

TÓPICOS ABORDADOS

- | | |
|--|--|
| ✓ Diferentes Cinéticas de Anticorpos | ✓ Protocolo para o Teste de Inibidores de FVIII e FIX |
| ✓ Amostras para Teste de Inibidores de FVIII/FIX: Coleta, Envio e Preparação | ✓ Ensaios de Inibidores do Fator de von Willebrand |
| ✓ Pool de Plasma Normal para Teste de Inibidor | ✓ Anticorpo Antidroga (ADA) no Laboratório de Coagulação - Emicizumabe |

Identificar o desenvolvimento de anticorpos é vital para que o programa de tratamento da hemofilia possa oferecer cuidados médicos adequados (Peyvandi et al, 2016; Srivastava et al, 2020). No contexto da hemofilia, os inibidores são anticorpos IgG policlonais contra FVIII ou FIX e principalmente da subclasse IgG4 de alta afinidade (Montalvão et al, 2015). Os inibidores neutralizam o concentrado de fator administrado ao paciente, dificultando a prevenção e o tratamento de sangramentos (Pratt et al, 2021). O surgimento de inibidores é resultado de um processo de múltiplas etapas que envolve determinantes ambientais e genéticos. Na hemofilia A grave, inibidores de FVIII se formam em aproximadamente 30% dos pacientes, geralmente durante os primeiros 20–30 dias de exposição. Na hemofilia B grave, a incidência cumulativa de desenvolvimento de inibidores é menor do que na hemofilia A grave e chega a 4%–5% 9 a 11 dias após a exposição (Ljung et al, 2019). O tratamento de sangramento agudo em pacientes com inibidores depende do título do inibidor. Pacientes com baixa título de inibidor (<5 UB/mL) podem ser tratados com terapia de reposição padrão, concentrado de fator, embora sejam necessárias doses mais altas para anular os efeitos neutralizantes do inibidor. Para pacientes com inibidores de alto título (>5 UB/mL), as únicas terapias eficazes para tratar o sangramento são os agentes de bypass (Ljung et al, 2019). Os três agentes de bypass disponíveis usados na hemofilia A e B são (1) concentrado de complexo de protrombina ativado (aPCC), (2) duas formas de FVII ativado recombinante (rFVIIa) e (3) FVIII suíno recombinante. Medicamentos hemostáticos recentemente desenvolvidos, como anticorpos biespecíficos humanizados (por exemplo, emicizumabe), RNA de interferência (por exemplo, fitusiran) e agentes anti-inibidor do fator tecidual (anti-TFPI), entre outros, estão disponíveis em alguns países para prevenir sangramentos. A indução de tolerância imunológica (ITI) é usada para erradicar inibidores e envolve injeções intravenosas frequentes de concentrado de fator ao longo de um período de meses. Na hemofilia A, a ITI é eficaz em cerca de 65 a 70% dos pacientes. O monitoramento do título do inibidor desses pacientes é essencial para avaliar e gerenciar o protocolo. A investigação laboratorial do inibidor deve ser realizada por meio do método de Bethesda modificado. Embora esse teste tenha alto CV, é o teste de referência utilizado para titular anticorpos inibitórios. Em alguns casos, triagem de inibidores utilizando o teste de TTPA pode ser realizada antes da titulação dos anticorpos. Contudo, em razão das limitações do teste, resultados negativos não devem ser usados para excluir a possível presença de um inibidor. Mais informações podem ser encontradas no capítulo 6 deste manual. Uma alternativa à triagem de anticorpos contra FVIII ou FIX é o uso de um teste imunológico. Diversos ensaios imunológicos foram estudados e, embora sejam mais sensíveis do que os testes funcionais, não diferenciam entre anticorpos inibitórios e não inibitórios e, portanto, ainda não são úteis na prática clínica para detectar ou monitorar inibidores funcionais. No entanto, estudos demonstraram que os anticorpos da subclasse IgG4 estão correlacionados com inibidores funcionais de FVIII e FIX (Awasthi et al, 2022; Montalvão et al, 2015; Moorehead et al, 2015).

Diferentes Cinéticas de Anticorpos: diferentes cinéticas de anticorpos podem afetar a análise dos dados e, consequentemente, levar a interpretações errôneas. Quando os inibidores de FVIII ou FIX agem em um teste de inibição de forma dose-dependente, como inativando completamente o FVIII ou o FIX, esses inibidores são denominados inibidores do “Tipo I”. Inibidores que demonstram comportamento cinético mais complexo são geralmente chamados de inibidores do “Tipo II”, inativando o FVIII de forma incompleta. Os inibidores do tipo I geralmente se desenvolvem

em pacientes com hemofilia A ou B congênita em resposta ao concentrado de FVIII ou FIX, enquanto os inibidores do tipo II geralmente ocorrem em pacientes com hemofilia adquirida ou hemofilia A leve. Os inibidores do tipo I de FVIII são dependentes do tempo e da temperatura porque seu alvo, o FVIII, está complexado com sua proteína transportadora, o FVW. Os inibidores de FIX não são dependentes do tempo e da temperatura.

Amostras para Teste de Inibidores de FVIII/FIX: Coleta, Envio e Preparação:

Coleta e envio de amostras: as amostras para os ensaios de inibidores de FVIII e FIX são coletadas em citrato trissódico 3,2% (0,105–0,109 M), o mesmo tipo de amostra usado na maioria dos testes de coagulação. O sangue total citratado deve ser centrifugado em até 4 horas após a coleta de sangue, e a centrifugação deve ser de 1500 g por 15 minutos. Amostras de plasma positivas para inibidores de FVIII e FIX, não sangue total, podem ser armazenadas em temperatura ambiente por 1 semana ou congeladas a -70°C e armazenadas por até 15 anos. É importante lembrar que, diferentemente dos procedimentos tradicionais de análise de coagulação, nesse tipo de amostra, é o anticorpo que deve ser preservado. Essa informação é muito útil para laboratórios que precisam enviar amostras para outro laboratório para teste, pois o transporte não depende de gelo seco.

Aquecimento das amostras: amostras de pacientes utilizadas para detecção de inibidores podem conter FVIII ou FIX exógeno devido a infusões recentes de concentrado de fator, como: (1) profilaxia, (2) tratamento de sangramento, (3) terapia de ITI ou (4) FVIII ou FIX endógeno se o teste for realizado em hemofilia leve ou moderada. A presença de FVIII ou FIX exógeno pode afetar significativamente a detecção de inibidores, com subestimação do título do inibidor e resultados falso-negativos (Batty et al, 2014; De Lima Montalvão et al, 2015). O aquecimento das amostras por 30 minutos a 56°C dissocia o complexo antígeno-anticorpo e desnatura o fator. Para padronizar o teste, recomenda-se que todas as amostras de teste sejam sempre pré-aquecidas, mesmo que não se espere a presença de FVIII ou FIX exógeno. O procedimento de aquecimento deve ser seguido por uma etapa de centrifugação, de 2 minutos a 4000 g, para remover os resíduos no plasma causados pelo aquecimento. Essa etapa de aquecimento das amostras para o teste de inibidores não foi avaliada em relação a todos os produtos disponíveis para tratamento de pacientes. Portanto, para cada produto de FVIII ou FIX molecularmente modificado, deve ser demonstrado se FVIII ou FIX residual se deteriora devido ao procedimento de aquecimento. Emicizumabe não é destruído pela etapa de pré-aquecimento, porém os inibidores de FVIII podem ser medidos na presença de emicizumabe usando o método cromogênico de FVIII bovino. Vale lembrar que alguns pacientes usam concentrado de fator e emicizumabe concomitantemente, por isso o tratamento térmico é necessário.

Diluição da amostra: para titular o inibidor, o teste deve ser realizado com várias diluições do plasma de teste. A maneira como o fator de diluição é selecionado não se limita a um número específico, pois depende do conhecimento do título anterior do inibidor.

Pool de Plasma Normal para Teste de Inibidor: para avaliar a atividade do inibidor na amostra de teste, é necessário apresentar uma fonte “externa” de FVIII ou FIX para esse inibidor. Essa fonte externa é baseada no pool de plasma normal, por isso é importante considerar que qualquer erro nesta etapa pode gerar resultados falso-positivos e falso-negativos. Ao preparar um pool para teste de inibidor, a atividade de FVIII ou FIX deve ser medida e o desvio desse valor deve ser monitorado ao longo do período de armazenamento ou ao produzir um novo lote. Um pool de plasma normal deve ser usado para garantir que o nível de FVIII ou FIX esteja próximo de 1 UI/mL (100%). Um nível mais baixo de fator no pool de plasma normal pode resultar em superestimação do título do inibidor, enquanto um nível mais alto de fator pode resultar em subestimação do título do inibidor. Um desvio máximo de 5% de 1 UI/mL de FVIII ou FIX no pool de plasma normal é aceitável. A fonte externa de FVIII ou FIX pode ser produzida pela preparação do pool de plasma normal ou a partir de uma fonte comercial e pode ser congelada ou liofilizada. Um mínimo de 20 doadores é sugerido para obter plasma com nível de FVIII ou FIX próximo de 1 UI/mL. O FVIII é um fator de coagulação termolábil, o que significa que durante incubação de 2 horas a 37°C, haverá perda significativa da atividade de FVIII causada por uma alteração no pH. Para estabilizar o pH durante a incubação, o plasma normal usado deve ser tamponado. Isso pode ser feito usando tampão imidazol ou tampão HEPES.

Protocolo para o Teste de Inibidores de FVIII e FIX: em 1975, Kasper et al. descreveram um método para determinar inibidores de FVIII e FIX e, até hoje, esse ainda é o teste mais padronizado, conhecido como teste de Bethesda.

Em 1995, foi descrito o método Nijmegen, uma modificação do ensaio de Bethesda, com algumas diferenças: (1) a introdução de um pool tamponado para melhorar a estabilidade do FVIII durante a incubação, e (2) plasma deficiente em FVIII para uso na mistura de controle. Esse método Bethesda modificado foi recomendado pela *International Society on Thrombosis and Haemostasis* (ISTH) [Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia] como método de referência para o teste de inibidor de FVIII (Verbruggen et al, 1995). O teste de inibidor é um método indireto e baseia-se no princípio da inativação do fator de coagulação de uma fonte externa conhecida pelo inibidor presente na amostra de teste durante um período de incubação. Uma unidade Bethesda é definida como a quantidade de inibidor que neutralizará 50% de uma unidade de FVIII adicionada em 2 horas a 37°C.

Reagentes e equipamentos:

- Tampão de diluição (parte 1)
- Tampão imidazol ou HEPES (abaixo)
- Pool de plasma normal (parte 2)
- Plasma deficiente em FVIII
- Cefalina (reagente de TTPA)
- Tubos plásticos

Tabela 22. Tampão imidazol ou HEPES

Tampão	
Imidazol	Misture 1 parte de tampão imidazol 4M com 39 partes de pool de plasma normal. Após a mistura, o pH deve ser ajustado para entre 7,3 e 7,5.
HEPES	Misture 1 parte de tampão HEPES 1M com 9 partes de pool de plasma normal. Após a mistura, o pH deve ser ajustado para um valor entre 7,3 e 7,5.

Método: prepare diluições do plasma de teste em tubos plásticos até um volume final de 0,2 mL usando o tampão de diluição. As diluições necessárias para cada paciente podem variar. Um ponto de partida sugerido seria começar com uma amostra não diluída e depois realizar diluições de 1/2, 1/4, 1/8, etc.

Observação: se o paciente já tiver realizado um ensaio de inibidor, o nível pode fornecer uma indicação aproximada de quais diluições devem ser utilizadas. Pipete 0,2 mL de plasma deficiente em FVIII para outro tubo plástico. Este servirá como tubo de controle.

Observação: no ensaio de Bethesda original, tampão imidazol foi usado para preparar uma mistura de controle com o pool de plasma normal. No ensaio de Nijmegen, o tampão imidazol é substituído por plasma deficiente em FVIII. Algumas diferenças foram observadas entre o uso de plasma deficiente em fator imunodepletado, plasma quimicamente depletado e plasma congenitamente deficiente. Essas diferenças podem ser causadas pela ausência ou presença de FVW no plasma, presença de anticorpos ou presença de fragmentos de FVIII. Como o FVW está presente no pool de plasma normal, não é necessário que o diluente da mistura de controle também contenha FVW e, para reduzir custos, o plasma deficiente em fator pode ser substituído por albumina sérica bovina (BSA) a 4%. A BSA tamponada a 4% é um substituto confiável e econômico para plasma de FVIII ou FIX e favorece a padronização do método.

- ✓ Adicione 0,2 mL de pool de plasma normal tamponado ao tubo de controle e às diluições de plasma de teste. O nível de FVIII de todos os tubos será de aproximadamente 0,5 UI/mL. Isso significa que o pool de plasma normal tamponado contém 1 UI/mL de FVIII.
- ✓ Tampe, misture e incube todos os tubos a 37°C por 2 horas.
- ✓ Após 2 horas, transfira todos os tubos para um banho de gelo, a menos que o ensaio de FVIII seja realizado imediatamente.
- ✓ Realize o teste de FVIII em todas as misturas de incubação usando o método habitual de ensaio de FVIII, método de um estágio ou método cromogênico (Parte 6).
- ✓ Leia o FVIII residual de cada mistura de teste, usando o controle como 100% (0,5 UI/mL).

Ensaio de inibidor de fator

Parte 1



Parte 2

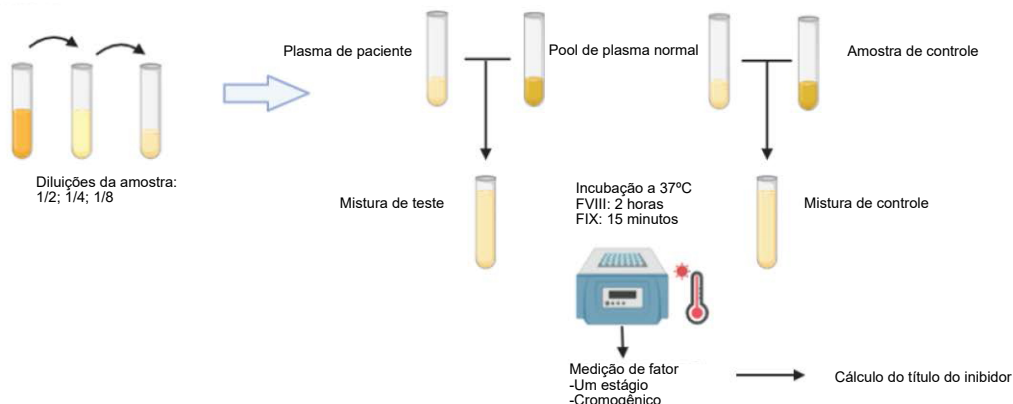


Figura 8. Procedimentos do ensaio de inibidor

Resultados e interpretação: a diluição que fornece FVIII residual mais próximo de 50%, mas dentro da faixa de 25% a 75%, é escolhida para o cálculo do inibidor. Qualquer FVIII residual <25% ou >75% não deve ser usado nos cálculos do nível de inibidor. Um gráfico de % de FVIII residual versus unidades de inibidor pode ser feito em papel log-log a partir da definição da unidade de inibidor. Leia o nível de inibidor correspondente ao FVIII residual para cada mistura de teste e corrija a diluição. Por exemplo, se o valor mais próximo de 50% do fator residual foi constatado na diluição de 1/4 (ou seja, na mistura 1/4 + pool normal), o resultado, que será próximo de 1 Unidade Bethesda (UB), deve ser multiplicado por 4.

- ✓ Diluição de 1/4 + pool normal
- ✓ FVIII residual = 50%
- ✓ Unidade de inibidor (do gráfico) = 1 UB
- ✓ Multiplicação pelo fator de diluição (1/4) = 4 UB

Observação: o ensaio de inibidor baseia-se na determinação do FVIII ou FIX residual da mistura de plasma de teste e controle previamente incubada. Os ensaios de Bethesda e Nijmegen foram desenvolvidos utilizando um ensaio de fator de coagulação de um estágio. No entanto, o teste de inibidores por meio desse ensaio apresenta limitações. A formação de coágulo neste teste pode ser afetada, por exemplo, pelo anticoagulante lúpico (inibidores não específicos da coagulação) e por medicamentos como o emicizumabe. Uma alternativa para evitar esses problemas é o uso de um método cromogênico. Outra vantagem do uso de um método cromogênico em vez de um ensaio de coagulação é a maior exatidão dos resultados. Uma amostra de paciente não diluída com atividade residual >75% pode ser relatada como <0,4 UB/mL. Para inibidores de FVIII, o Comitê Científico e de Padronização (SSC) da ISTH recomenda considerar um resultado $\geq 0,6$ UB/mL como positivo. Além da curva de calibração, o título do inibidor pode ser calculado usando a fórmula: $(2 - \log \%RA) / 0,301$. No caso de um inibidor do tipo I, a curva do plasma de teste de um paciente mostra paralelismo com a curva de calibração. Não paralelismo com a curva de calibração indica um padrão de inibidor do tipo II com cinética diferente. Para inibidores com cinética tipo II, use a menor diluição que se aproxime de 50% da atividade residual para o cálculo final do título do inibidor.

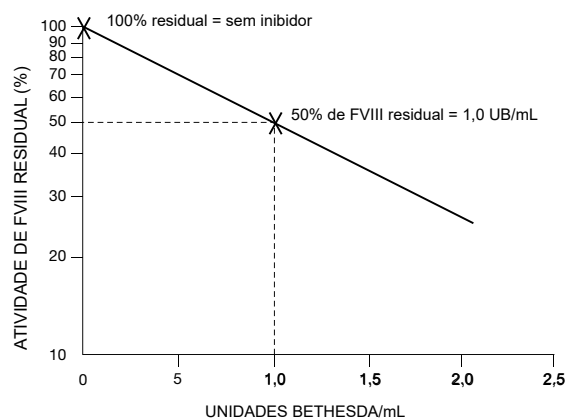


Figura 9. Cálculo de atividade de fator residual

Observações: os inibidores funcionais da hemostasia mais frequentemente encontrados são os anticoagulantes lúpicos, que não são direcionados contra fatores de coagulação específicos e cuja presença deve ser excluída antes da realização de testes para inibidores de fatores específicos. A quantificação do título do inibidor é realizada em laboratório, preferivelmente por meio do ensaio de Bethesda modificado por Nijmegen Bethesda, pois essa modificação oferece maior especificidade e sensibilidade em comparação ao ensaio de Bethesda original. Resultados positivos para inibidor de FVIII abaixo de 2,0 UB podem ser confirmados com o método cromogênico, que apresenta menor interferência analítica e maior exatidão em comparação ao método de um estágio. O método cromogênico também é a melhor opção se houver suspeita de anticoagulantes lúpicos na amostra de teste ou se a amostra contiver anticoagulantes terapêuticos, como heparina ou inibidores diretos de FXa ou FIIa. Anticorpos anti-FVIII não neutralizantes que não são detectados pelo ensaio de Nijmegen-Bethesda podem ser clinicamente relevantes, pois podem aumentar o clearance de FVIII e podem ser medidos por ELISA.

Ensaio de Inibidores do Fator de von Willebrand: a DVW é considerada o distúrbio hemorrágico hereditário mais comum conhecido em humanos, com prevalência populacional de 1% e prevalência sintomática de 1 em 1000 (Bowman et al, 2010). As opções de tratamento incluem a infusão de concentrados de FVW, que geralmente também contêm FVIII, administrados para prevenir ou tratar episódios hemorrágicos. Aloanticorpos contra FVW apresentam prevalência entre 7 e 9,5% (James et al, 2013; Pagliari et al, 2023). Nesses casos, o tratamento com concentrados de FVW é ineficaz, e episódios de anafilaxia foram relatados com exposição subsequente ao FVW (James et al, 2013). Como já sabemos, a deficiência de FVW pode ser explicada por diferentes mecanismos resultantes dos tipos de defeitos genéticos identificados. Essa variabilidade de defeitos genéticos contribui para uma heterogeneidade de inibidores que têm como alvo diferentes epítomos da molécula de FVW. Por esse motivo, a detecção laboratorial desses anticorpos é desafiadora (Connell et al, 2021; Miller, 2021; Sarji et al, 1974). Em 1974, Sarji et al (1974) relataram pela primeira vez um caso de aloanticorpo contra FVW em um paciente politransfundido. O inibidor de FVW foi medido usando um método análogo ao método de Bethesda para inibidores de FVIII (Sarji et al, 1974). Embora não haja padronização na identificação de inibidores de FVW, o método de Bethesda tem sido utilizado pela maioria dos laboratórios (Favaloro et al, 2022), com a diferença de utilizar métodos que avaliam a atividade do FVW em vez do teste de FVIII ou FIX. Atualmente, existem diferentes tipos de métodos disponíveis para detecção da atividade do FVW, com diferentes sensibilidades e especificidades, por isso é importante considerar que essa variabilidade de métodos influencia a sensibilidade e a especificidade da detecção desses inibidores (Favaloro et al, 2022). Os anticorpos contra FVW não têm a característica de serem dependentes do tempo e da temperatura, podendo ser avaliados imediatamente após o teste de mistura (Sarji et al, 1974). O método clássico do cofator de ristocetina, que avalia a interação do FVW com plaquetas fixadas na presença de ristocetina, assim como o método de avaliação de colágeno e o método de ganho de função, são opções que já foram avaliadas e demonstraram ser métodos com boa sensibilidade e estabilidade, apesar de apresentarem resultados diferentes conforme discutido acima. Outros métodos disponíveis ainda não foram avaliados para esse tipo de investigação. Métodos imunológicos também foram descritos e detectam anticorpos neutralizantes e não neutralizantes. Em relação ao desenvolvimento de autoanticorpos que caracterizam a DVW

adquirida, pacientes com neoplasias mieloproliferativas (NMPs) são um subgrupo que apresenta complicações hemorrágicas relacionadas à atividade do FVW. Resultados falsos são observados em amostras de pacientes com NMPs, dependendo da tecnologia aplicada. A investigação laboratorial de inibidores de FVW caracterizados por aloanticorpos e autoanticorpos deve ser realizada com cautela, tendo em vista as diferentes possibilidades metodológicas. O desempenho de todos os métodos modernos atualmente disponíveis ainda não está claro (Noye et al, 2024; Favaloro et al, 2022).

Anticorpo Antidroga (ADA) no Laboratório de Coagulação - Emicizumabe: emicizumabe é um anticorpo biespecífico que se liga a FIX/FIXa e FX/FXa humanos e age como mimético da função do FVIII. No entanto, não é regulado pelos mecanismos que regulam o FVIII (Mahlangu et al, 2018, Mahlangu et al, 2022). O teste de triagem de TTPA é consideravelmente reduzido pelo emicizumabe (ou seja, abaixo da faixa de referência, independentemente dos reagentes utilizados). Emicizumabe afeta todos os testes e ensaios laboratoriais baseados em TTPA. Emicizumabe também interfere nos ensaios cromogênicos que medem FVIII usando FIXa e FX humanos, mas não naqueles que usam FIXa e FX de origem bovina (Bowyer et al, 2021; Jenkins et al, 2020). Emicizumabe pode ser medido e relatado em µg/mL por meio de ensaio de um estágio modificado com maior diluição de amostra e calibrado com calibradores específicos para emicizumabe. Anticorpos antidroga (ADAs) podem se desenvolver após uma dose única ou administração repetida de uma proteína terapêutica e podem afetar a farmacocinética, a farmacodinâmica, a eficácia e/ou a segurança dessa proteína terapêutica. Estudos que avaliam as características de ADA em pacientes tratados com emicizumabe mostram que o teste de TTPA pode ser prolongado em conjunto com episódios hemorrágicos na presença de anticorpos com ação neutralizante (Novembrino et al, 2023; Valsecchi et al, 2021). Nesse caso, quando o nível de emicizumabe foi medido, mostrou redução significativa. A atividade neutralizante desses anticorpos não foi claramente identificada em métodos funcionais, mesmo no ensaio de Bethesda modificado (Kaneda et al, 2021). O nível da unidade Bethesda identificada parece ser menor do que o esperado em comparação ao teste que mede o nível de emicizumabe. O papel dos testes funcionais para ADA ainda não foi estabelecido, mas eles podem ser complementares à medição do nível plasmático do medicamento nesses casos. A WFH recomenda a medição dos níveis de emicizumabe por meio de ensaio de um estágio modificado com maior diluição da amostra e calibrado com calibradores específicos para emicizumabe (Srivastava et al, 2020).

Referências

- Awasthi NP, Tiwari V, Riaz K, Arshad S, Husain N. Revealing and IgG4 analysis to factor VIII in haemophilia-A patients with and without inhibitors. *Transfus Apher Sci* 2022; 61(3): 103343.
- Batty P, Platton S, Bowles L, Pasi KJ, Hart DP. Pre-analytical heat treatment and a FVIII ELISA improve factor VIII antibody detection in acquired haemophilia A. *Br J Haematol* 2014; 166(6): 953-956.
- Bowman M, Hopman WM, Rapson D, Lillicrap D, James P. The prevalence of symptomatic von Willebrand disease in primary care practice. *J Thromb Haemost* 2010; 8(1): 213-216.
- Bowyer AE, Lowe AE, Tiefenbacher S. Laboratory issues in gene therapy and emicizumab. *Haemophilia* 2021; 27 Suppl 3: 142-147.
- Connell NT, Flood VH, Brignardello-Petersen R, Abdul-Kadir R, Arapshian A, Couper S et al. ASH ISTH NHF WFH 2021 guidelines on the management of von Willebrand disease. *Blood Adv* 2021; 5(1): 301-325.
- de Lima Montalvão SA, Tucunduva AC, de Almeida Sambo AL, De Paula EV, de Souza Medina S, Ozelo MC. Heat treatment of samples improve the performance of the Nijmegen-Bethesda assay in hemophilia A patients undergoing immune tolerance induction. *Thromb Res* 2015; 136(6): 1280-1284.
- Favaloro EJ, Dean E, Arunachalam S, Vong R, Mohammed S. Evaluating errors in the laboratory identification of von Willebrand disease using contemporary von Willebrand factor assays. *Pathology* 2022; 54(3): 308-317.
- James PD, Lillicrap D, Mannucci PM. Alloantibodies in von Willebrand disease. *Blood* 2013; 122(5): 636-640.
- 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; 26(1): 151-155.

Kaneda M, Kawasaki R, Matsumoto N, Abe H, Tashiro Y, Inokuchi Y et al. Detailed analysis of anti-emicizumab antibody decreasing drug efficacy, using plasma samples from a patient with hemophilia A. *J Thromb Haemost* 2021; 19(12): 2938-2946.

Ljung R, Auerswald G, Benson G, Dolan G, Duffy A, Hermans C et al. Inhibitors in haemophilia A and B: Management of bleeds, inhibitor eradication and strategies for difficult-to-treat patients. *Eur J Haematol* 2019; 102(2): 111-122.

Mahlangu J, Iorio A, Kenet G. Emicizumab state-of-the-art update. *Haemophilia* 2022; 28 Suppl 4(Suppl 4): 103-110.

Mahlangu J, Oldenburg J, Paz-Priel I, Negrier C, Niggli M, Mancuso ME et al. Emicizumab prophylaxis in patients who have hemophilia A without inhibitors. *N Engl J Med* 2018; 379(9): 811-822.

Miller CH. Monitoring of von Willebrand factor inhibitors in patients with type 3 von Willebrand disease using a quantitative assay. *Haemophilia* 2021; 27(5): 823-829.

Montalvão 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(5): 686-692.

Moorehead PC, Thibeault L, Tuttle A, Grabell J, Dwyre L, Silva M, James P, Lillicrap D. Rapid acquisition of immunologic tolerance to factor VIII and disappearance of anti-factor VIII IgG4 after prophylactic therapy in a hemophilia A patient with high-titer factor VIII inhibitor. *J Pediatr Hematol Oncol* 2015; 37(4): e220-222.

Novembrino C, Boscolo-Anzoletti M, Galbiati E, Shinohara S, Peyvandi F. Effect of emicizumab-neutralizing antibodies on activated partial thromboplastin time-based clotting time test results in patients treated with emicizumab. *Res Pract Thromb Haemost* 2023; 7(8): 102260.

Noye J, Beggs J, Mason J. Discrepant low von Willebrand factor activity results on the ACL TOP analyzer are frequent in unselected patients with myeloproliferative neoplasms and show no correlation with high-molecular-weight multimer loss or bleeding phenotype. *J Thromb Haemost* 2024; 22(4): 965-974.

Pagliari MT, Budde U, Baronciani L, Eshghi P, Ahmadinejad M, Badiie Z et al. Von Willebrand factor neutralizing and non-neutralizing alloantibodies in 213 subjects with type 3 von Willebrand disease enrolled in 3WINTERS-IPS. *J Thromb Haemost* 2023; 21(4): 787-799.

Peyvandi F, Garagiola I, Young G. The past and future of haemophilia: Diagnosis, treatments, and its complications. *Lancet* 2016; 388(10040): 187-197.

Pratt KP, Arruda VR, Lacroix-Desmazes S. Inhibitors-Recent insights. *Haemophilia* 2021; 27 Suppl 3: 28-36.

Sarji KE, Stratton RD, Wagner RH, Brinkhous KM. Nature of von Willebrand factor: A new assay and a specific inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974; 71(8): 2937-2941.

Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, Kitchen S, Sutherland M, Pipe SW et al. WFH guidelines for the management of hemophilia, 3rd edition. *Haemophilia* 2020; 26 Suppl 6: 1-158.

Valsecchi C, Gobbi M, Beeg M, Adams T, Castaman G, Schiavone L, Huntington JA, Peyvandi F. Characterization of the neutralizing anti-emicizumab antibody in a patient with hemophilia A and inhibitor. *J Thromb Haemost* 2021; 19(3): 711-718.

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(2): 247-251.