIII Inhibitors and Lupus Anticoagulants in Haemophilia A Patients. *Thromb Haemost* 1997, 77, 656–659.
8. Kershaw, G.; Favaloro, E.J. Laboratory Identification of Factor Inhibitors: An Update. *Pathology* 2012, 44, 293–302, doi:10.1097/PAT.0b013e328353254d.
9. AICE (Associazione Italiana Centri Emofilia) quality laboratory working group *Consensus Document: Procedures for Hemostasis Laboratory, Mixing Test and Measurement of Factors VIII and IX*; 2022;
10. Ma, A.D.; Carrizosa, D. Acquired Factor VIII Inhibitors: Pathophysiology and Treatment. *Hematology* 2006, 2006, 432–437, doi:10.1182/asheducation-2006.1.432.
11. Gautier P, Sultan Y, Parquet-Gernez A, Meriane F, Guerois C, Derlon A. Detection and IgG subclass analysis of antibodies to factor VIII in multitransfused haemophiliacs and healthy individuals. *Haemophilia*. 1996, 2, 88-94
12. Montalvao SA, Tucunduva AC, Siqueira LH, Sambo AL, Medina SS, Ozelo MC. A longitudinal evaluation of anti-FVIII antibodies demonstrated IgG4 subclass is mainly correlated with high-titre inhibitor in haemophilia A patients. *Haemophilia*. 2015, 21, 686-692.

13. Kasper, C.K.; Aledort, L.; Aronson, D.; Counts, R.; Edson, J.R.; van Eys, J.; Fratantoni, J.; Green, D.; Hampton, J.; Hilgartner, M.; et al. Proceedings: A More Uniform Measurement of Factor VIII Inhibitors. *Thromb Diath Haemorrh* 1975, **34**, 612.
14. Verbruggen, B.; Novakova, I.; Wessels, H.; Boezeman, J.; van den Berg, M.; Mauser-Bunschoten, E. The Nijmegen Modification of the Bethesda Assay for Factor VIII:C Inhibitors: Improved Specificity and Reliability. *Thromb Haemost* 1995, **73**, 247–251.
15. Favaloro, E.J.; Lippi, G. *Hemostasis and Thrombosis Methods and Protocols Methods in Molecular Biology* 1646;
16. Giles, A.R.; Verbruggen, B.; Rivard, G.E.; Teitel, J.; Walker, I. A Detailed Comparison of the Performance of the Standard versus the Nijmegen Modification of the Bethesda Assay in Detecting Factor VIII:C Inhibitors in the Haemophilia A Population of Canada. Association of Hemophilia Centre Directors of Canada. Factor VIII/IX Subcommittee of Scientific and Standardization Committee of International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* 1998, **79**, 872–875.
17. Verbruggen, B.; van Heerde, W.; Laros-van Gorkom, B. Improvements in Factor VIII Inhibitor Detection: From Bethesda to Nijmegen. *Semin Thromb Hemost* 2009, **35**, 752–759, doi:10.1055/s-0029-1245107.
18. Verbruggen, B.; Giles, A.; Samis, J.; Verbeek, K.; Mensink, E.; Nováková, I. The Type of Factor VIII Deficient Plasma Used Influences the Performance of the Nijmegen Modification of the Bethesda Assay for Factor VIII Inhibitors. *Thromb Haemost* 2001, **86**, 1435–1439.
19. Miller, CH., Platt, SJ.; Rice, AS. ; Kelly, F.; Soucie, JM. Validation of Nijmegen-Bethesda assay modifications to allow inhibitor measurement during replacement therapy and facilitate inhibitor surveillance. *J Thromb. Haemost.* 2012, **10**:1055-1061
20. Verbruggen, B.; van Heerde, W.; Nováková, I.; Lillicrap, D.; Giles, A. A 4% Solution of Bovine Serum Albumin May Be Used in Place of Factor VIII:C Deficient Plasma in the Control Sample in the Nijmegen Modification of the Bethesda Factor VIII:C Inhibitor Assay. *Thromb Haemost* 2002, **88**, 362–364.
21. Kershaw, G.W.; Chen, L.S.; Jayakodi, D.; Dunkley, S.M. Validation of 4% Albumin as a Diluent in the Bethesda Assay for FVIII Inhibitors. *Thromb Res* 2013, **132**, 735–741, doi:10.1016/j.thromres.2013.09.018.
22. Fylling KA, Tange JI, Chen D, Pruthi RK. Heat inactivation of extended half-life factor VIII concentrates. *Haemophilia*. 2019;25: e130-e131
23. Payne AB, Ellingsen D, Driggers J, Bean CJ, Miller CH. Evaluation of pre-analytic heat treatment protocol used in the CDC NijmegenBethesda assay for heat inactivation of extended half-life haemophilia treatment products. *Haemophilia*. 2020;26:e28
24. Adcock DM, Favaloro EJ. Pearls and pitfalls in factor inhibitor assays. *Int J Lab Hematol*. 2015;37(Suppl 1):52-60.
25. Miller, C.H. Laboratory Testing for Factor VIII and IX inhibitors in Haemophilia: A Review. *Haemophilia* 2018, **24**, 186–197, doi:10.1111/hae.13424

26. Manco-Johnson MJ, Nuss R, Jacobson LJ. Heparin neutralization is essential for accurate measurement of factor VIII activity and inhibitor assays in blood samples drawn from implanted venous access devices. *J Lab Clin Med.* 2000;136:74-79
27. Blanco AN, Cardozo MA, Candela M, Santarelli MT, Perez Bianco R, Lazzari MA. Anti-factor VIII inhibitors and lupus anticoagulants in haemophilia A patients. *Thromb Haemost.* 1997;77:656-659
28. Blanco AN, Peirano AA, Grosso SH, Gennari LC, Bianco RP, Lazzari MA. A chromogenic substrate method for detecting and titrating anti-factor VIII antibodies in the presence of lupus anticoagulant. *Haematologica* 2002 87:271–278
29. Ketteler, C.; Hoffmann, I.; Davidson, S.; Chen, D.; Tiede, A.; Richter, N. Impact of Different Factor VIII Inhibitor Kinetic Profiles on the Inhibitor Titer Quantification Using the Modified Nijmegen–Bethesda Assay. *Res Pract Thromb Haemost* 2022, 6, e12799, doi:10.1002/rth2.12799.
30. Steve Kitchen Angus McCraw Marión Echenagucia. Diagnosis of Hemophilia and Other Bleeding Disorders A LABORATORY MANUAL Second Edition. World Federation of Hemophilia, 2010
31. Regnault V, Stoltz JF. Quantitation of factor VIII antibodies by an enzyme-linked immunoassay method. *Blood.* 1994; 83:1155–1156.
32. Sahud MA, Pratt KP, Zhukov O, Qu K, Thompson AR. ELISA system for detection of immune responses to FVIII: A study of 246 samples and correlation with the Bethesda assay. *Haemophilia.*2007; 13:317–322. [PubMed: 17498082]
33. Klinge J, Auerswald G, Budde U. Detection of all anti-factor VIII antibodies in haemophilia A patients by the Bethesda assay and a more sensitive immunoprecipitation assay. *Haemophilia.* 2001; 7:26–32.
34. Miller CH, Rice AS, Boylan B. Comparison of clot-based, chromogenic and fluorescence assays for measurement of factor VIII inhibitors in the US Hemophilia Inhibitor Research Study. *J Thromb Haemost.* 2013; 11:1300–1309. [PubMed: 23601690]
35. Lewis KB, Hughes RJ, Epstein MS. Phenotypes of allo- and autoimmune antibody responses to FVIII characterized by surface plasmon resonance. *PLoS ONE.* 2013; 8:e61120. [PubMed:23667433]
36. Alcedo Andrade PE, Mannucci PM, Kessler CM. Eficizumab: the hemophilia A game-changer. *Haematologica.* 2024 May 1;109(5):1334-1347. doi: 10.3324/haematol.2022.282099. PMID: 37916312; PMCID: PMC11063855.
37. Jenkins PV, Bowyer A, Burgess C, Gray E, Kitchen S, Murphy P, Platton S, Riddell A, Chowdary P, Lester W. Laboratory coagulation tests and emicizumab treatment A United

Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation guideline. Haemophilia. 2020 Jan;26(1):151-155. doi: 10.1111/hae.13903. Epub 2019 Dec 20. PMID: 31859415.

38. Müller J, Pekrul I, Pötzsch B, Berning B, Oldenburg J, Spannagl M. Laboratory Monitoring in Emicizumab-Treated Persons with Hemophilia A. Thromb Haemost. 2019 Sep;119(9):1384-1393. doi: 10.1055/s-0039-1692427. Epub 2019 Jun 16. PMID: 31203578.