

SUJETS ABORDÉS

- ✓ Différentes cinétiques des anticorps
- ✓ Échantillons pour le dépistage des inhibiteurs des facteurs VIII et IX : collecte, expédition et préparation
- ✓ Plasma normal poolé pour le dépistage des inhibiteurs
- ✓ Protocole pour le dépistage des inhibiteurs des facteurs VIII et IX
- ✓ Dosages des inhibiteurs du facteur Willebrand
- ✓ Anticorps anti-médicament dans le laboratoire d'analyse de la coagulation - Émicizumab

Identifier le développement d'anticorps est fondamental pour que le programme de prise en charge de l'hémophilie soit en mesure de fournir des soins médicaux adéquats (Peyvandi *et al.*, 2016 ; Srivastava *et al.*, 2020). Dans le contexte de l'hémophilie, les inhibiteurs sont des anticorps IgG polyclonaux dirigés contre le facteur VIII ou IX et appartiennent principalement à la sous-classe des IgG4 de haute affinité (Montalvão *et al.*, 2015). Ils neutralisent le concentré de facteur administré au patient, ce qui rend difficile la prévention et le traitement des saignements (Pratt *et al.*, 2021). L'apparition d'inhibiteurs résulte d'un processus en plusieurs étapes impliquant des déterminants environnementaux et génétiques. Dans l'hémophilie A sévère, des inhibiteurs du facteur VIII se forment chez environ 30 % des patients, généralement au cours des 20 à 30 premiers jours d'exposition. Dans l'hémophilie B sévère, l'incidence cumulée du développement d'inhibiteurs est inférieure à celle de l'hémophilie A sévère et atteint 4 à 5 % 9 à 11 jours après l'exposition (Ljung *et al.*, 2019). Le traitement des épisodes hémorragiques aigus chez les patients présentant des inhibiteurs dépend du titrage de l'inhibiteur. Les patients dont le titrage est faible (< 5 UB/ml) peuvent recevoir un traitement avec facteur de remplacement standard, le concentré de facteur, même si des doses plus élevées sont requises pour surmonter les effets neutralisants de l'inhibiteur. Lorsque le titre est élevé (> 5 UB/ml), les seuls traitements efficaces des saignements sont les agents de contournement (Ljung *et al.*, 2019). Les trois agents de contournement disponibles dans l'hémophilie A et B sont (1) le concentré de complexe prothrombique activé (CCPa), (2) deux formes de facteur VII activé recombinant (rFVIIa) et (3) le facteur VIII porcin recombinant. De nouveaux médicaments hémostatiques, tels que les anticorps bispécifiques humanisés (l'émicizumab notamment), l'interférence ARN (p. ex. le fitusiran) et les agents anti-inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (anti-TFPI), entre autres, sont disponibles dans certains pays pour la prévention des saignements. L'induction de tolérance immunitaire (ITI) sert à éradiquer les inhibiteurs et implique de fréquentes injections intraveineuses de concentré de facteur sur une période de plusieurs mois. Dans l'hémophilie A, l'ITI est efficace chez environ 65 à 70 % des patients. Le suivi du titrage des inhibiteurs chez ces patients est essentiel pour l'évaluation et la gestion du protocole. L'étude en laboratoire de l'inhibiteur doit être effectuée selon la méthode Bethesda modifiée. Bien que ce test ait un CV élevé, il s'agit du test de référence pour le titrage des anticorps inhibiteurs. Dans certains cas, le dépistage des inhibiteurs à l'aide du TCA peut être effectué avant le titrage des anticorps. Toutefois, en raison des limites du test, les résultats négatifs ne doivent pas être utilisés pour exclure la présence éventuelle d'un inhibiteur. Ce point est développé dans la partie 6 de ce manuel. Une alternative au dépistage des anticorps antifacteur VIII ou IX est le cours à un test immunologique. Divers tests immunologiques ont été étudiés et, même si ces tests sont plus sensibles que les tests fonctionnels, ils ne font pas de distinction entre les anticorps inhibiteurs et non inhibiteurs et ne sont donc pas encore utiles dans

la pratique clinique pour détecter ou surveiller les inhibiteurs fonctionnels. Des études ont toutefois montré que les anticorps de la sous-classe IgG4 sont corrélés avec les inhibiteurs fonctionnels des facteurs VIII et IX (Awasthi *et al.*, 2022 ; Montalvão *et al.*, 2015 ; Moorehead *et al.*, 2015).

Différentes cinétiques des anticorps : des cinétiques différentes peuvent affecter l'analyse des données et entraîner une interprétation erronée. Lorsque les inhibiteurs du facteur VIII ou IX agissent dans un test d'inhibition de manière dose-dépendante, à savoir de complètement inactiver le facteur VIII ou IX, ces inhibiteurs sont appelés inhibiteurs de « type I ». Les inhibiteurs qui présentent un comportement cinétique plus complexe sont généralement appelés « type II », résultant en une inactivation incomplète du facteur VIII. Les inhibiteurs de type I se développent généralement chez les patients atteints d'hémophilie A ou B congénitale en réponse au concentré de facteur VIII ou IX, tandis que ceux de type II surviennent généralement chez les patients atteints d'hémophilie acquise ou d'hémophilie A mineure. Les inhibiteurs du facteur VIII de type I dépendent du temps et de la température car leur cible, le facteur VIII, forme un complexe avec sa protéine porteuse, le FW. Les inhibiteurs du facteur IX ne dépendent pas du temps et de la température.

Échantillons pour le dépistage des inhibiteurs des facteurs VIII et IX : collecte, expédition et préparation

Collecte et acheminement des échantillons : les échantillons pour le dosage des inhibiteurs des facteurs VIII et IX sont prélevés dans du citrate trisodique à 3,2 % (0,105-0,109 M), le même type d'échantillon étant utilisé pour la plupart des tests de coagulation. Le sang total citraté doit être centrifugé dans les quatre heures suivant le prélèvement de sang, à 1500 g pendant 15 minutes. Les échantillons de plasma positifs pour les inhibiteurs des facteurs VIII et IX, et non le sang total, peuvent être conservés à température ambiante pendant une semaine, ou congelés à -70 °C et conservés jusqu'à 15 ans. Il est important de garder à l'esprit que, contrairement aux procédures traditionnelles d'analyse de la coagulation, dans ce type d'échantillon, c'est l'anticorps qui doit être préservé. Ces informations sont très utiles pour les laboratoires qui doivent envoyer des échantillons vers un autre laboratoire, car le transport ne dépend pas de la glace carbonique.

Préchauffage des échantillons : les échantillons de patients servant à la détection des inhibiteurs peuvent contenir du facteur VIII ou IX exogène en raison de perfusions récentes de concentré de facteurs, notamment : (1) prophylaxie, (2) traitement des saignements, (3) ITI ou (4) facteur VIII ou IX endogène si le test est effectué pour une hémophilie mineure ou modérée. La présence de facteur VIII ou IX exogène peut considérablement affecter la détection des inhibiteurs, avec une sous-estimation du titrage et des résultats faussement négatifs (Batty *et al.*, 2014 ; De Lima Montalvão *et al.*, 2015). Le préchauffage des échantillons à 56 °C pendant 30 minutes dissocie le complexe antigène-anticorps et dénature le facteur. Pour standardiser le test, il est recommandé que tous les échantillons à tester soient systématiquement préchauffés, même si aucun facteur VIII ou IX exogène n'est attendu. Le préchauffage doit être suivi d'une étape de centrifugation, de deux minutes à 4 000 g, pour éliminer dans le plasma les résidus dus au préchauffage. Cette étape de préchauffage pour le dépistage des inhibiteurs n'a pas été évaluée pour tous les produits thérapeutiques disponibles. Par conséquent, pour chaque produit de facteur VIII ou IX modifié sur le plan moléculaire, il doit être démontré que le facteur VIII ou IX résiduel se détériore à cause du préchauffage. L'émicizumab n'est pas détruit par l'étape de préchauffage ; les inhibiteurs du facteur VIII peuvent toutefois être mesurés en présence d'émicizumab en ayant recours à la méthode chromogénique du facteur VIII bovin. Il convient de rappeler que certains patients reçoivent un concentré de facteur et l'émicizumab de manière concomitante, et qu'un traitement thermique est donc nécessaire.

Dilution de l'échantillon : pour le titrage de l'inhibiteur, le test doit être effectué avec plusieurs dilutions du plasma à tester. La méthode de sélection du facteur de dilution ne se limite pas à un nombre spécifique, car cela dépend du fait que le titrage précédent de l'inhibiteur soit ou non connu.

Plasma normal poolé pour le dépistage des inhibiteurs : pour évaluer l'activité de l'inhibiteur dans l'échantillon à tester, il est nécessaire de présenter une source « externe » de facteur VIII ou IX pour cet

inhibiteur. Cette source externe est basée sur le pool de plasma normal ; il est donc important de prendre en considération le fait que toute erreur à ce stade peut générer des résultats faux positifs et faux négatifs. Lors de la préparation d'un pool pour le dépistage des inhibiteurs, l'activité du facteur VIII ou IX doit être mesurée et l'écart par rapport à cette valeur doit être surveillé pendant la durée de conservation ou lors de la production d'un nouveau lot. Il convient d'utiliser un pool de plasma normal pour s'assurer que le taux de facteur VIII ou IX est proche de 1 UI/ml (100 %). Un taux de facteur plus faible dans le pool de plasma normal peut entraîner une surestimation du titrage de l'inhibiteur, tandis qu'un taux plus élevé peut entraîner une sous-estimation. Un écart maximum de 5 % de 1 UI/ml de facteur VIII ou IX dans le pool de plasma normal est acceptable. La source externe de facteur VIII ou IX peut être fabriquée en préparant le pool de plasma normal ou à partir d'une source du commerce, et peut être congelée ou lyophilisée. On suggère un minimum de 20 personnes donneuses pour obtenir du plasma ayant un taux de facteur VIII ou IX proche de 1 UI/ml. Le facteur VIII est un facteur de coagulation thermolabile, ce qui signifie que pendant une incubation de deux heures à 37 °C, il y aura une perte significative d'activité du facteur VIII en raison d'un changement de pH. Pour stabiliser le pH pendant l'incubation, le plasma normal utilisé doit être tamponné. Cela peut être fait à l'aide d'un tampon imidazole ou HEPES.

Protocole pour le dépistage des inhibiteurs des facteurs VIII et IX : en 1975, Kasper et al. ont décrit une méthode de détermination des inhibiteurs des facteurs VIII et IX et, à ce jour, il s'agit toujours du test le plus standardisé, connu sous le nom de « test Bethesda ». En 1995, a été décrite la méthode de Nijmegen, modification du test Bethesda, avec quelques différences : (1) l'introduction d'un pool tamponné pour améliorer la stabilité du facteur VIII pendant l'incubation, et (2) l'utilisation de plasma déficient en facteur VIII dans le mélange de contrôle. Cette méthode de Bethesda modifiée a été recommandée par la Société internationale de thrombose et d'hémostase (ISTH) comme méthode de référence pour le dépistage des inhibiteurs du facteur VIII (Verbruggen et al., 1995). Le dépistage des inhibiteurs est une méthode indirecte et repose sur le principe d'inactivation du facteur de coagulation d'une source externe connue par l'inhibiteur dans l'échantillon à tester pendant une période d'incubation. Une unité Bethesda est définie comme la quantité d'inhibiteur qui neutralisera 50 % d'une unité de facteur VIII ajoutée en deux heures à 37 °C.

Réactifs et équipement :

- Tampon de dilution (partie 1)
- Tampon imidazole ou HEPES (ci-dessous)
- Pool de plasma normal (partie 2)
- Plasma déficient en facteur VIII
- Céphaline (réactif de TCA)
- Tubes en plastique

Tableau 22. Tampon imidazole ou HEPES

Tampon	
Imidazole	Mélanger une partie de tampon imidazole 4 M à 39 parties de pool de plasma normal. Après le mélange, le pH doit être ajusté entre 7,3 et 7,5.
HEPES	Mélanger une partie de tampon HEPES 1 M à neuf parties de pool de plasma normal. Après le mélange, le pH doit être ajusté entre 7,3 et 7,5.

Méthode : préparer des dilutions du plasma à tester dans des tubes en plastique jusqu'à un volume final de 0,2 ml à l'aide du tampon de dilution. Les dilutions requises pour chaque patient peuvent varier. Un point de départ suggéré serait de commencer par un échantillon non dilué, puis d'effectuer des dilutions de 1/2, 1/4, 1/8, etc.

Remarque : si un dosage des inhibiteurs a déjà été effectué, le taux peut servir de guide approximatif quant aux dilutions à utiliser. Pipeter 0,2 ml de plasma déficient en facteur VIII dans un autre tube en plastique. Cela servira de tube témoin.

Remarque : dans le test de Bethesda d'origine, le tampon imidazole a servi à préparer un mélange de contrôle avec le pool de plasma normal. Dans le test de Nijmegen, le tampon imidazole est remplacé par du plasma déficient en facteur VIII. Des différences ont été observées entre un plasma déficient en facteurs par immunodéplétion, un plasma déplété chimiquement et un plasma issu de personnes donneuses ayant un déficit congénital. Ces différences peuvent être dues à l'absence ou à la présence de FW dans le plasma, à la présence d'anticorps ou à la présence de fragments de facteur VIII. Comme le FW est présent dans le pool de plasma normal, il n'est pas nécessaire que le diluant du mélange de contrôle contienne également du FW et, pour réduire les coûts, le plasma déficient en facteur peut être remplacé par de l'albumine de sérum bovin (BSA) à 4 %. La BSA tamponnée à 4 % est un substitut fiable et économique du plasma avec facteur VIII ou IX et favorise la standardisation de la méthode.

- ✓ Ajouter 0,2 ml de pool de plasma normal tamponné au tube témoin et aux dilutions de plasma à tester. Le taux de facteur VIII de tous les tubes sera d'environ 0,5 UI/ml. Cela signifie que le pool de plasma normal tamponné contient 1 UI/ml de facteur VIII.
- ✓ Boucher, mélanger et incuber tous les tubes à 37 °C pendant deux heures.
- ✓ Après deux heures, transférer tous les tubes dans un bain de glace, sauf si le dosage du facteur VIII doit être effectué immédiatement.
- ✓ Procéder au dosage du facteur VIII sur tous les mélanges incubés selon la méthode de dosage habituelle, en un temps ou chromogénique (partie 6).
- ✓ Lire le taux de facteur VIII résiduel de chaque mélange, en utilisant le contrôle comme la valeur 100 % (0,5 UI/ml).

Factor Inhibitor Assay

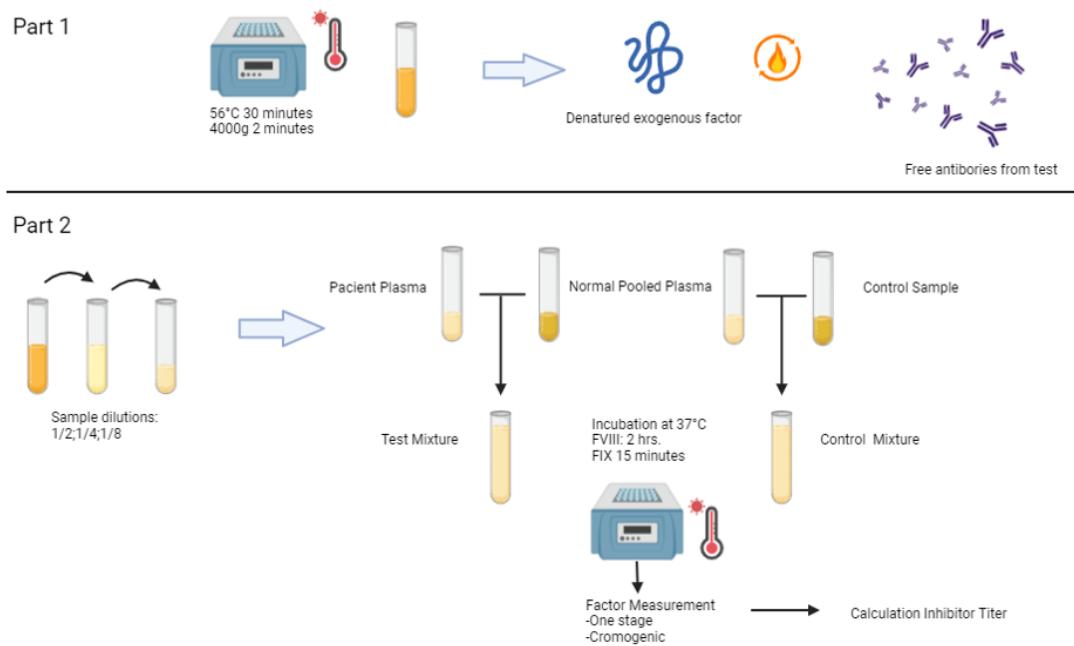


Figure 8. Procédures de dosage des inhibiteurs

Résultats et interprétation : la dilution qui fournit un facteur VIII résiduel le plus proche de 50 %, mais dans la plage de 25 à 75 %, est sélectionnée pour le calcul de l'inhibiteur. Tout facteur VIII résiduel < 25 % ou > 75 % ne doit pas être utilisé pour les calculs du taux d'inhibiteurs. Un graphique du pourcentage de facteur VIII résiduel par rapport aux unités d'inhibiteurs peut être réalisé sur du papier log/log à partir

de la définition de l'unité d'inhibiteur. Lire le taux d'inhibiteur correspondant au facteur VIII résiduel pour chaque mélange à tester et corriger la dilution. Par exemple, si la valeur la plus proche de 50 % du facteur résiduel a été trouvée dans la dilution 1/4 (c'est-à-dire dans le mélange 1/4 + pool normal), le résultat, qui sera proche de 1 unité Bethesda (UB), doit être multiplié par 4.

- ✓ Dilution 1/4 + pool normal
- ✓ FVIII résiduel = 50 %
- ✓ Unité d'inhibiteur (à partir du graphique) = 1 UB
- ✓ Multiplier par le facteur de dilution (1/4) = 4 UB

Remarque : le dosage de l'inhibiteur repose sur la détermination du facteur VIII ou IX résiduel du mélange de plasma à tester et de plasma de contrôle précédemment incubé. Les tests de Bethesda et de Nijmegen ont été développés à l'aide d'un dosage de facteur de coagulation en un temps. Le dépistage des inhibiteurs au moyen de ce test présente toutefois des limites. En effet, la formation de caillots peut notamment être affectée par l'anticoagulant de type lupique (inhibiteurs de la coagulation non spécifiques) et des médicaments tels que l'émicizumab. Le recours à une méthode chromogénique pourrait être une solution pour éviter ces problèmes. Un autre avantage du recours à une méthode chromogénique est la plus grande exactitude des résultats. Un échantillon de patient non dilué avec une activité résiduelle > 75 % peut être rapporté à < 0,4 UB/ml. Pour les inhibiteurs du facteur VIII, le comité scientifique et de normalisation de l'ISTH recommande de considérer un résultat $\geq 0,6$ UB/ml comme positif. En plus de la courbe d'étalonnage, le titrage d'inhibiteur peut être calculé à l'aide de la formule : $(2-\log \%AR)/0,301$. Dans le cas d'un inhibiteur de type I, une courbe du plasma d'un patient montre un parallélisme avec la courbe d'étalonnage. Une absence de parallélisme indique une cinétique différente de type II. Pour les inhibiteurs ayant une cinétique de type II, utiliser la dilution la plus faible qui se rapproche de 50 % de l'activité résiduelle pour le calcul final du titrage d'inhibiteur.

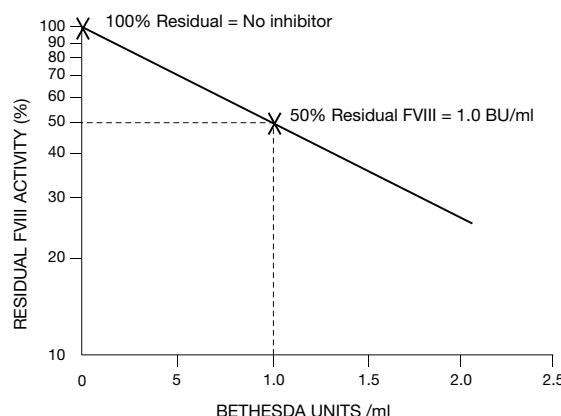


Figure 9. Calcul de l'activité résiduelle du facteur

Remarques : les inhibiteurs fonctionnels les plus courants sont les anticoagulants lupiques, qui ne sont pas dirigés contre les facteurs de coagulation spécifiques et qui doivent être exclus avant le dépistage d'inhibiteurs spécifiques. La quantification du titrage de l'inhibiteur est effectuée en laboratoire, de préférence à l'aide de la méthode Bethesda modifiée par Nijmegen, car cette modification améliore la spécificité et la sensibilité par rapport au dosage Bethesda initial. Les résultats positifs du dosage de l'inhibiteur du facteur VIII inférieurs à 2,0 UB peuvent être confirmés par la méthode chromogénique, car elle présente moins d'interférences analytiques et une plus grande exactitude par rapport à la méthode en un temps. La méthode chromogénique est également le meilleur choix si l'on suspecte la présence d'anticoagulants lupiques dans l'échantillon à tester ou si celui-ci contient des anticoagulants thérapeutiques, tels que l'héparine ou des inhibiteurs directs du facteur Xa ou IIa. Les anticorps anti-FVIII non neutralisants qui ne

sont pas détectés par le test Nijmegen-Bethesda peuvent être cliniquement pertinents, car ils peuvent augmenter la clairance du facteur VIII et être mesurés par ELISA.

Dosages des inhibiteurs du facteur Willebrand : La maladie de Willebrand (mW) est considérée comme le plus fréquent des troubles de la coagulation héréditaires connus chez l'être humain, avec une prévalence dans la population de 1 % et une prévalence symptomatique de 1/1000 (Bowman et al., 2010). Les options thérapeutiques sont notamment la perfusion de concentrés de facteur Willebrand (FW), qui généralement contiennent aussi du facteur VIII, administrés pour prévenir ou traiter les épisodes hémorragiques. Les allo-anticorps anti-FW ont une prévalence comprise entre 7 et 9,5 % (James et al., 2013 ; Pagliari et al., 2023). Dans de tels cas, le traitement par concentrés de FW est inefficace, et des épisodes d'anaphylaxie ont été rapportés avec une exposition ultérieure au FW (James et al., 2013). Comme nous le savons déjà, le déficit en FW peut s'expliquer par différents mécanismes résultant de types d'anomalies génétiques identifiés. Cette variabilité des anomalies génétiques contribue à une hétérogénéité des inhibiteurs ciblant différents épitopes de la molécule de FW. Pour cette raison, la détection de ces anticorps est difficile en laboratoire (Connell et al., 2021 ; Miller, 2021 ; Sarji et al., 1974). En 1974, Sarji et al. (1974) ont signalé pour la première fois un cas d'allo-anticorps anti-FW chez un patient multitransfusé. L'inhibiteur du FW a été mesuré à l'aide d'une méthode analogue à la méthode Bethesda pour les inhibiteurs du facteur VIII (Sarji et al., 1974). Bien qu'il n'y ait pas de standardisation pour l'identification des inhibiteurs du FW, la méthode Bethesda a été utilisée par la plupart des laboratoires (Favaloro et al., 2022), à la différence qu'a été évaluée l'activité du FW plutôt que celle du facteur VIII ou IX. Sont actuellement disponibles différents types de méthodes pour détecter l'activité du FW, avec diverses sensibilités et spécificités ; il est donc important de prendre en considération le fait que cette variabilité des méthodes influence la sensibilité et la spécificité de la détection de ces inhibiteurs (Favaloro et al., 2022). Les anticorps anti-FW n'ont pas pour caractéristique d'être dépendants du temps et de la température, ils peuvent donc être évalués immédiatement après le test de mélange (Sarji et al., 1974). La méthode classique du cofacteur de la ristocétine, qui évalue l'interaction du FW avec les plaquettes fixées en présence de ristocétine, ainsi que la méthode d'évaluation au collagène et la méthode du gain de fonction, sont des options qui ont déjà été évaluées et se sont révélées avoir une bonne sensibilité et une bonne stabilité, bien que présentant des résultats différents, comme évoqué ci-dessus. Les autres méthodes disponibles n'ont pas encore été évaluées pour ce type d'exploration. Des méthodes immunologiques ont aussi été décrites et détectent les anticorps neutralisants et non neutralisants. En lien avec le développement d'auto-anticorps qui caractérisent la mW acquise, les patients ayant des néoplasmes myéloprolifératifs sont un sous-groupe présentant des complications hémorragiques liées à l'activité du FW. Selon la technologie appliquée, de faux résultats sont observés dans les échantillons de patients avec néoplasmes myéloprolifératifs. L'étude en laboratoire des inhibiteurs du FW caractérisés par des allo-anticorps et des auto-anticorps doit être menée avec prudence compte tenu des différentes options méthodologiques. Les performances de toutes les méthodes modernes actuellement disponibles ne sont pas encore claires (Noye et al., 2024 ; Favaloro et al., 2022).

Anticorps anti-médicament dans le laboratoire d'analyse de la coagulation - Émicizumab : l'émicizumab est un anticorps bispécifique qui se lie au facteur IX/IXa et au facteur X/Xa humains et agit comme un mimétique de la fonction du facteur VIII. Il n'est pourtant pas régulé par les mécanismes qui régulent le facteur VIII (Mahlangu et al., 2018, Mahlangu et al., 2022). Le test de dépistage du TCA est considérablement réduit par l'émicizumab (c'est-à-dire en dessous de la plage de référence, quels que soient les réactifs utilisés). L'émicizumab affecte tous les essais et dosages de laboratoire basés sur le TCA. Il interfère aussi avec les dosages chromogéniques du facteur VIII utilisant les facteurs IXa et X humains, mais pas ceux utilisant les facteurs IXa et X d'origine bovine (Bowyer et al., 2021 ; Jenkins et al., 2020). L'émicizumab peut être mesuré et communiqué en µg/ml au moyen d'un dosage en un temps modifié avec une dilution plus élevée de l'échantillon et calibré avec des étalons spécifiques à l'émicizumab. Les anticorps anti-médicament (AAM) peuvent se développer après une dose unique ou l'administration répétée d'une protéine thérapeutique, et affecter la pharmacocinétique, la pharmacodynamique, l'efficacité et/ou l'innocuité de cette protéine thérapeutique. Les études évaluant les caractéristiques des AAM chez

les patients traités par émizumab montrent que le test de TCA peut être allongé en conjonction avec des épisodes hémorragiques en présence d'anticorps à action neutralisante (Novembrino et al., 2023 ; Valsecchi et al., 2021). Dans ce cas, lorsque le taux d'émizumab était mesuré, il montrait une réduction significative. L'activité neutralisante de ces anticorps n'a pas été clairement identifiée dans les méthodes fonctionnelles, même pour le test Bethesda modifié (Kaneda et al., 2021). Le taux de l'unité Bethesda identifiée semble être plus faible que prévu par rapport au test qui mesure le taux d'émizumab. Le rôle des tests fonctionnels pour les AAM n'a pas encore été établi, mais ces tests peuvent venir compléter la mesure du taux plasmatique du médicament dans ces circonstances. La FMH recommande de mesurer les taux d'émizumab à l'aide d'un dosage en un temps modifié avec une dilution plus élevée de l'échantillon et calibré avec des étalons spécifiques à l'émizumab (Srivastava et al., 2020).

Références

- 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, Badiee 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.