

## PFA-100: una nueva prueba de función plaquetaria sustituta del tiempo de sangría

PFA-100: a platelet function test as a substitute for the bleeding time

Germán Campuzano-Maya, MD<sup>1</sup>

**Resumen:** El PFA-100, por Platelet Function Analyzer (Analizador de Función Plaquetaria) es una nueva herramienta para la investigación de la hemostasia primaria, descrita e introducida al laboratorio clínico a partir de 1995, actualmente disponible en el medio. El PFA-100 se fundamenta en un instrumento (PFA-100 o PFA-200), que simula la circulación sanguínea, y dos cartuchos de reactivos que contienen membranas impregnadas de colágeno/epinefrina y colágeno/ADP, que simulan los tejidos. Desde el punto de vista técnico, la prueba es equivalente in vitro al tiempo de sangría tradicional in vivo, por lo que también se la conoce como tiempo de sangría in vitro. El PFA-100 se puede utilizar en diferentes situaciones médicas: (1) como una prueba sustituta del tiempo de sangría, (2) como una prueba tamiz de una disfunción plaquetaria ya sea congénita o adquirida, (3) como una prueba de monitoreo en el manejo de enfermedades congénitas de la función plaquetaria y en particular de la enfermedad de von Willebrand, (4) como una prueba de diagnóstico y control en el caso de la resistencia a la aspirina y la resistencia al clopidogrel, (5) como una prueba de control de calidad en el banco de sangre; y (6) como una prueba médico-legal en el diagnóstico diferencial de las enfermedades hematológicas con manifestaciones hemorrágicas y el maltrato infantil, entre otras muchas indicaciones. El tiempo de sangría ha pasado a ser una prueba obsoleta, no recomendada en la práctica clínica por organizaciones como el Colegio Americano de Patología (CAP) y la Sociedad Americana de Patología Clínica (ASCP), y como tal debería desaparecer de los portafolios de servicio de los laboratorios clínicos. Hay suficiente evidencia de que el PFA-100, además de ser una prueba no invasiva, sustituye con mejores indicadores analíticos, como la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo, al tiempo de sangría en el estudio de los pacientes con sospecha de tener trastornos funcionales de las plaquetas. En este módulo se presenta la nueva prueba a la comunidad médica y a los profesionales del laboratorio clínico y se enfatiza en su utilización en la práctica médica del día a día y se abordan los problemas técnicos que el laboratorio clínico debe abordar al momento de ofrecerla como una nueva prueba.

**Palabras claves:** Tiempo de sangría, trastornos de las plaquetas sanguíneas, pruebas de función plaquetaria, agregación plaquetaria, resistencia a medicamentos, inhibidores de agregación plaquetaria.

**Summary:** Platelet Function Analyzer (PFA) is a new tool for the investigation of primary hemostasis. It was introduced in the clinical laboratory since 1995 and is currently available as diagnostic tests. The PFA is based on an instrument (PFA-100 and PFA-200), which simulates the blood flow, and two cartridges containing membranes impregnated with collagen/epinephrine and collagen/ADP, which simulate the tissue. From a technical point of view, the test is an In vitro equivalent to In vivo test known as bleeding time. The PFA-100 can be used in different medical situations: (1) as a screening test of platelet dysfunction either congenital or acquired, (2) as a diagnostic test in the case of aspirin and

<sup>1</sup> Médico especialista en Hematología y Patología clínica. Docente, Ad Honorem, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. Médico director, Laboratorio Clínico Hematológico. Correspondencia: Carrera 43c No. 5-33, Medellín, Colombia. E-mail: gcm@lch.co.

Conflicto de intereses: el autor declara que no tiene conflicto de intereses.

Medicina & Laboratorio 2013; 19: 511-548.

Módulo 1 (La clínica y el laboratorio), número 101. Editora Médica Colombiana S.A. 2013®.

Recibido el 13 de Octubre de 2013; aprobado el 20 de Diciembre de 2013.

*clopidogrel resistance, (3) as a screening test in the case of follow-up of patients with von Willebrand disease undergoing treatment with desmopressin, (4) as quality control test in blood bank, in the case of platelet transfusions; and (5) as a legal-medical test in the differential diagnosis of hematological diseases with mucocutaneous manifestations and child abuse, among many other indications. The bleeding time has become an outdated test, it is not recommended in clinical practice by organizations as the College of American Pathologists and the American Society for Clinical Pathology, and should be removed from clinical laboratories services. There are enough evidence that the PFA-100, in addition to being a noninvasive test, can replace the bleeding time with better analytical indicators, such as sensitivity, specificity, positive and negative predictive value in the suspected of platelet function disorders. In this module is presented to the medical community and clinical laboratory professionals a new test for platelet function analysis with emphasis in the daily medical practice and technical issues in the clinical laboratory when it is offer as a new test.*

**Key word:** *Platelet aggregation, bleeding time, blood platelet disorders, platelet function tests, drug resistance, platelet aggregation inhibitors.*

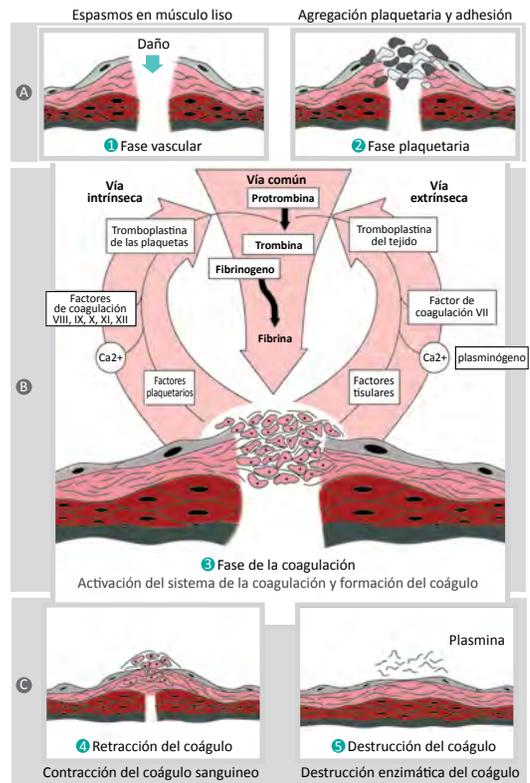
**Campuzano Maya G.** *PFA-100: una nueva prueba de función plaquetaria sustituta del tiempo de sangría. Medicina & Laboratorio 2013;19:511-548.*

Las pruebas de función plaquetaria cada vez toman mayor importancia en la práctica clínica debido a que se requieren para el estudio de pacientes con manifestaciones hemorrágicas mucocutáneas, para el estudio del riesgo hemorrágico intra, peri y posoperatorio en pacientes quirúrgicos y para el control de pacientes que reciben terapia antiplaquetaria para la prevención y el manejo de enfermedades trombóticas [1], entre otras muchas circunstancias. Además de lo anterior, con la incorporación de nuevas tecnologías a los laboratorios clínicos para determinar la función plaquetaria, como la agregometría plaquetaria [2] y el PFA-100® (Siemens Healthcare Diagnostics, Inc., Deerfield, IL) por su sigla en inglés de *Platelet-Function Analyzer* [3], no solo se han desplazado métodos obsoletos, poco sensibles, poco específicos e inconvenientes; por ser invasivos, como el tiempo de sangría [4], por métodos más sensibles, más específicos y más convenientes; por ser no invasivos. Como ha sucedido en los últimos años, se han abierto nuevas oportunidades, de gran utilidad clínica, para los pacientes y para sus médicos tratantes, con la disposición de estas nuevas pruebas en los laboratorios clínicos en el diagnóstico y en el manejo de las trombocitopatías adquiridas o congénitas, con reducción de accidentes quirúrgicos de tipo hemorrágico y con la posibilidad de monitorear a los pacientes que reciben tratamiento antiplaquetario con aspirina [5-7] y otros nuevos medicamentos desarrollados con este fin, como el clopidogrel [7-11], el prasugrel [12, 13] y el ticagrelor [14], entre otros, de uso cada vez más frecuente en la práctica médica [15]. Además de las necesidades que tienen los clínicos de estas nuevas pruebas, la incorporación de esta tecnología a los laboratorios clínicos es una buena oportunidad para ampliar las fronteras tecnológicas de los laboratorios clínicos colombianos.

El objetivo de este módulo, basado en una exhaustiva revisión de la literatura médica mundial (PubMed) y de la literatura médica regional (SciELO), es actualizar las herramientas que el laboratorio clínico provee al médico para el estudio y manejo de las enfermedades relacionadas con la función de las plaquetas y el manejo de la anticoagulación mediante la intervención de la función plaquetaria. Además, llamar la atención sobre esta nueva tecnología, para que en el futuro, los laboratorios clínicos la incluyan en sus portafolios de servicio como alternativa a pruebas, que como el tiempo de sangría, han cumplido su ciclo al ser reemplazadas por pruebas con mayor sensibilidad y especificidad, y menor molestia para los pacientes y para que la comunidad médica la incorpore en su actividad del día a día.

## Fisiología de las plaquetas

La hemostasia es el resultado de una serie de procesos perfectamente regulados que cumplen dos funciones: (1) mantener la sangre en estado líquido y (2) estar preparada para cohibir, rápidamente, la pérdida de sangre tras la pérdida de la integridad vascular, mediante mecanismos interdependientes, que se analizarán a continuación. En la hemostasia participan cuatro elementos a saber: los tejidos, las plaquetas, las proteínas (factores de la coagulación) y los mecanismos de fibrinólisis, que al final del proceso restituyen los vasos sanguíneos lesionados. A pesar de que la hemostasia es un sistema integrado, en donde la mayoría de los actores, tejido, plaquetas, factores de coagulación y de fibrinólisis; permanecen inactivos o “apagados” a no ser que se estimulen e inicien la cadena de eventos que lleven a la formación de un trombo y posterior resolución. En la práctica se reconocen dos sistemas independientes: (1) la hemostasia primaria, para referirse a los procesos de interacción del endotelio y las plaquetas, con la formación de un “trombo blanco” y (2) la hemostasia secundaria, para referirse a la serie de eventos que llevan a la formación de un “trombo rojo”, que partiendo del trombo blanco se forma con la fibrina un trombo con mayor cohesión y fuerza para cohibir la hemorragia en la etapa final. Una vez que se ha cohibido la hemorragia tras la retracción del coágulo, en la etapa final, los mecanismos de fibrinólisis producen destrucción del coágulo, con la restitución del endotelio y la luz vascular [16-18]. En la **figura 1** se presenta un esquema de la hemostasia.



**Figura 1.** Esquema de la hemostasia. (A) Hemostasia primaria compuesta por (1) la fase vascular y (2) la fase plaquetaria; (B) hemostasia secundaria con sus vías (1) intrínseca, (2) extrínseca y (3) común; y, (C) fibrinólisis.

## Hemostasia primaria

La hemostasia primaria se centra en la interacción del endotelio vascular y las plaquetas circulantes y depende de la integridad de todos los elementos que en ella participan. Las plaquetas que han sido liberadas de los megacariocitos, en donde se producen a nivel de la médula ósea, tienen una forma plana y discoidea, miden 3 x 5 µm, tienen un tamaño (volumen medio plaquetario) de 6 a 10 femtolitros y una vida media de 7 a 10 días [19]. La hemostasia primaria se inicia a partir del momento en que el endotelio vascular es lesionado y termina cuando las plaquetas han formado un trombo blanco, suficiente para cohibir la hemorragia en las primeras etapas de la hemostasia. A su vez, la hemostasia primaria se compone de dos eventos: la vasoconstricción y la formación del trombo blanco, propiamente dicho.

## ■ Vasoconstricción

La vasoconstricción o vasoespasmo es un fenómeno local que se produce cuando se lesionan los vasos sanguíneos como resultado de un reflejo neurógeno y también por un efecto relacionado con la presencia de sustancias, como el tromboxano  $A_2$  y la serotonina, que se liberan a partir de las plaquetas. La vasoconstricción se produce inmediatamente se presenta el daño del endotelio vascular y dura alrededor de 20 segundos, siendo suficiente para cohibir la hemorragia, al menos en los pequeños vasos, antes de que se desarrollen y entren en acción las funciones procoagulantes de las plaquetas, en la primera etapa, y los factores de la coagulación en la segunda etapa.

## ■ Formación del trombo blanco

El trombo blanco, también conocido como trombo plaquetario o coágulo plaquetario, se forma a partir de las plaquetas en tres eventos claramente identificados, en forma secuencial, uno tras otro, a saber: adhesión, activación y agregación plaquetaria, que se definen a continuación [19]:

- Adhesión plaquetaria: al romperse el endotelio vascular quedan expuestas fibras de colágeno que atraen al sitio de la lesión plaquetas circulantes, las cuales se unen al colágeno gracias a los receptores que poseen;
- Activación plaquetaria: las plaquetas, una vez que se han adherido al tejido lesionado (colágeno endotelial) se activan liberando adenosina difosfato (ADP), serotonina y tromboxano  $A_2$ ; con lo cual atraen y adhieren más y más plaquetas a la zona lesionada, secretando al plasma su contenido en los gránulos. De los gránulos densos se libera calcio, serotonina y ADP y de los gránulos alfa se libera fibrinógeno, factor von Willebrand, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, factor 4 plaquetario, fibronectina, alfa-1 antitripsina, fibronectina y betatromboglobulina; y, finalmente,
- Agregación plaquetaria: en donde las plaquetas, una vez adheridas y activadas interactúan entre sí para formar un trombo blanco, que, además de plaquetas tiene algunos eritrocitos, que es suficiente para cohibir la hemorragia por unos minutos, hasta que se forme el trombo rojo, más estable y fuerte, a partir del fibrinógeno mediante de la cascada de la coagulación (hemostasia secundaria), que se analizará a continuación.

## ■ Hemostasia secundaria

La hemostasia secundaria se centra en la formación del coágulo de fibrina mediante la cascada de la coagulación que convierte el fibrinógeno en una poderosa red, que junto con el trombo blanco y los eritrocitos circulantes, cohibe en forma efectiva la hemorragia. Para la formación del coágulo de fibrina confluyen tres vías: la vía intrínseca, la vía extrínseca y la vía común, que podrían resumirse bajo los siguientes conceptos:

- Vía intrínseca: o de contacto, en donde la activación secuencial de los factores XII, XI, IX y VIII y proteínas plasmáticas como la calicreina, forman un complejo con el factor X;
- Vía extrínseca: en donde tras la activación secuencial del factor tisular y el factor VII forman un complejo con el factor X y el calcio; y, finalmente,
- Vía común: con la activación secuencial de los factores X, V, II y I se genera la trombina y la fibrina que forman una red proteica fuerte que cohibe la hemorragia.

## ■ Fibrinólisis

Tras la formación del tapón hemostático, y cohibida la hemorragia este debe ser eliminado para autolimitar el proceso. Se convierte el plasminógeno en plasmina, y esta fragmenta la fibrina, que posteriormente se elimina por el sistema monocito-macrófago. Las principales sustancias activadoras de la fibrinólisis son el activador tisular del plasminógeno (tPA), el cual es el más importante, la urocinasa y los fragmentos del factor XII.

## Enfermedades relacionadas con la función plaquetaria

Desde el punto de vista clínico, las alteraciones de la función plaquetaria, o trombocitopatías como técnicamente se deberían denominar, son defectos funcionales de las plaquetas, ya sea congénitos o adquiridos. En la **tabla 1** se relacionan las principales alteraciones de la función plaquetaria.

## Métodos convencionales para el estudio de la función plaquetaria

A partir de 1910, cuando se desarrolló el tiempo de sangría para el estudio de la función plaquetaria *in vivo* [20], la comunidad científica y la comunidad médica han incorporado pruebas con el mismo fin pero más específicas, sensibles y menos invasivas, como sucede en la actualidad con el PFA-100, objeto de este módulo. Tanto para el profesional médico, como para los profesionales del laboratorio clínico, es importante conocer las pruebas de función plaquetaria que han precedido a la nueva prueba a continuación, se presentará un somero análisis de las de mayor utilidad en la clínica, la mayoría de ellas vigentes en la actualidad.

## Tiempo de sangría

El tiempo de sangría fue descrito por Duke en 1910 [20] y a través del tiempo ha tenido múltiples modificaciones, hasta llegar al “tiempo de sangría estandarizado”, considerado como el “estándar de oro” de la prueba [21], como se muestra en la **figura 2**; llegando a ser la única prueba de tamizaje disponible, a nivel del laboratorio clínico, para analizar la función plaquetaria en el entorno de la hemostasia primaria por muchos años. El tiempo de sangría, es una prueba invasiva, ya que al paciente se le debe hacer una incisión en

**Tabla 1. Alteraciones de la función plaquetaria**

### Desordenes de adhesión

Hereditarios

Enfermedad de von Willebrand

Síndrome de Bernard Soulier

Adquiridos

Uremia

Enfermedad de von Willebrand adquirida

### Desordenes de agregación

Hereditarios

Trombastenia de Glanzmann

Afibrinogenemia

Adquiridos

Inhibición de productos de degradación de la fibrina

Disproteinemias

Drogas (ver **tablas 3 y 4**)

### Desordenes de liberación de gránulos

Hereditarias

Albinismo oculocutáneo

Deficiencia de gránulos densos (gránulos delta)

Deficiencia de gránulos alfa o beta

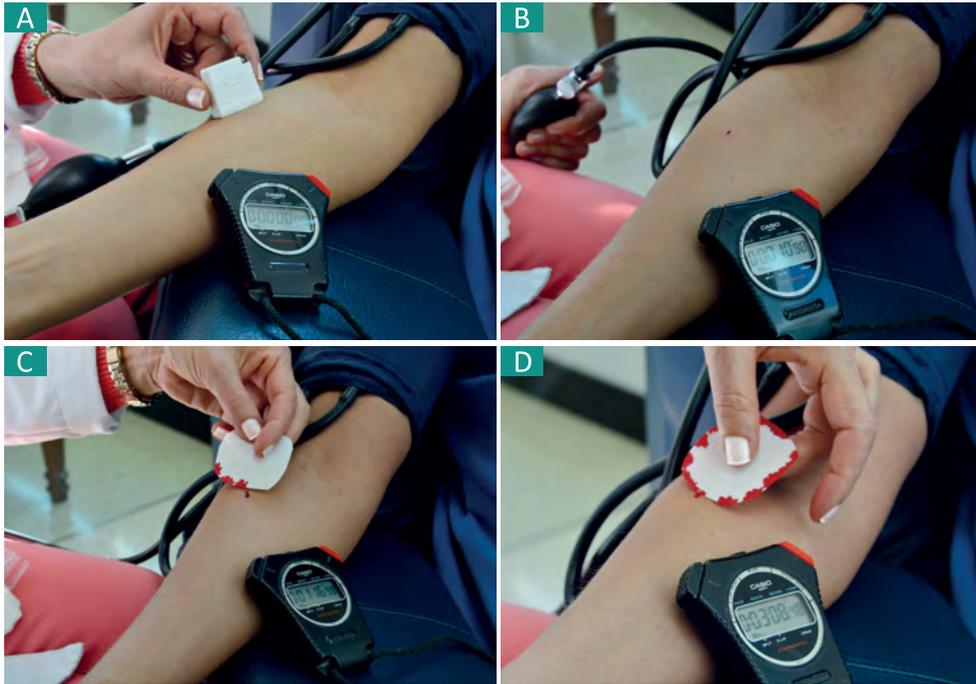
Síndrome de plaqueta gris

Adquiridas

Puentes coronarios

Enfermedades mieloproliferativas

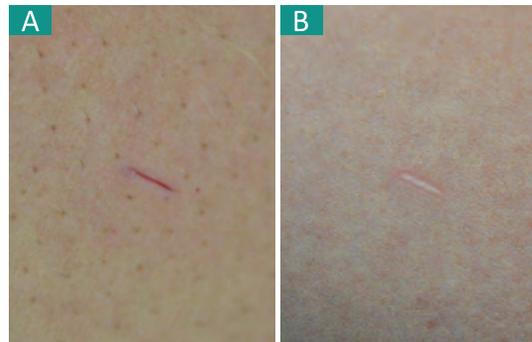
Drogas (ver **tablas 3 y 4**)



**Figura 2.** Tiempo de sangría. Tiempo de sangría estandarizado (marca). (A) Preparación de la prueba; (B) iniciación de la prueba; (C) curso de la prueba; y, (D) final de la prueba. Cortesía del Laboratorio Clínico Hematológico, Medellín, Colombia.

el antebrazo, la cual puede tener mala cicatrización, incluida la formación de queloides [22], como se observa en la **figura 3**. El tiempo de sangría es una prueba operario-dependiente, lo que la hace que no sea reproducible, y paciente-dependiente, afectada por numerosos factores técnicos como el sitio en donde se hace la incisión, la presión aplicada y la experiencia del operador y factores del paciente como el género, la edad, la dieta, el tipo de piel y los medicamentos, entre otras variables.

El tiempo de sangría, a partir de los estudios de Harker y colaboradores, que mostraron que este se correlacionaba con el recuento de plaquetas y con la tendencia hemorrágica en pacientes con trombocitopenia y con uremia, se incorporó a la práctica clínica como una prueba prequirúrgica en la década de los setenta [21]. Sin embargo, estudios posteriores pusieron de manifiesto sus limitaciones técnicas y su desempeño analítico, representado en falta de reproducibilidad, escasa sensibilidad y su carácter de prueba invasiva, hasta que a finales de la década de los 90, cuando el CAP (*College of American Pathologists*) y la ASCP (*American Society for Clinical Pathologists*) demostraron un pobre desempeño de la prueba. Los factores más relevantes representados particularmente, en (1) que en ausencia de una his-



**Figura 3.** Tiempo de sangría. (A) Corte en el antebrazo producido con una cuchilla de tiempo de sangría estandarizado; (B) cicatriz (con algún grado de queloide) en el antebrazo, como consecuencia de un tiempo de sangría estandarizado. Cortesía del Laboratorio Clínico Hematológico, Medellín, Colombia.

toria, personal o familiar, de un trastorno de la coagulación, el tiempo de sangría no predice el riesgo del sangrado quirúrgico; (2) que un tiempo de sangría normal no excluye la posibilidad de sangrado durante el acto quirúrgico; y, (3) que el tiempo de sangría no logra identificar a los pacientes que han tomado medicamentos que inducen defectos plaquetarios, como frecuentemente sucede con la aspirina, de aquellos que no los han tomado, por lo cual retiraron la recomendación de su empleo como prueba prequirúrgica para predecir el riesgo hemorrágico. Como consecuencia de lo anterior el tiempo de sangría, como tal debería desaparecer de los portafolios de servicios de los laboratorios clínicos [4], como realmente empieza a suceder, y así como aconteció con el tiempo de coagulación (Lee-White), a partir del momento en que se dispuso del tiempo parcial de tromboplastina [23], como prueba substituta, hasta que finalmente el tiempo de coagulación paso a ser una prueba histórica, fuera de los portafolios de los laboratorios clínicos, como actualmente acontece en casi todo el mundo.

## Agregación plaquetaria

La agregación plaquetaria (agregometría) es el método de referencia y el más utilizado en la identificación y el diagnóstico de las alteraciones funcionales de las plaquetas [24]. La agregometría se desarrolló a principio de la década de los 70 y se basa en medir el aumento en la transmisión de luz a través de una muestra de plasma rico en plaquetas, mantenida en agitación, tras inducir la agregación plaquetaria con un agonista (como ADP, colágeno, epinefrina, ristocetina y ácido araquidónico, entre otros agonistas) [2]. La gran ventaja de la agregación plaquetaria es su flexibilidad en cuanto a los agonistas y las concentraciones utilizadas, lo que permite obtener información relevante sobre distintos aspectos de la bioquímica y función de las plaquetas. En nuestro medio, el uso de la agregación plaquetaria cada vez es más frecuente [2].

Así como la agregometría plaquetaria tiene ventajas, también tiene limitaciones, en donde se destaca el hecho de que mide la respuesta plaquetaria bajo condiciones no fisiológicas, en una mezcla de plaquetas aisladas de las otras células que componen la sangre, con una agitación equivalente a una baja velocidad de turbulencia y tras la adición arbitraria de diferentes agonistas a diversas concentraciones [2]. Además, para hacer la prueba, se requiere un volumen grande de sangre y su uso está limitado por el recuento de plaquetas (pobre desempeño en trombocitopenia). Como si lo anterior fuese poco, la agregometría plaquetaria como prueba de laboratorio de rutina tiene un coeficiente de variación inter e intralaboratorio muy elevado [24], restringiendo su uso a laboratorios clínicos especializados y cuando las pruebas de tamizaje, como algunas de las que se analizarán en este módulo, incluido el PFA-100, indiquen su uso [2]. En la práctica, la agregometría plaquetaria debe ser una prueba de segunda línea, para ser practicada solo por laboratorios clínicos de alto grado de complejidad y especializados en estas áreas del laboratorio clínico y solo cuando se tenga una sospecha clínica o una prueba tamiz positiva (alargada), como el PFA-100 [2].

## Citometría de flujo

La introducción de la citometría de flujo en los estudios de función plaquetaria es uno de los mayores avances en el estudio de las plaquetas [25-27]. A pesar de que los estudios plaquetarios con citometría de flujo son muy poco utilizados en la práctica clínica, al menos en nuestro medio, y solo los laboratorios clínicos especializados están en condiciones de ofertarla, esta metodología se ha incorporado a los contadores de células de última generación, que además de hacer recuento de plaquetas por citometría de flujo, han permitido el desarrollo de nuevos parámetros plaquetarios como el índice de plaquetas inmaduras o plaquetas reticuladas,

como un índice de regeneración plaquetaria (trombocitopenia), equiparable al recuento de reticulocitos, en el caso de la eritropoyesis [28].

## Microscopía electrónica

El uso de la microscopía electrónica para el estudio de la función plaquetaria solo está disponible para investigación, en donde es clave para el conocimiento básico de la morfología y la estructura de las plaquetas, así como los cambios que estas experimentan durante su activación. La microscopía electrónica es importante en el estudio de pacientes con enfermedades que afectan la ultraestructura íntima de las plaquetas, como las enfermedades de los gránulos [29], así como la dinámica de la interacción de las plaquetas con otras células y con el sistema de la coagulación en la formación del trombo [30]. Gracias a la microscopía electrónica se descubrieron los gránulos de Weibel-Palade en la enfermedad de von Willebrand [31].

## Pruebas bioquímicas para evaluar la función plaquetaria

Además de las pruebas de función plaquetaria antes citadas, se han desarrollado pruebas bioquímicas para estudiar algunos aspectos funcionales de las plaquetas [32], más desde la investigación, que de su uso clínico. En la investigación relacionada con la función de las plaquetas se han utilizado métodos bioquímicos, como el inmunoanálisis enzimático o el radioinmunoanálisis (ELISA o RIA), para estudiar la activación y la secreción plaquetaria que miden la concentración de proteínas granulares como la beta-tromboglobulina, el factor plaquetario 4 (PF4) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) [32]. También se puede valorar la función plaquetaria utilizando plaquetas con serotonina marcada con carbono 13 (<sup>13</sup>C-serotonina) antes de la estimulación con agonistas similares a los utilizados en la agregometría [33]. Esta última metodología sigue siendo el método de referencia en el diagnóstico de la trombocitopenia inducida por mecanismos inmunológicos, como sucede con la trombocitopenia inducida por heparina [33]. Otros métodos bioquímicos son los ensayos de unión con ligandos plaquetarios como ADP, trombina, fibrinógeno, colágeno y factor von Willebrand, entre otros [32]. Otras mediciones bioquímicas relacionadas con la función plaquetaria son la medición del tromboxano A2 o inhibidores de la agregación como el AMPc [32].

## PFA-100, un nuevo método para el estudio de la función plaquetaria

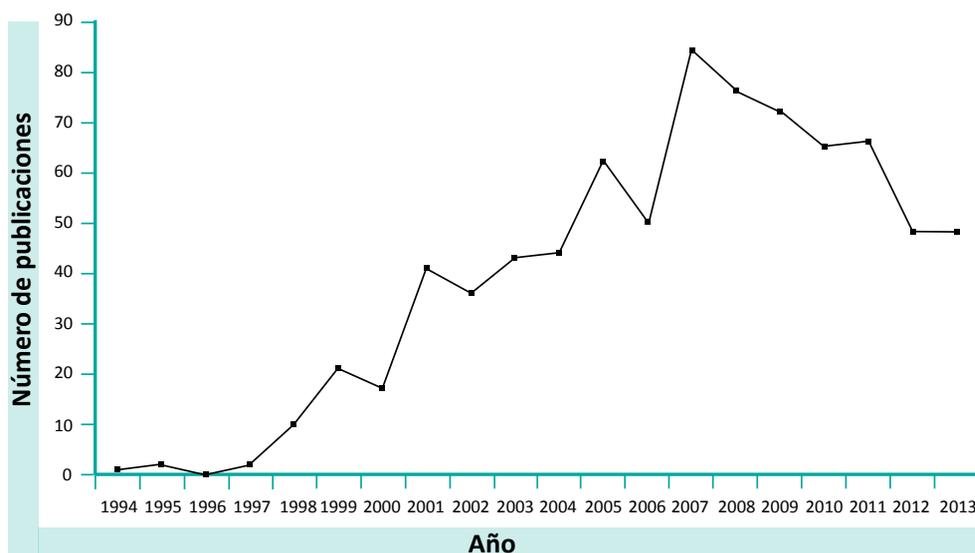
En las últimas décadas se ha venido trabajando en el desarrollo de métodos con mejores indicadores analíticos (sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo) y más amigables con los pacientes (menos invasivos) para el estudio de la función plaquetaria, como la tromboelastografía mediante el uso del tromboelastógrafo [34, 35] y el PFA-100 [36-38], objeto de este módulo de educación continuada.

## Breve historia del PFA-100

El PFA-100 nace en 1985 cuando Kratzer y colaboradores, en Suiza, presentaron un sistema de una prueba que simulaba la hemostasia primaria in vitro [39, 40] y, desde el primer momento, el prototipo de este nuevo sistema mostró promisorios resultados [41]. El PFA-100 se fundamentó en el prototipo antes citado [41] y fue introducido como una prueba de laboratorio para uso clínico de rutina, en la evaluación de la hemostasia primaria, en 1994 [36], como una alternativa,

no invasiva y con mejor desempeño analítico, al tiempo de sangría, por lo que también se le conoce como tiempo de sangría *in vitro*.

Para tener una idea de la aceptación del PFA-100 en la comunidad médica, en la **figura 4** se muestra el crecimiento de los artículos relacionados con el PFA-100 en la literatura médica mundial indexada, desde el momento en que introdujo a la práctica médica la prueba, en 1994 [36] hasta el momento en que se concluye este módulo (finales del 2013), con una publicación cada seis días en promedio, en los últimos 10 años (2004-2013); cuando la prueba ya ha sido incorporada a la rutina de los laboratorios clínicos de la mayoría de los países desarrollados, como una prueba substituta del tiempo de sangría, que se considera obsoleta y no recomendada por el CAP y la ASCP [4]. El PFA-100 está incluido en las últimas revisiones de los textos de hematología [19] y de coagulación [42] y es así como ya se ha incluido en el portafolio de servicios de algunos laboratorios clínicos especializados del país, como el Laboratorio Clínico Hematológico en Medellín, Colombia, pero ausente en el sistema de salud social colombiano.



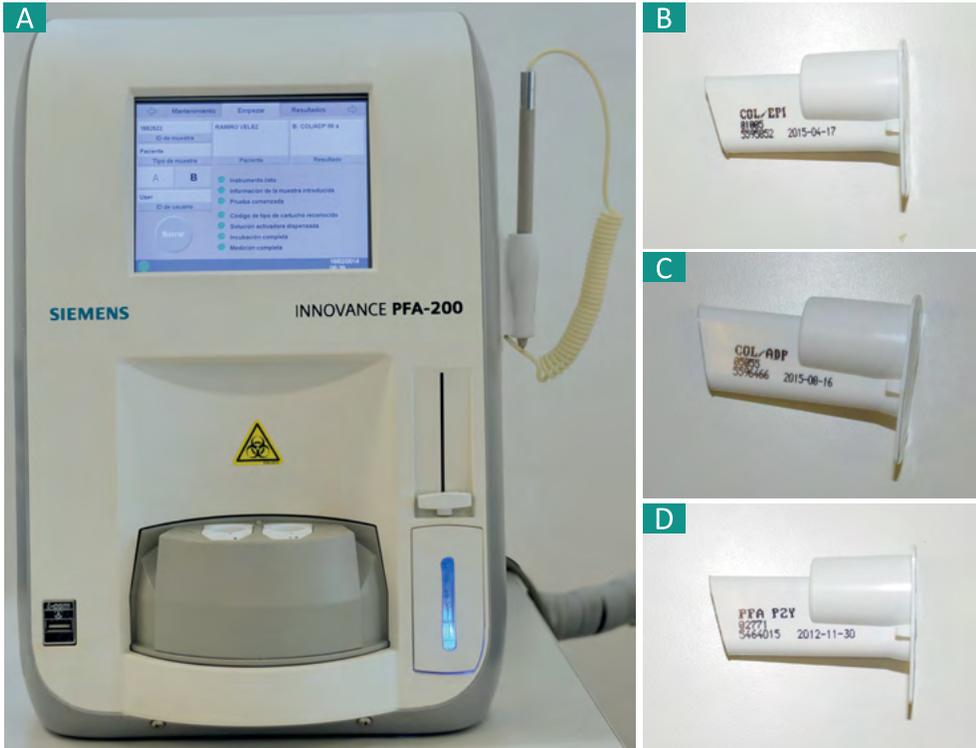
**Figura 4.** Evolución del número de publicaciones relacionadas con el PFA-100, a partir de su descripción en 1994 [36], hasta finales de 2013. Fuente: PubMed.

## Fundamento del PFA-100

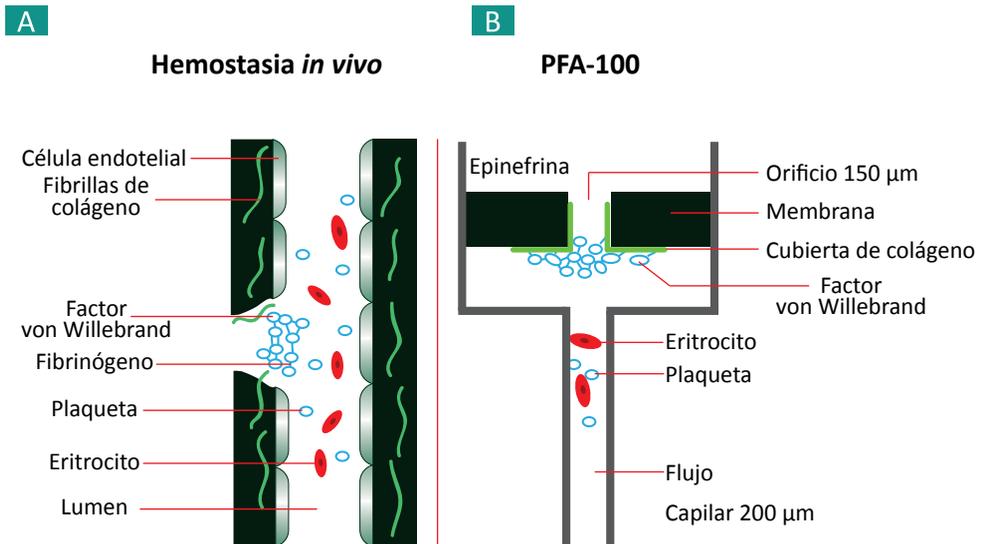
El sistema consta de un instrumento y estuches de reactivos, como se muestra en la **figura 5**.

### ■ El instrumento

El instrumento es un microprocesador, con su respectivo *software*, que simula *in vitro* las condiciones hemodinámicas de la adhesión y agregación de las plaquetas tras una lesión vascular proveyendo una detección simple, rápida y costo-eficiente de las alteraciones funcionales de las plaquetas, tanto adquiridas como genéticas [43]. El instrumento, junto con los cartuchos de reactivos, simulan la hemostasia primaria, como se esquematiza en la **figura 6**. La versión original del instrumento se le conoció como PFA-100, en tanto que la segunda versión, mas sistematizada y con mayor eficiencia se la conoce como Innovance PFA-200® (*Siemens Healthcare Diagnostics, Inc., Deerfield, IL*). El instrumento guarda 1.200 resultados, reconoce las muestras con código de barras y entrega resultados en menos de 10 minutos.



**Figura 5.** Innovance PFA-200® (Siemens Healthcare Diagnostics, Inc., Deerfield, IL). (A) Instrumento, segunda versión del instrumento original, el PFA-100, con un nuevo módulo para estudio de resistencia a clopidogrel; (B) cartuchos de reactivos (colágeno/epinefrina); (C) cartuchos de PFA-100 cargados con muestra de sangre. Cortesía Laboratorio Clínico Hematológico, Medellín, Colombia.



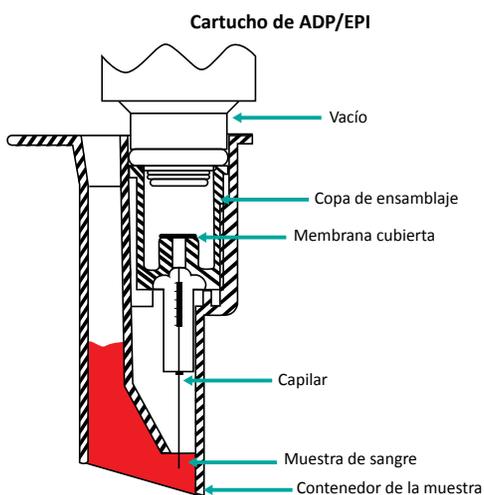
**Figura 6.** (A) Tiempo de sangría *in vivo*, versus (B) tiempo de sangría *in vitro* (PFA-100).

## ■ Los cartuchos

Los cartuchos de prueba, desechables y para uso único, constan de una serie de piezas integradas, entre las que se incluye un capilar, un reservorio para la muestra y una membrana con actividad bioquímica que presenta una abertura central. La sangre anticoagulada es aspirada de la reserva a través del capilar y de la abertura de manera que las plaquetas presentes en la muestra estén en contacto con la membrana bioquímica gracias a una gran fuerza de cizallamiento generado por la presión negativa que el instrumento ejerce sobre el cartucho. En la **figura 7** se muestra esquemáticamente un cartucho de PFA-100 y en la **figura 8** una membrana bioquímica de un cartucho de PFA-100 [38]. El sistema PFA-100® permite la detección de anomalías de la función plaquetaria, ya sean congénitas, adquiridas o inducidas por inhibidores de la agregación plaquetaria. Hasta el momento (finales de 2013), para uso clínico a nivel del laboratorio clínico se dispone de tres tipos de cartuchos a saber:

■ Colágeno/epinefrina (Col/EPI o CEPI)® (Siemens Healthcare Diagnostics, Inc., Deerfield, IL) [36, 37]: fundamentalmente se utiliza para reconocer una alteración de la función plaquetaria inducida por defectos intrínsecos de las plaquetas, enfermedad de von Willebrand o por la ingestión de inhibidores de la agregación plaquetaria, como la aspirina. El cartucho colágeno/epinefrina contiene una membrana de reacción recubierta con 2 µg de colágeno tipo I y 10 µg de bitartrato de epinefrina.

■ Colágeno/ADP (Col/ADP o CADP)® (Siemens Healthcare Diagnostics, Inc., Deerfield, IL) [36, 37]: complementario al anterior, permite comprobar que los resultados anormales obtenidos con el cartucho Col/EPI pueden estar relacionados o no relacionados con el consumo de ácido acetilsalicílico (aspirina) o por otros medicamentos que contengan aspirina. El cartucho colágeno/ADP contiene una membrana de reacción recubierta con 2 µg de colágeno

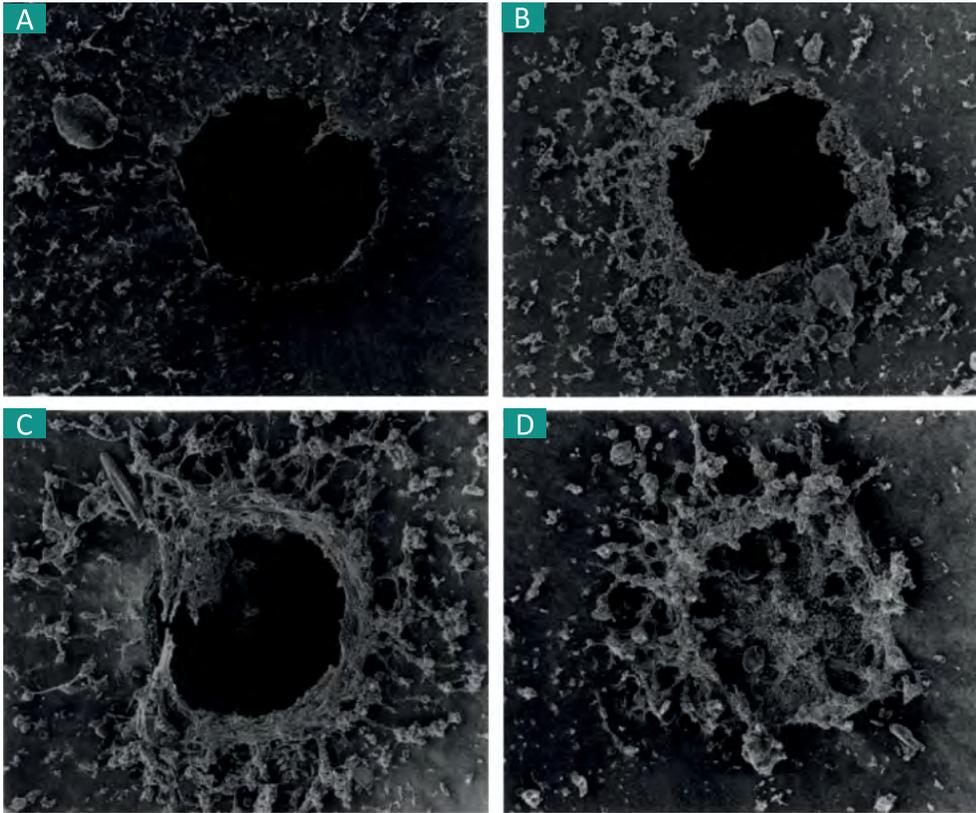


**Figura 7.** Esquema interno del cartucho de PFA-100. La sangre citratada es forzada a pasar a través de una pequeña membrana (membrana bioquímica) impregnada de reactivos (agonistas) que interactúan con las plaquetas, que por su acción se agrupan obstruyendo el flujo que se mide en segundos, como tiempo de cierre (Siemens Healthcare Diagnostics, Inc., Deerfield, IL).

tipo I y 50 µg de adenosin-5'-difosfato (ADP).  
 ■ Innovance PFA-P2Y (PFA-P2Y)® (Siemens Healthcare Diagnostics, Inc., Deerfield, IL): cartucho desarrollado específicamente para evaluar la antiagregación plaquetaria con clopidogrel. Similar al funcionamiento de los cartuchos colágeno/epinefrina y colágeno/ADP que se usa en el PFA-100 convencional, en el caso del Innovance PFA-P2Y la membrana PFA-P2Y está impregnada con 20 µg ADP, 5 ng de prostaglandina E1 y 459 µg cloruro de calcio [44].

## Valores de referencia del PFA-100

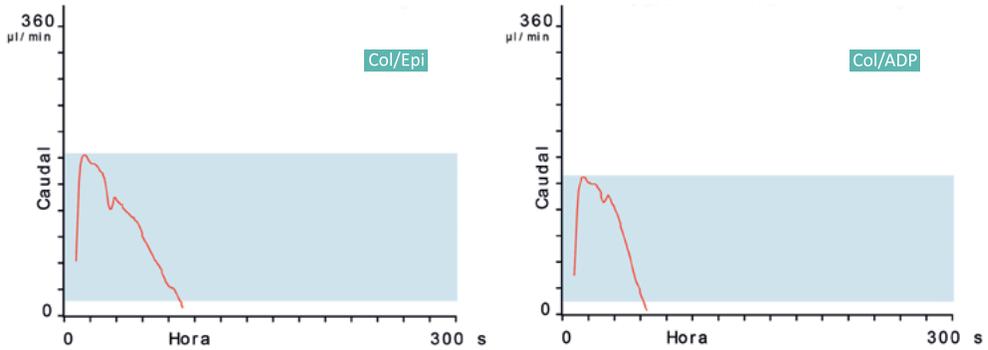
Los valores de referencia del PFA-100, debido a que es una prueba cerrada varían muy poco de un laboratorio a otro. De acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio, cada laboratorio clínico debe definir sus respectivos valores de referencia de acuerdo con la población a la cual presta sus servicios. Tras la medición del PFA-100 en 193 pacientes



**Figura 8.** Membrana bioquímica de PFA-100. Micrografías electrónicas de barrido que muestra la progresión de la formación del tapón plaquetario en la abertura de la membrana de un estuche de PFA-100. Los ensayos se terminaron a los 15, 45, 80 y 110 segundos (tiempo de cierre). Tomado con autorización de **Kundu SK, Heilmann EJ, Sio R, Garcia C, Ostgaard RA.** Characterization of an in vitro platelet function analyzer, PFA-100. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis: official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 1996;21:241-249 [38].

sanos, utilizando citrato sódico tamponado al 3,2 % (0,109 M), el valor de referencia para el Laboratorio Clínico Hematológico en Medellín Colombia, del tiempo de cierre para el colágeno/epinefrina es de 73 a 175 segundos y para el colágeno/ADP es de 50 a 112 segundos, muy similares a los informados en la literatura médica mundial [45, 46]. El valor de referencia para el PFA-P2Y es de < 106 segundos [47]. Al momento de evaluar el resultado del PFA-100 es importante recordar el mayor valor, sin que afecte significativamente el valor de referencia, del tiempo de cierre en las mujeres y en las personas con grupo sanguíneo O, con respecto a los hombres y las personas con los otros grupos sanguíneos del sistema ABO [48].

Para mayor información, en la **figura 9**, se muestra los histogramas de un PFA-100 normal. Es importante resaltar que estas gráficas no llegan al médico, las cuales son utilizadas como herramienta de análisis a cargo del profesional del laboratorio que hace la prueba, similar a cómo funcionan los histogramas y los dispersogramas en el caso de los hemogramas electrónicos [28]. El resultado que recibe el médico se expresa como “tiempo de cierre”, en segundos, para cada uno de los cartuchos estudiados. Además del resultado numérico, el resultado puede ir acompañado de un comentario interpretativo para mejor comprensión y difusión de la prueba [49].



**Figura 9.** Histograma de PFA-100 normal. Mujer de 18 años a quien se le practicó una prueba de PFA-100 dentro los estudios prequirúrgicos para un procedimiento de cirugía plástica. Tiempo de cierre colágeno/epinefrina (CEPI) 99 segundos (valor de referencia: 73 a 175 segundos); tiempo de cierre colágeno/ADP (CADP) 66 segundos (valor de referencia: 50 a 112 segundos). El estudio es normal y en consecuencia, en la práctica, se descarta la posibilidad de una trombocitopatía congénita o adquirida. Cortesía del Laboratorio Clínico Hematológico, Medellín, Colombia.

## Usos del PFA-100

De acuerdo con la literatura médica mundial acumulada en las escasas dos décadas que han transcurrido desde que la prueba se introdujo al laboratorio clínico [36], son múltiples las indicaciones para solicitar un estudio de PFA-100. Como se resume en la **tabla 2**, el PFA-100 puede utilizarse en diferentes situaciones: (1) como una prueba substituta del tiempo de sangría, (2) como una prueba tamiz de una disfunción plaquetaria ya sea congénita o adquirida, (3) como una prueba de monitoreo en el manejo de enfermedades congénitas de la función plaquetaria y en particular de la enfermedad de von Willebrand, (4) como una prueba de diagnóstico y control en el caso de la resistencia a la aspirina y la resistencia al clopidogrel, (5) como una prueba de control de calidad en el banco de sangre, y (6) como una prueba médico-legal en el diagnóstico diferencial de las enfermedades hematológicas con manifestaciones hemorrágicas y el maltrato infantil, entre otras muchas indicaciones, como se analizará en los siguientes apartados.

**Tabla 2. Usos potenciales del PFA-100**

### Como prueba substituta del tiempo de sangría

#### Como prueba tamiz

- Riesgo hemorrágico prequirúrgico
- Estudio de pacientes con manifestaciones hemorrágicas
- En ginecología
- En pediatría
- En otras circunstancias médicas (en pacientes con enfermedad renal crónica, en pacientes de neurocirugía, en pacientes de cirugía plástica, en pacientes de odontología)

#### Como prueba de monitoreo

- Enfermedad de von Willebrand
- Otras trombocitopatías congénitas o adquiridas

#### Control de anticoagulación con antiplaquetarios

- Resistencia a la aspirina
- Resistencia al clopidogrel

#### Banco de sangre

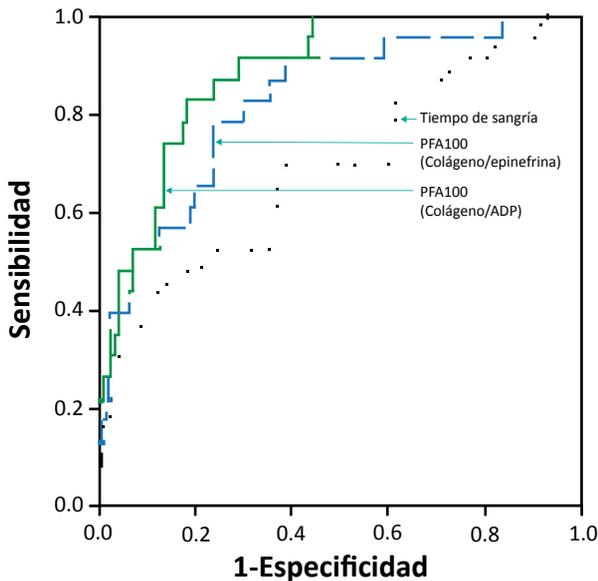
- Evaluación de donantes de plaquetas
- Manejo de concentrados plaquetarios
- Control postransfusional de plaquetas

#### Aspectos médico-legales

- Diagnóstico diferencial de alteraciones funcionales de las plaquetas *versus* maltrato infantil

## El PFA-100 como prueba sustituta del tiempo de sangría

Como se ha expresado a través de este módulo, el tiempo de sangría ha pasado a ser una prueba obsoleta, no recomendada en la práctica clínica por organizaciones como el CAP y la ASCP [4], y como tal debería desaparecer de los portafolios de servicio de los laboratorios clínicos a medida que se va introduciendo a los laboratorios clínicos la nueva tecnología. Hay suficiente evidencia, soportada en la literatura médica mundial, de que el PFA-100, además de ser una prueba no invasiva, sustituye con mejores indicadores analíticos, como la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo al tiempo de sangría en el estudio de los pacientes con sospecha de tener trastornos funcionales de las plaquetas [50-62]. En la **figura 10** se muestra el desempeño analítico del PFA-100 con relación al tiempo de sangría [53], en donde claramente se destaca la ventaja del PFA-100 sobre el tiempo de sangría.



**Figura 10.** Análisis de la característica operativa del receptor (Curva ROC) para la detección de la enfermedad de von Willebrand. La sensibilidad y especificidad para detectar la enfermedad de von Willebrand es superior cuando el PFA-100 se compara con el tiempo de sangría ( $p < 0,005$ ). La línea punteada representa el tiempo de sangría, mientras que la línea azul y la línea verde representan los cartuchos de colágeno/epinefrina y colágeno/ADP, respectivamente. Tomado con autorización de **Posan E, McBane RD, Gril DE, Motsko CL, Nichols WL.** Comparison of PFA-100 testing and bleeding time for detecting platelet hypofunction and von Willebrand disease in clinical practice. *Thrombosis and Haemostasis* 2003;90:483-490 [56].

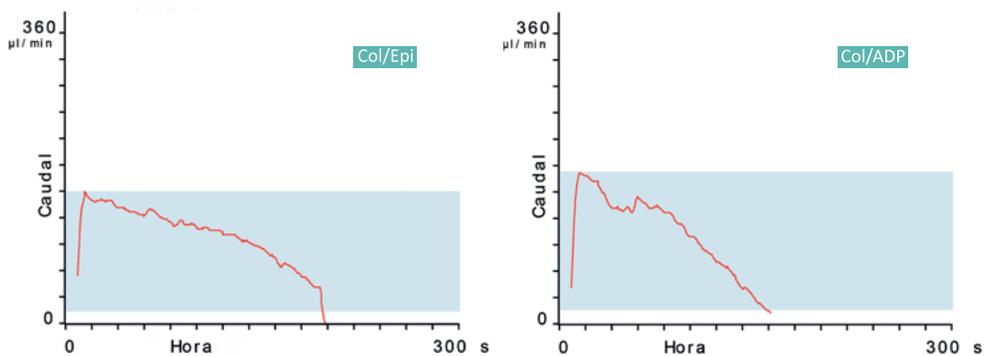
## El PFA-100 como prueba tamiz

El PFA-100 es particularmente útil como prueba tamiz en ciertas circunstancias y en grupos especiales de pacientes como se analizará en detalle a continuación en los siguientes apartados.

### ■ El PFA-100 como prueba tamiz de riesgo hemorrágico prequirúrgico

Se estima que el 3% al 5% de los pacientes que van a cirugía pueden presentar complicaciones hemorrágicas [63] y en una buena parte de estos pacientes la complicación se explica por una trombocitopatía, hereditaria o adquirida. En este caso, una prueba como el PFA-100 como prueba tamiz, está en condiciones de detectarla, además de que permite programar la cirugía con mayor seguridad [64]. A diferencia del tiempo de sangría, que como ya se ha expresado, no está indicado en la evaluación prequirúrgica de rutina [4,

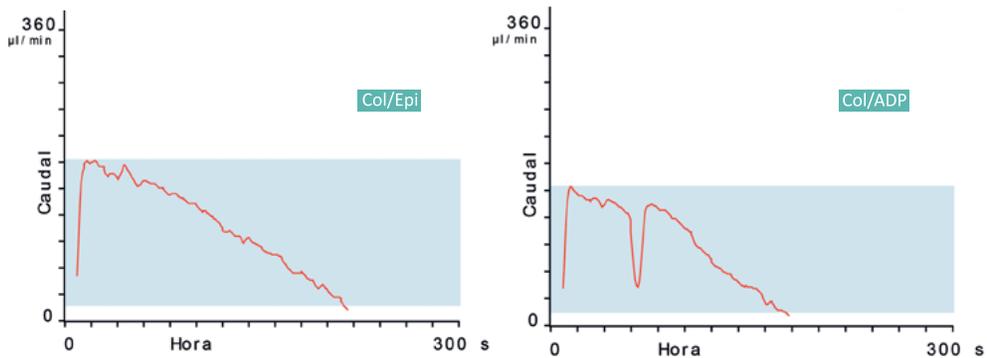
65] debido a que no detecta realmente el riesgo hemorrágico [66], el PFA-100, junto con el tiempo de protrombina y el tiempo parcial de tromboplastina activado, como pruebas prequirúrgicas, permiten al médico tener una adecuada evaluación de la hemostasia en el paciente, sobre todo en aquellos con antecedentes sospechosos de enfermedad hemorrágica [67], los tomadores crónicos de drogas potencialmente tóxicas para las plaquetas, como la aspirina y el clopidogrel, y en casos de cirugías mayores o con alto riesgo de hemorragia intraoperatoria o posoperatoria [68]. En la **figura 11** se muestra el estudio de PDFA-100 solicitado como prueba tamiz prequirúrgica en donde el paciente finalmente padecía una enfermedad de von Willebrand.



**Figura 11.** PFA-100 como prueba tamiz de riesgo hemorrágico perioperatorio. Mujer de 41 años a quien se le practicó una prueba de PFA-100 dentro de los estudios prequirúrgicos para un procedimiento de cirugía plástica. Tiempo de cierre colágeno/epinefrina (CEPI) 200 segundos (valor de referencia: 73 a 175 segundos); tiempo de cierre colágeno/ADP (CADP) 162 segundos (valor de referencia: 50 a 112 segundos). Estudios complementarios, incluido el recuento dosificación de factores (VIII, IX y von Willebrand), cofactor de ristocetina y prueba con desmopresina, se establece el diagnóstico de una enfermedad de von Willebrand. Cortesía del Laboratorio Clínico Hematológico, Medellín, Colombia.

## ■ El PFA-100 como prueba tamiz para función plaquetaria en el estudio de pacientes con manifestaciones hemorrágicas

En la clínica, tanto en niños como en adultos, es frecuente que se presenten pacientes con manifestaciones hematológicas de tipo hemorrágico con manifestaciones mucocutáneas (equimosis, petequias) o sangrado (epistaxis, metrorragia), que requieren estudio de laboratorio, en donde el PFA-100 ha demostrado ser una excelente herramienta como prueba tamiz para descartar alteraciones de la función plaquetaria [59, 69-75]. En términos generales, el PFA-100, mediante el uso concomitante de cartuchos de reactivos con colágeno/epinefrina y de colágeno/ADP, sin ser específico de ninguna situación clínica en particular, permite como una prueba tamiz detectar la mayoría de las alteraciones funcionales de las plaquetas (trombocitopatías), independiente de que sean congénitas o adquiridas [67, 76, 77]. Para mejor conocimiento de la utilidad de la prueba en el caso de pacientes con manifestaciones hemorrágicas, en la **figura 12** se muestra el caso de un paciente con síndrome de Bernard Soulier que por muchos años permaneció sin diagnóstico. Como el caso anterior, el PFA-100 combinado con el tiempo de protrombina y el tiempo parcial de tromboplastina activada, representa una buena opción de tamizaje para estos pacientes.



**Figura 12.** PFA-100 como prueba tamiz para función plaquetaria en el estudio de pacientes con manifestaciones hemorrágicas. Hombre de 63 años a quien se le practicó una prueba de PFA-100 dentro de los estudios para establecer el diagnóstico de una enfermedad caracterizada por manifestaciones hemorrágicas mucocutáneas desde su juventud, además de recuentos plaquetarios moderadamente bajos (70 a 100 mil por  $\mu\text{L}$ ). Tiempo de cierre colágeno/epinefrina (CEPI) 216 segundos (valor de referencia: 73 a 175 segundos); tiempo de cierre colágeno/ADP (CADP) 178 segundos (valor de referencia: 50 a 112 segundos). Estudios complementarios, incluido el recuento de plaquetas (90 mil por  $\mu\text{L}$ ) y el estudio de la morfología plaquetaria (macrotrombocitos), se establece el diagnóstico de un síndrome de Bernard Soulier. Cortesía del Laboratorio Clínico Hematológico, Medellín, Colombia.

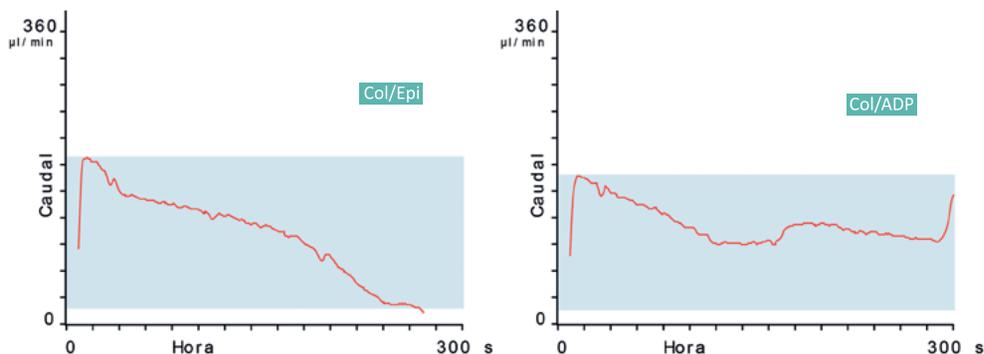
## ■ El PFA-100 como prueba tamiz en grupos especiales

El PFA-100 ha demostrado ser particularmente útil en ginecología, en pediatría y en otras circunstancias médicas como se analizará a continuación.

### El PFA-100 en ginecología

El sangrado menstrual abundante [78], antes denominado menorragia, es un problema que afecta alrededor del 5% de las mujeres entre los 30 y 49 años de edad y representa alrededor del 12% de las consultas al ginecólogo [79]. Más del 50% de los casos de sangrado menstrual abundante pueden quedar clasificadas como inexplicables [80] y hasta el 17% de estos casos pueden estar relacionadas con alteraciones de la función plaquetaria, incluida la enfermedad de von Willebrand, siendo la más frecuente, u otra trombocitopatía como el síndrome de Bernard-Soulier, la trombostenia de Glanzmann o defectos de los gránulos plaquetarios [81-84], que si no se estudian adecuada y oportunamente pueden terminar en una histerectomía innecesaria.

El PFA-100 ha demostrado ser una herramienta eficiente en el estudio de tamización en mujeres con sangrado menstrual abundante [73, 81-86] y una prueba costo-beneficio para el diagnóstico precoz de trombocitopatías en mujeres antes de empezar su vida sexual o iniciar programas de anticoncepción [87]. Es así como el Colegio Americano de Obstetricia y Ginecología (ACOG) recomienda la tamización para enfermedad de von Willebrand en todas las mujeres con sangrado menstrual abundante [88, 89] y, en este caso, el PFA-100 ha demostrado ser una excelente prueba tamiz [73, 81-86]. De acuerdo con estándares internacionales, como en todos los otros casos en donde se utiliza como prueba tamiz, el PFA-100, en el estudio del sangrado menstrual abundante, todos los resultados positivos deben ser confirmados con pruebas específicas como la agregometría y la medición de factores, de acuerdo con cada caso en particular [76, 90], antes de rotular al paciente con un determinado diagnóstico, como la enfermedad de von Willebrand. En la **figura 13** se presenta el caso de una paciente con sangrado menstrual abundante en quien se estableció a partir de un PFA-100, con estudios adicionales, el diagnóstico de una enfermedad de von Willebrand.



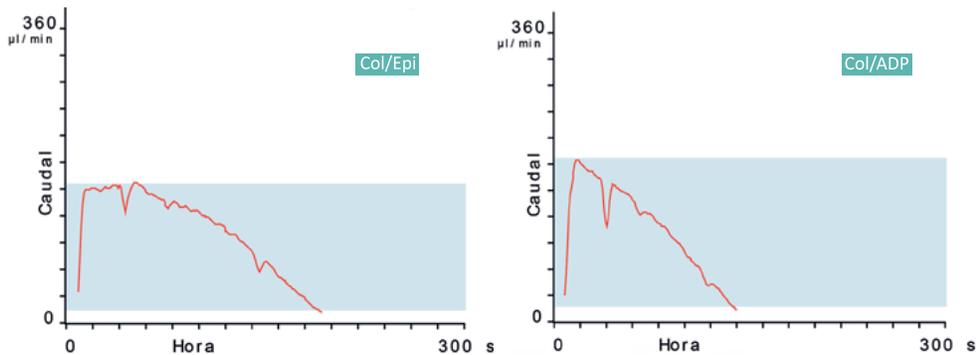
**Figura 13.** PFA-100 en ginecología. Mujer de 35 años, remitida para evaluación hematológica por presentar sangrado menstrual abundante. Tiempo de cierre colágeno/epinefrina (CEPI) 299 segundos (valor de referencia: 73 a 175 segundos); tiempo de cierre colágeno/ADP (CADP) > 300 segundos (valor de referencia: 50 a 112 segundos). Estudios complementarios, incluido el recuento dosificación de factores (VIII, IX y von Willebrand), cofactor de ristocetina y prueba con desmopresina, se establece el diagnóstico de una enfermedad de von Willebrandm. Cortesía del Laboratorio Clínico Hematológico, Medellín, Colombia.

## El PFA-100 en pediatría

Los estudios, que hasta el momento, apoyan la eficacia del PFA-100 en el diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand y otras alteraciones congénitas de la función plaquetaria en niños, como la trombostenia de Glanzmann y el síndrome de Bernard-Soulier, entre otras, han demostrado que la prueba tiene un buen desempeño analítico para alcanzar el objetivo diagnóstico, con una sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo, mayores que las obtenidas con el tiempo de sangría en la población infantil [53, 55, 59, 72, 91-93]. En el caso de las trombocitopatías congénitas, el PFA-100 tiene un alto valor predictivo negativo [94], en donde un resultado normal prácticamente descarta este diagnóstico. En el caso de los niños, igual que en los adultos, el PFA-100 reemplaza con mejores indicadores analíticos, y sobre todo, sin ningún riesgo para el niño, el tiempo de sangría [59], que no debería ser utilizado a partir del momento en que en el medio se disponga de esta nueva prueba, como sucede en la actualidad en el nuestro. El PFA-100 en los pacientes con hemofilia A y B, que como se sabe no afecta la función plaquetaria, la prueba es normal [53, 91, 92], demostrando de paso que la prueba es independiente de los factores de la coagulación. Otra indicación importante del PFA-100 es el diagnóstico diferencial de maltrato infantil en niños que se presentan a los servicios de salud con manifestaciones de equimosis, en donde el PFA-100 usualmente es normal cuando se presentan las manifestaciones por esta causa [95, 96]. En la [figura 14](#) se presenta el caso de un niño de 3 años a quien se le practicó un PFA-100 dentro de sus exámenes prequirúrgicos, a quien a partir de un PFA-100 con estudios adicionales, se le estableció el diagnóstico de una enfermedad de von Willebrand.

## ■ El PFA-100 como prueba tamiz de la enfermedad de von Willebrand

Una de las indicaciones más importantes del PFA-100 es su utilización como prueba tamiz de la enfermedad de von Willebrand y su diagnóstico diferencial con otras alteraciones funcionales, congénitas o adquiridas de las plaquetas. El PFA-100 es más sensible que el tiempo de sangría en la detección de la enfermedad de von Willebrand [97] y el resto de las trombocitopatías hereditarias, incluidas el síndrome de Bernard-Soulier, la trombostenia de Glanzmann y los defectos

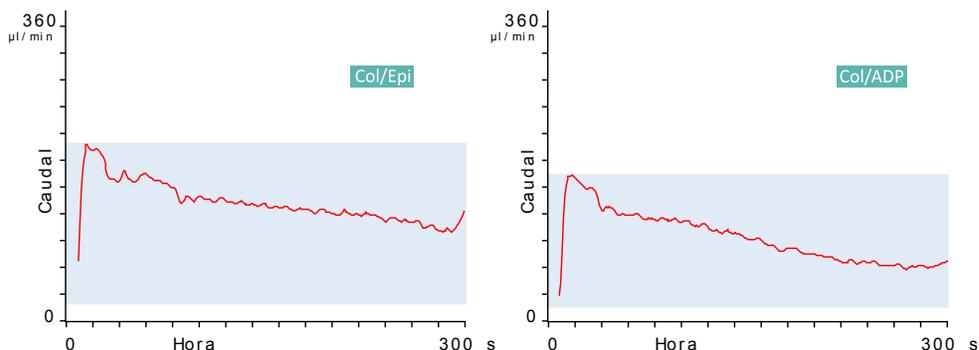


**Figura 14.** PFA-100 pediátrica. Niño de 3 años, remitido para estudio prequirúrgico (amigdalotomía). Tiempo de cierre colágeno/epinefrina (CEPI) 193 segundos (valor de referencia: 73 a 175 segundos); tiempo de cierre colágeno/ADP (CADP) 141 segundos (valor de referencia: 50 a 112 segundos). Estudios complementarios, incluido el recuento dosificado de factores (VIII, IX y von Willebrand), cofactor de ristocetina y prueba con desmopresina, se establece el diagnóstico de una enfermedad de von Willebrand. Cortesía del Laboratorio Clínico Hematológico, Medellín, Colombia.

de depósito de los gránulos plaquetarios, entre otros. De acuerdo con la Federación Mundial de la Hemofilia, se estima que la prevalencia mundial de la enfermedad de von Willebrand está alrededor del 1%, siendo el trastorno de la coagulación más común de la especie humana [98]. La enfermedad de von Willebrand puede cursar asintomática durante de toda la vida o presentarse con manifestaciones hemorrágicas importantes de predominio mucocutáneas o manifestarse por trastornos menstruales o después de cirugías o intervenciones odontológicas [98]. El diagnóstico y manejo de la enfermedad de von Willebrand es complejo y deberá estar a cargo de hematólogos, pero su detección o al menos sospecha deberá estar a cargo de los médicos de atención primaria [98]; de ahí la importancia de una prueba tamiz, como el PFA-100, para su detección. Hasta el momento en que se dispuso de pruebas de función plaquetaria como el PFA-100, para la tamización de la enfermedad de von Willebrand solo estaba disponible del tiempo de sangría, con limitaciones relacionadas con la sensibilidad y especificidad [50-62], además de su carácter invasivo, como ya se ha analizado. El PFA-100 es más sensible que el tiempo de sangría, tanto en la detección [97] como en el manejo terapéutico [99] de la enfermedad de von Willebrand. De acuerdo con Mammen y colaboradores, comparando el PFA-100 con la agregometría convencional en el diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand, el PFA-100 tiene una sensibilidad de 94,9% y 94,3%, y una especificidad de 88,8% y 88,3% [100]. Cuando la prueba tamiz resulta positiva para la enfermedad de von Willebrand se deben hacer los estudios complementarios, incluida la medición de factores como el factor VIII de la coagulación, el factor IX de la coagulación, el factor de von Willebrand y el cofactor de ristocetina [101], para confirmar el diagnóstico o descartar los diagnósticos diferenciales de los cuales se ha hecho alusión en otros apartados de este módulo. En la **figura 15** se presenta el caso de una paciente que se presenta a la consulta con manifestaciones mucocutáneas de sangrado (equimosis) y sangrado menstrual abundante en quien se estableció, con estudios adicionales, el diagnóstico de una enfermedad de von Willebrand.

## ■ Utilidad del PFA-100 como prueba tamiz en otras circunstancias diferentes a las analizadas

Aparte de las indicaciones antes citadas, el PFA-100 ha demostrado ser útil como prueba tamiz en pacientes con enfermedad renal crónica, en pacientes candidatos a cirugías de alto riesgo como la neurocirugía y la cirugía cardiovascular, como se analizará, con mayor detalle, en los dos siguientes apartados.



**Figura 15.** PFA-100 como prueba tamiz de la enfermedad de von Willebrand. Mujer de 41 años, que consulta por manifestaciones mucocutáneas de sangrado (equimosis) y sangrado menstrual abundante. Tiempo de cierre colágeno/epinefrina (CEPI) > 300 segundos (valor de referencia: 73 a 175 segundos); tiempo de cierre colágeno/ADP (CADP) > 300 segundos (valor de referencia: 50 a 112 segundos). Estudios complementarios, incluido el recuento dosificación de factores (VIII, IX y von Willebrand), cofactor de ristocetina y prueba con desmopresina, se establece el diagnóstico de una enfermedad de von Willebrand. Cortesía del Laboratorio Clínico Hematológico, Medellín, Colombia.

## El PFA-100 como prueba tamiz en pacientes renales

Los pacientes con enfermedad renal crónica, especialmente aquellos que requieren diálisis, tienen tendencia a sangrar, situación que les aumenta la morbilidad y la mortalidad [102, 103]. La patogénesis del sangrado en los pacientes renales sometidos a diálisis es de origen multifactorial y la disfunción plaquetaria parece ser de gran importancia [102-106]. Con la incorporación al laboratorio clínico de instrumentos para evaluar la función plaquetaria, se ofrece al médico una buena oportunidad para evaluar a estos pacientes y mejorar las condiciones hemostáticas de ellos [106-108] y es así como se constituye en un elemento a tener en cuenta al momento de tomar biopsias de riñón [109] o en un trasplante renal [108, 110] y así mejorar las condiciones del paciente, cuando la prueba está alterada.

## El PFA-100 como prueba tamiz en neurocirugía y otras intervenciones quirúrgicas

Además de su uso como prueba tamiz prequirúrgica en general [4, 63-65, 67, 68], como se analizó en un apartado previo, el PFA-100 tiene mayor importancia es en los pacientes que van a ser llevados a neurocirugía [74]. Otras situaciones quirúrgicas en donde el PFA-100 resulta particularmente útil en pacientes que van a ser sometidos a cirugía oral [111], cirugía en niños [72] y cirugía plástica, como parte integral de la evaluación del riesgo prequirúrgico.

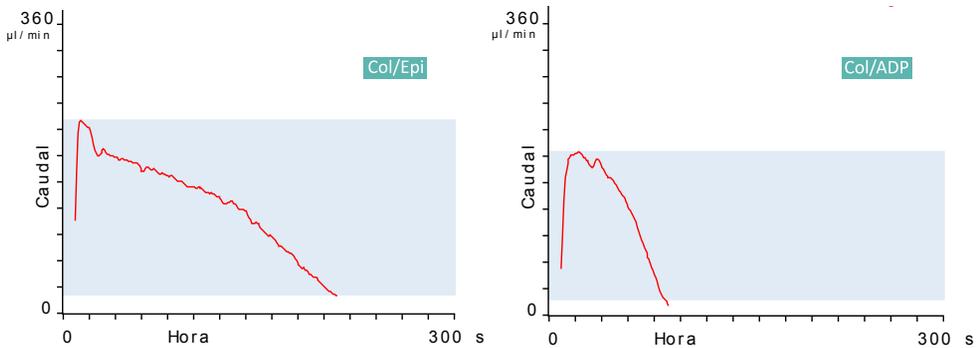
## El PFA-100 como prueba de monitoreo

Una de las aplicaciones del PFA-100, en el futuro cercano, son las relacionadas con el seguimiento de las enfermedades relacionadas con la función plaquetaria como la enfermedad de von Willebrand y en el control de la anticoagulación con antiagregantes como la aspirina y el clopidogrel, como se analizará en los próximos apartados.

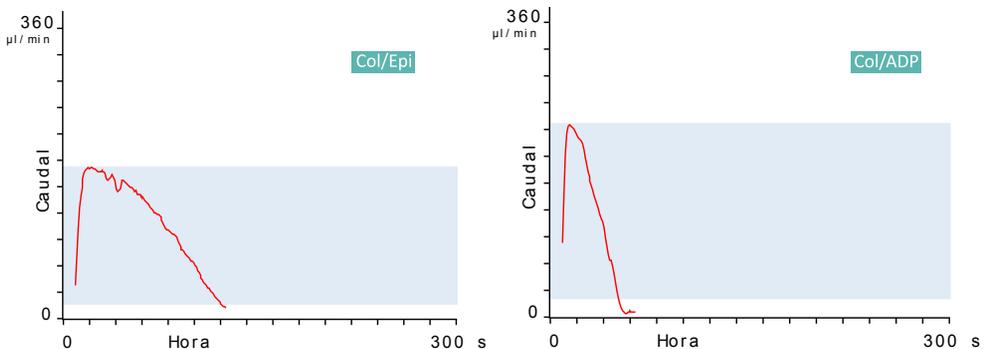
### ■ PFA-100 en el monitoreo de la enfermedad de von Willebrand

Además del papel que juega el PFA-100 como prueba tamiz en el diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand y las otras trombocitopatías congénitas o adquiridas, como se anali-

zó en el apartado anterior, esta prueba es de vital importancia en el monitoreo terapéutico de la enfermedad de von Willebrand y las demás trombocitopatías en donde se encuentra alterada la función plaquetaria. La prueba es particularmente útil para evaluar la respuesta a la desmopresina o la aplicación de factores, como el factor de von Willebrand, en el manejo de la enfermedad de von Willebrand y otros defectos congénitos de las plaquetas [86, 112-116], como se observa claramente, con la normalización de los valores como se observa en los ejemplos del manejo de la prueba en las **figuras 16 y 17**.



**Figura 16.** PFA-10 en paciente al momento del diagnóstico. Mujer de 39 años. Tiempo de cierre colágeno/epinefrina (CEPI) 211 segundos (valor de referencia: 73 a 175 segundos); tiempo de cierre colágeno/ADP (CADP) 125 segundos (valor de referencia: 50 a 112 segundos). Estudios complementarios, incluido el recuento dosificación de factores (VIII, IX y von Willebrand), cofactor de ristocetina y prueba con desmopresina, se establece el diagnóstico de una enfermedad de von Willebrand. Cortesía del Laboratorio Clínico Hematológico, Medellín, Colombia.



**Figura 17.** PFA-10 en paciente tras la administración de desmopresina. Mujer de 39 años, con diagnóstico de enfermedad de von Willebrand a quien se le administró 15  $\mu\text{g}$  de desmopresina por vía venosa previa a un procedimiento quirúrgico. Tiempo de cierre colágeno/epinefrina (CEPI) 92 segundos (valor de referencia: 73 a 175 segundos); tiempo de cierre colágeno/ADP (CADP) 55 segundos (valor de referencia: 50 a 112 segundos). El estudio muestra normalización de los tiempos de cierre como resultado de la desmopresina suministrada. Cortesía del Laboratorio Clínico Hematológico, Medellín, Colombia.

## ■ Control de anticoagulación con antiagregantes plaquetarios

La anticoagulación con antiagregantes plaquetarios es particularmente útil como herramienta para la prevención primaria (cuando aún no se han presentado eventos) o secundaria (cuando ya se han presentado eventos) de la trombosis arterial, preferente-

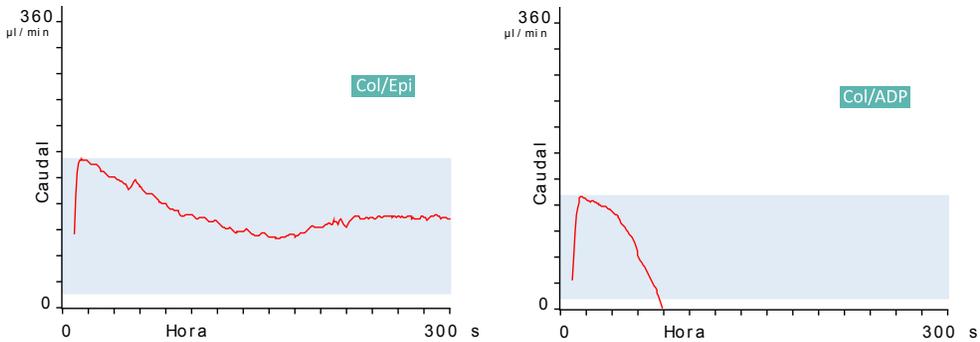
mente el infarto agudo de miocardio y los accidentes cardiovasculares. Las plaquetas, ante la ruptura o erosión de las placas ateroscleróticas en las arterias coronarias, en el primer caso, se agregan formando un trombo que puede obstruir la circulación sanguínea y el balance favorable entre los efectos benéficos (prevenir la formación del trombo) y las complicaciones (aumento del riesgo hemorrágico) de la terapia antiplaquetaria que se logra al tratar pacientes en los cuales el riesgo trombótico supera el riesgo de las complicaciones hemorrágicas [117]. La terapia antiplaquetaria es la piedra angular en la prevención y el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares, en la actualidad hay millones de pacientes en todo el mundo que reciben estos medicamentos pero no se sabe cuántos están realmente protegidos con una dosis adecuada o una medicación inadecuada [118]. La resistencia a los antiagregantes surge como una nueva entidad clínica con consecuencias potencialmente graves, como el infarto del miocardio, los accidentes cerebrovasculares y la muerte [118]. Con la incorporación a la práctica médica de métodos que permitan identificar la población de pacientes con terapia antiplaquetaria que presentan resistencia a los medicamentos, similar a como se mide el colesterol o se toma la presión arterial, se está avanzando significativamente en el cuidado de millones de estos pacientes, razón de ser de la medicina. En el medio se dispone de metodología para evaluar el efecto anticoagulante de los antiagregantes plaquetarios, siendo los más importantes y los más utilizados en la clínica: la aspirina y el clopidogrel.

## ■ Control de anticoagulación con aspirina

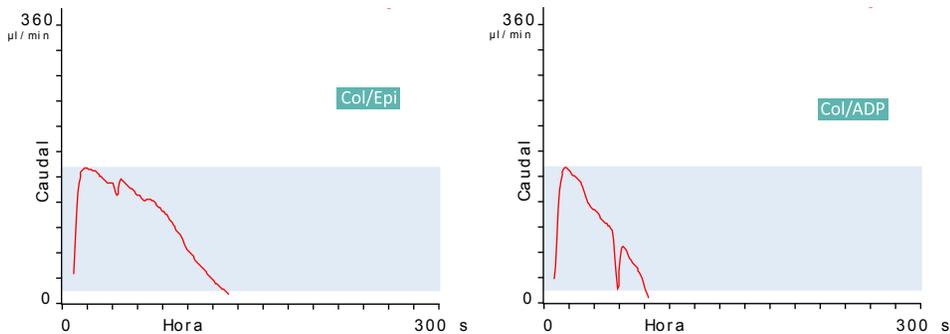
El ácido acetil salicílico, más conocido en el medio como aspirina® (Bayer) actúa inhibiendo la acción de la ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2). La aspirina, por una parte, al inhibir la COX-1 disminuye la síntesis del tromboxano A<sub>2</sub> y en consecuencia la agregación plaquetaria; por otra parte, la inhibición del COX-2, por su efecto antiinflamatorio, disminuye la inflamación vascular en el sitio de la placa ateromatosa y reduce la infiltración de células mononucleares en la placa ateromatosa [119]. La aspirina se ha reconocido por muchísimas investigaciones y por muchos años, a través de todo el mundo como una herramienta efectiva en el manejo de pacientes con angina inestable y ha demostrado reducción, de hasta el 40%, de los infartos fatales y no fatales [120]. Sin embargo, la aspirina tiene dos grandes problemas: (1) las complicaciones hemorrágicas [121-123], con mayor riesgo en pacientes con gastropatías, en particular en pacientes infectados por *Helicobacter pylori* [124-126] y/o consumidores de AINEs (antiinflamatorios no esteroideos) [127] y (2) la “resistencia a la aspirina”, que puede oscilar entre el 5% y 60% de los pacientes que reciben la dosis convencional de aspirina [128] y por lo tanto no tienen protección contra las potenciales complicaciones cardiovasculares para las cuales está tomando el medicamento [129, 130]. En Colombia, en un estudio realizado en Medellín y en Bogotá, en pacientes con enfermedad coronaria, se encontró que la resistencia a la aspirina, a dosis bajas (80-325 mg/día), era de 28,2% (CI 95%: 18,1%-40,1%) [131].

La resistencia a la aspirina se define, desde el punto de vista del laboratorio, como aquellos pacientes que no logran un adecuado grado de inhibición plaquetaria con el medicamento [132], cuando para otros, es la imposibilidad de reducir el tromboxano A<sub>2</sub> y, por ende, la agregación y activación plaquetaria [133]. De los diferentes métodos para evaluar la acción antiplaquetaria de la aspirina, el PFA-100 (colágeno/epinefrina y colágeno/ADP) es lo suficientemente sensible y reproducible para evaluar el efecto de la aspirina sobre la función plaquetaria en los pacientes que reciben este medicamento como prevención primaria o secundaria de enfermedades cardiovasculares [134, 135]. El patrón típico en pacientes tratados con aspirina adecuadamente es muy caracterís-

tico: el tiempo de cierre para colágeno/epinefrina está alargado y el tiempo de cierre del colágeno/ADP es normal [22, 37, 91, 136-138], como se muestra en la **figura 18**; en el caso de la resistencia a la aspirina los valores del tiempo de cierre para ambos cartuchos son normales, como se muestra en la **figura 19**. La prueba puede solicitarse al laboratorio clínico como “prueba de resistencia a la aspirina” o “PFA-100 para aspirina” y cuyo caso el laboratorio clínico en todos los casos debe medir el tiempo de cierre para colágeno/epinefrina y el colágeno/ADP.



**Figura 18.** PFA-100 como control de la antiagregación a aspirina. Caso en donde se logra el efecto de la droga. Hombre de 68 años a quien se le hace un PFA-100 para evidenciar la anticoagulación con aspirina (100 mg/día). Tiempo de cierre colágeno/epinefrina (CEPI) > 300 segundos (valor de referencia: 73 a 175 segundos); tiempo de cierre colágeno/ADP (CADP) 80 segundos (valor de referencia: 50 a 112 segundos). El estudio muestra alargamiento del tiempo de cierre colágeno/epinefrina con tiempo de cierre colágeno/ADP normal, compatible con antiagregación por aspirina. Cortesía del Laboratorio Clínico Hematológico, Medellín, Colombia.



**Figura 19.** PFA-100 como control de la antiagregación a aspirina. Caso en donde no se logra el efecto de la droga (“resistencia a la aspirina”). Mujer de 80 años a quien se le hace un PFA-100 para evidenciar la anticoagulación con aspirina (100 mg/día). Tiempo de cierre colágeno/epinefrina (CEPI) 133 segundos (valor de referencia: 73 a 175 segundos); tiempo de cierre colágeno/ADP (CADP) 84 segundos (valor de referencia: 50 a 112 segundos). El estudio muestra tiempo de cierre colágeno/epinefrina y colágeno/ADP normales, compatible con una “resistencia a la aspirina”. Cortesía del Laboratorio Clínico Hematológico, Medellín, Colombia.

## ■ Control de anticoagulación con clopidogrel

El clopidogrel actúa bloqueando de manera selectiva e irreversible, el receptor P2Y12 del ADP en la superficie de la plaqueta, inhibiendo de esta manera la agregación pla-

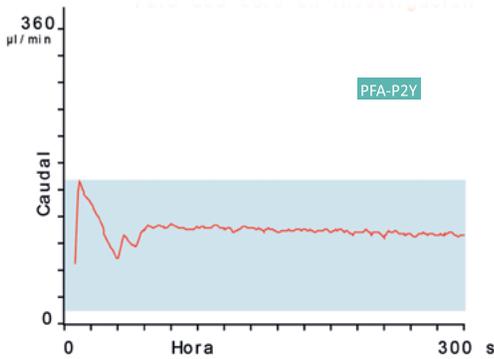
quetaria [139]. El ADP es un importante activador de la agregación plaquetaria y se encuentra en altas concentraciones en los gránulos de las plaquetas. El ADP induce la agregación de las plaquetas al activar un receptor específico situado en la superficie externa de la membrana plaquetaria, lo que genera cambios en la concentración intracelular de calcio y la expresión y ensamblaje de receptores para el fibrinógeno en la superficie de la plaqueta [139]. El clopidogrel es una prodroga, que para actuar requiere ser oxidada en el hígado por el sistema citocromo P450, generando su metabolito activo [140]. La unión del metabolito activo al receptor P2Y<sub>12</sub> es irreversible y, por tanto, las plaquetas expuestas al clopidogrel se ven afectadas en su funcionamiento por el resto de vida. La máxima inhibición de agregación plaquetaria tras una dosis de carga del fármaco (375-400 mg) oscila entre 40% a 60% y se alcanza en unas dos a seis horas [141]. En general, la agregación plaquetaria y las alteraciones de la coagulación, como el tiempo de sangría o el PFA-100 vuelven a los valores basales a partir del quinto día de la suspensión del medicamento [141].

El clopidogrel, después de la aspirina, es el antiagregante plaquetario más utilizado a nivel mundial [142]. Similar a la aspirina, el clopidogrel tiene dos grandes problemas: las complicaciones hemorrágicas y la “resistencia al clopidogrel”. De un lado, similar a lo que sucede con la aspirina y la infección por *Helicobacter pylori*, se puede presentar en los pacientes que toman clopidogrel, siendo mayor el sangrado a partir de úlceras gástricas en este caso, contrario a los que toman aspirina que usualmente son de origen duodenal [143]. Con relación a la “resistencia al clopidogrel”, similar a la aspirina, podría definirse igual, desde el punto de vista del laboratorio, como aquellos pacientes que no logran un adecuado grado de inhibición plaquetaria con el medicamento [132]; cuando para otros, es la imposibilidad de reducir la actividad del ADP plaquetario y, por ende, la agregación y activación plaquetaria [133]. En el medio, no se conoce la prevalencia de la resistencia al clopidogrel, pero se estima que debe ser muy similar a la informada en otros países, en donde oscila entre 4% y 30% [144-147].

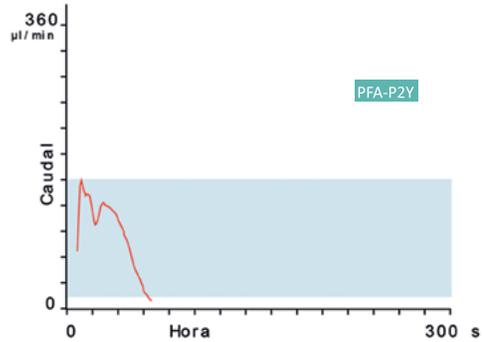
De los diferentes métodos para evaluar la acción antiplaquetaria del clopidogrel, el PFA-P2Y\* (*Siemens Healthcare Diagnostics, Inc., Deerfield, IL*) es lo suficientemente sensible y reproducible para evaluar el efecto del clopidogrel *in vitro* sobre la función plaquetaria en los pacientes que reciben este medicamento como prevención primaria o secundaria de enfermedades cardiovasculares [44, 47, 148]. El patrón típico en pacientes tratados adecuadamente con clopidogrel es muy característico: el tiempo de cierre está alargado [44, 47], como se muestra en la **figura 20**; y en el caso de la resistencia al clopidogrel el valor de cierre es normal, como se muestra en la **figura 21**. La prueba puede solicitarse al laboratorio clínico como “prueba de resistencia al clopidogrel” o “PFA-P2Y para clopidogrel”.

## El PFA-100 en banco de sangre

Una de las aplicaciones más novedosas del PFA-100 se da en el manejo de las plaquetas en el banco de sangre y cubre aspectos como la selección de los donantes de plaquetas, el manejo de los concentrados de plaquetas y control postransfusional de plaquetas, constituyéndose en una excelente aplicación costo-efectiva cuando la prueba se introduce de rutina en el manejo de las plaquetas en el banco de sangre [32, 149-155]. Además, el uso del PFA-100 en el manejo de las transfusiones de plaquetas, aparte de optimizar la terapia transfusional, mejora el manejo de los inventarios de los bancos de sangre en donde se incorpora esta tecnología [63, 149].



**Figura 20.** PFA-P2Y como control de la antiagregación con clopidogrel. Caso en donde se logra el efecto de la droga. Hombre de 58 años, a quien se le hace un PFA-P2Y para evidenciar la anticoagulación con clopidogrel (75 mg/día). P2Y > 300 segundos (valor de referencia < 106 segundos). El estudio evidencia la eficacia del clopidogrel para inhibir la agregación plaquetaria. Cortesía del Laboratorio Clínico Hematológico, Medellín, Colombia.



**Figura 21.** PFA-P2Y como control de la antiagregación con clopidogrel. Caso en donde no se logra el efecto de la droga ("resistencia a al clopidogrel"). Hombre de 82 años, a quien se le hace un PFA-P2Y para evidenciar la anticoagulación con clopidogrel (75 mg/día). P2Y 67 segundos (valor de referencia < 106 segundos). El estudio evidencia la ineficacia del clopidogrel para inhibir la agregación plaquetaria, constituyéndose en un caso de "resistencia al clopidogrel". Cortesía del Laboratorio Clínico Hematológico, Medellín, Colombia.

## ■ El PFA-100 en selección de los donantes de plaquetas

La determinación del PFA-100 (colágeno/epinefrina y colágeno/ADP), en candidatos a ser donantes de plaquetas, permite descartar con este objetivo a todos los posibles donantes portadores de una trombocitopatía, independiente de la causa, que al ser identificadas no tendrán utilidad terapéutica en los receptores [32].

## ■ El PFA-100 en el manejo de los concentrados de plaquetas

Durante el almacenamiento de plaquetas en el banco de sangre se presenta pérdida de la viabilidad y de la función hemostática, fenómeno que se presenta a partir de quinto día de almacenamiento, con posibilidad de crecimiento bacteriano que puede llegar a producir una sepsis en el paciente que las reciba [156-158]. Hasta el momento, uno de los métodos más utilizados para evaluar la viabilidad de las plaquetas de banco de sangre es la agregometría convencional, pero tiene el inconveniente de presentar una pobre reproducibilidad [159] el cual puede ser sustituida por el PFA-100. Además, gracias a la incorporación del PFA-100 al laboratorio clínico, hoy es posible medir en sangre de banco, anticoagulada con citrato, la función plaquetaria antes de aplicar la sangre para discriminar las plaquetas hipoactivas e hiperactivas de las plaquetas normoactivas [45, 159, 160].

## ■ El PFA-100 en control postransfusional de plaquetas

El PFA-100 ha demostrado ser una excelente herramienta para monitorear las transfusiones de plaquetas, en los casos en donde el procedimiento está indicado [149]. El uso del PFA-100 en la terapia de plaquetas de banco de sangre además de optimizar la terapia transfusional, mejora el manejo de los inventarios de los bancos de sangre en donde se incorpora esta tecnología [63, 149, 160, 161].

## El PFA-100 como prueba médico-legal

Otra indicación importante del PFA-100 es en el diagnóstico diferencial de maltrato infantil en niños que se presentan a los servicios de salud con manifestaciones de equimosis, en donde el PFA-100 usualmente es normal cuando se presentan las manifestaciones por maltrato infantil [95, 96], en donde la prueba resultaría normal. En este sentido, organizaciones como la Federación Mundial de la Hemofilia [98] y guías nacionales de manejo del maltrato infantil como la del gobierno mejicano [162], recomiendan utilizar esta prueba cuando este se sospeche.

## Aspectos técnicos de la prueba

Ante todo, es importante reafirmar que “la mejor prueba de hemostasia” es una excelente historia clínica [163], incluidos los antecedentes personales y familiares, y en particular los antecedentes de sangrado quirúrgico, odontológico o por traumas previos y un examen físico completo. Desde el punto de vista clínico, las pruebas de laboratorio clínico en general y las pruebas de coagulación en particular, se deben analizar dentro de un contexto clínico bien establecido del paciente, pues de lo contrario, en vez de ser de ayuda, pueden ser fuente de problemas y costos innecesarios. Como toda prueba de laboratorio clínico, el PFA-100 tiene factores pre-pre-analíticos, pre-analíticos, analíticos, pos-analíticos y pos-pos-analíticos, de los cuales son responsables tanto el médico, como el laboratorio clínico y el paciente, cómo se analizará a continuación.

## Factores pre-pre-analíticos relacionados con el PFA-100

Los factores pre-pre-analíticos se refieren al conocimiento que el médico debe tener al momento de ordenar la prueba, cuando esta está indicada [164]. En el caso del PFA-100, el médico debe conocer las múltiples ampliaciones clínicas que tiene la prueba al momento de solicitarla al laboratorio clínico. Deberá recordar, que la prueba está indicada (1) como una prueba substituta del tiempo de sangría, (2) como una prueba tamiz de una disfunción plaquetaria, ya sea congénita o adquirida, (3) como una prueba de monitoreo en el manejo de enfermedades congénitas de la función plaquetaria y en particular de la enfermedad de von Willebrand, (4) como una prueba de diagnóstico y control en el caso de la resistencia a la aspirina y la resistencia al clopidogrel, (5) como una prueba de control de calidad en el banco de sangre y (6) como una prueba médico-legal en el diagnóstico diferencial de las enfermedades hematológicas con manifestaciones hemorrágicas y el maltrato infantil, entre otras muchas indicaciones.

## Factores pre-analíticos relacionados con el PFA-100

Los factores pre-analíticos se refieren al conocimiento que el médico debe tener al momento de ordenar la prueba, en cuanto a las condiciones básicas que debe cumplir el paciente al momento de acudir al laboratorio clínico y que el laboratorio clínico debe conocer y verificar desde el momento en que el paciente acude para la toma de la muestra, hasta el momento en que la prueba es realizada y el resultado queda en condiciones de ser entregado al paciente y al médico [164]. En la práctica, el control de los factores pre-analíticos de una prueba de laboratorio en general, y del PFA-100 en particular, se subdividen en factores relacionados con el médico, con el paciente y con el laboratorio clínico, como se analizará en los siguientes apartados.

## ■ Factores pre-analíticos del PFA-100 relacionados con el médico

El médico antes de solicitar una prueba de PFA-100 debe tener en cuenta algunos medicamentos, alimentos y medicamentos naturistas que el paciente pueda estar consumiendo y que puedan interferir con los resultados de la prueba. En la **tabla 3**, se relacionan los medicamentos de uso frecuente que interfieren con la prueba y en la **tabla 4**, los alimentos y medicamentos naturales que pueden interferir con los resultados del PFA-100 [165]. Si bien, el médico que solicita la prueba es el responsable del control de estos factores pre-analíticos no se excluye de esta responsabilidad al paciente, al momento de acudir al laboratorio clínico, y al laboratorio clínico antes de tomar la muestra. Cuando se presenta esta situación, la suspensión por una semana del medicamento, el alimento o el medicamento natural que se esté consumiendo, es suficiente para no interferir con los resultados del PFA-100 [165].

## ■ Factores pre-analíticos del PFA-100 relacionados con el paciente

El paciente a quien se le va a hacer un prueba de PFA-100 debe abstenerse de consumir alcohol y medicamentos que contengan aspirina u otros como los indicados en la **tabla 3**, alimentos y medicamentos naturistas como los indicados en la **tabla 4**, previamente citadas. La muestra para el PFA-100 debe tomarse al paciente en ayunas, estandarizando la toma de la muestra en las horas de la mañana, debido a variaciones circadianas que se pueden presentar con la prueba [166, 167].

**Tabla 3. Medicamentos que inhiben la función de las plaquetas [165]**

Droga	Efecto sobre la plaqueta	Duración
Aspirina	Irreversible	5 a 7 días
Ibuprofeno	Reversible	24 horas
Naproxeno	Reversible	Más de 4 días
Tionopiridinas	Irreversible	7 días
Dipiridamol	Reversible	Mínimo (usualmente no acarrea problemas con los procedimientos)
Dipiridamol/aspirina de larga acción	Reversible/irreversible	5 días
Cilstazol	Reversible	Mínimo (usualmente no acarrea problemas con los procedimientos)

Desde el punto de vista de las condiciones pre-analíticas que debe cumplir el paciente, en términos generales, el PFA-100 no se afecta significativamente por la edad y el género; sin embargo en las mujeres tiende a ser un poco más largo que en los hombres y en las mujeres que toman anticonceptivos orales, llegando a dar resultados falsos positivos [46]. Igualmente, la prueba no se afecta por el hecho de ser fumador [46]. El PFA-100, como otros parámetros de coagulación, se puede afectar dependiendo del grupo sanguíneo, siendo un poco más largo en los pacientes con grupo sanguíneo O (alrededor de 20 segundos) con respecto a los otros grupos sanguíneos [48], situación que el médico debe considerar al momento de interpretar los resultados de la prueba.

Tabla 4. Alimentos y medicamentos naturistas que pueden interferir con los resultados del PFA-100 [165]

Arándalo (mirtilo)	( <i>Vaccinium myrtillus</i> )
Cúrcuma	( <i>Curcuma longa</i> )
Ginkgo biloba	( <i>Ginkgo biloba</i> )
Ginseng asiático	( <i>Panax ginseng</i> )
Ginseng americano o canadiense	( <i>Panax quinquefolius</i> )
Ginseng siberiano (eleuterio)	( <i>Eleutherococcus senticosus</i> )
Hongo oreja de árbol	( <i>Auricularia polytricha</i> )
Jengibre (ginger)	( <i>Zingiber officinale</i> )
Reina de los prados	( <i>Filipendula ulmaria</i> )
Sauce blanco	( <i>Salix alba</i> )

## ■ Factores pre-analíticos del PFA-100 relacionados con el laboratorio clínico

Los factores pre-analíticos del PFA-100 relacionados con el laboratorio clínico se circunscriben a la toma de la muestra y el manejo de esta hasta el momento en que lleva a cabo la prueba propiamente dicha.

### Factores relacionados con la toma de la muestra

Con relación a las condiciones de la toma de la muestra es importante recordar que solo con una buena muestra se puede hacer una buena prueba. Los resultados de la investigación de la función plaquetaria son altamente dependientes de la correcta toma de la muestra de sangre, por lo tanto, se debe usar para la venipunción una aguja de por lo menos 21G (20G o 19G) [91, 92]. Tomar la sangre directamente en un tubo al vacío o en una jeringa con 3,8 % (0,129 M) o 3,2 % (0,105 M) de citrato sódico tamponado (1 parte de anticoagulante por 9 partes de sangre) [168]. No se recomienda el uso de citrato de sodio no tamponado como anticoagulante y es importante recalcar que una vez tomada la muestra de sangre, esta se debe mezclar bien con el anticoagulante, invirtiendo el tubo tres a cuatro veces. Si durante la toma de la muestra hay problemas con la vena o el flujo de sangre se interrumpe, se debe repetir la muestra en otra vena.

### Manejo de la muestra

El manejo de la muestra es crítico. La estabilidad de la muestra en reposo y mantenida a temperatura ambiente (15°C a 25°C) es de 10 minutos a 4 horas, período en el cual se debe procesar [169]. Las muestras no se deben transportar por tubo neumático debido a que las plaquetas pueden activarse y dar resultados falsos negativos o resultados falsos positivos [170-172], aunque algunos autores consideran que este método es seguro [173], por precaución en el Laboratorio Clínico Hematológico se evita el tubo neumático y la muestra solo se toma en el sitio en donde va a ser procesada. No utilizar muestras de sangre hemolizada [174] y utilizar siempre la misma técnica para la toma de la muestra (concentración de citrato y venipuntura) [169]. En el laboratorio clínico, hasta el momento en que la muestra se lleve al instrumento debe permanecer en reposo a temperatura ambiente [169].

## Factores analíticos relacionados con el PFA-100

Los factores analíticos se refieren a los relacionados con la ejecución propiamente dicha de la prueba, esto es, desde que se inicia hasta el momento en que se obtiene el resultado de la misma [164]. Ante todo, se debe considerar que el instrumento se encuentre debidamente calibrado y controlado mediante programas de control de calidad interno y externo y que los reactivos a utilizar se encuentren con fecha de vencimiento vigente y debidamente conservados bajo condiciones de refrigeración [175-178]. Tanto el instrumento como los cartuchos de reactivos conforman un sistema cerrado, en donde el operador de la prueba no tiene ninguna injerencia con la ejecución de la prueba, diferente a montar los cartuchos en el instrumento y poner la muestra de sangre en cada uno de ellos: el procedimiento de lleva a cabo en forma automática. Como la mayoría de la pruebas cerradas y automatizadas, como el PFA-100, los factores analíticos son los que menor impacto tienen al momento de valorar los errores totales con la prueba [179, 180].

## Factores pos-analíticos relacionados con el PFA-100

Los factores pos-analíticos se refieren a los aspectos que el laboratorio clínico debe vigilar desde el momento en que se obtiene el resultado de la prueba hasta el momento en que este llega a manos del paciente y el médico que la solicitó. En el caso del PFA-100, como en la mayoría de las pruebas de laboratorio clínico, se debe validar el resultado y posteriormente entregarlo, utilizando los diversos medios de la institución, al paciente y al médico solicitante [181]. El PFA-100 no es una prueba que represente un “valor crítico”, que hace parte de esta fase de la prueba [182], pero, en el marco de la medicina personalizada, es una buena oportunidad, cuando la prueba de resultados anormales, tratar de compartir, idealmente por teléfono, los resultados obtenidos con el médico tratante del paciente [183].

## Factores pos-pos-analíticos relacionados con el PFA-100

Los factores pos-pos-analíticos se refieren a los aspectos que el médico debe conocer al momento de interpretar la prueba en el contexto clínico del paciente, de tal manera que llegue a un diagnóstico que le permita aplicar un tratamiento adecuado a partir de los resultados de la prueba solicitada [164]. Los factores pos-pos-analíticos de una prueba son el complemento de los factores pre-pre-analíticos, que en el caso del PFA-100, se podrían reducir a los siguientes aspectos:

- El PFA-100 es una prueba sustituta del tiempo de sangría, lo cual, además de ser invasiva, ha pasado a ser una prueba obsoleta, no recomendada en la práctica clínica por organizaciones como el CAP y la ASCP [4]. . Hay suficiente evidencia, soportada en la literatura médica mundial, de que el PFA-100, además de ser una prueba no invasiva y estar disponible en laboratorios clínicos especializados del país, como el Laboratorio Clínico Hematológico en Medellín, sustituye con mejores indicadores analíticos, como la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo al tiempo de sangría en el estudio de los pacientes con sospecha de tener trastornos funcionales de las plaquetas [50-62];
- El PFA-100 es una prueba tamiz de una disfunción plaquetaria ya sea congénita o adquirida, en pacientes que van a ser sometidos a cirugía como una prueba prequi-

rúrgica [68]. [67], con mejores indicadores analíticos que el tiempo de sangría, que no detecta realmente el riesgo hemorrágico [66], por lo que el CAP y la ASCP no la recomiendan [4]. La importancia del tamizaje de la prueba se extiende a los pacientes con manifestaciones hemorrágicas [67, 76, 77]. También es importante en ginecología sobretodo en mujeres con sangrado menstrual abundante y en adolescentes antes de iniciar programas de planificación o tener familia [81-84, 88, 89] y en niños [53, 55, 59, 72, 91-93], entre otros campos de la tamización de trombocitopatías;

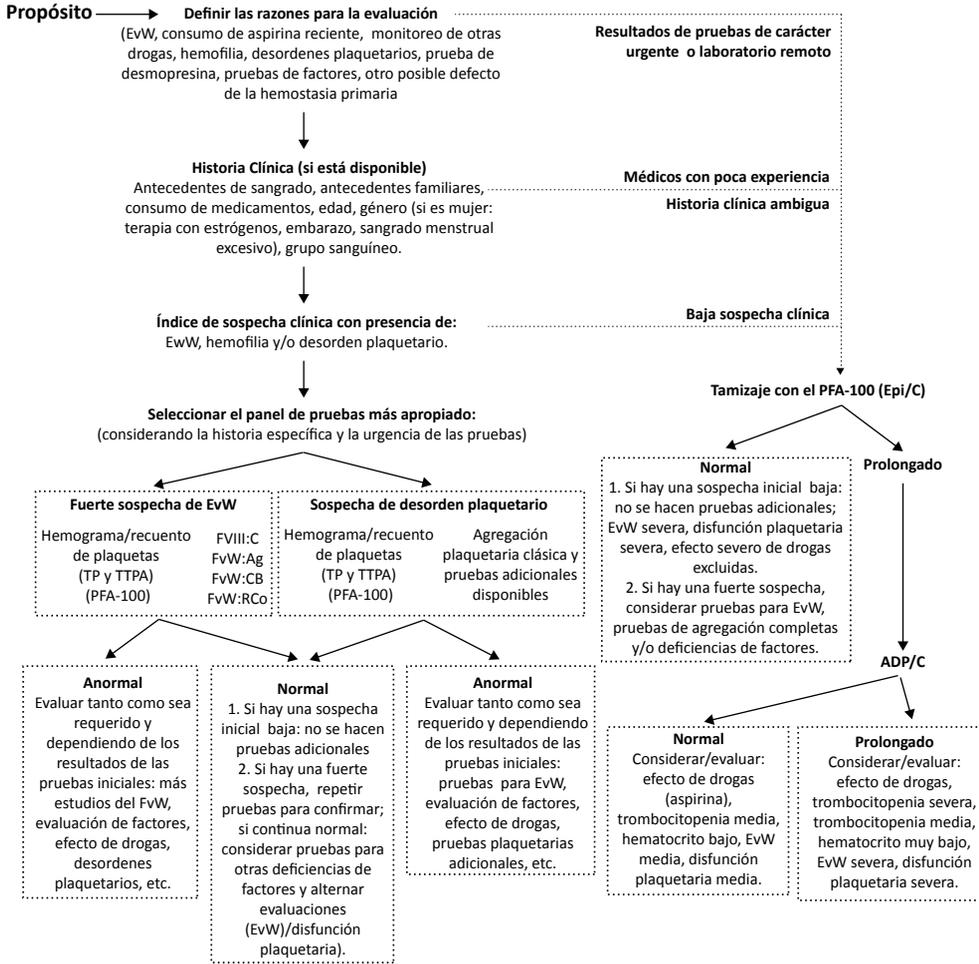
- El PFA-100 es una prueba de monitoreo en el manejo de enfermedades congénitas de la función plaquetaria y en particular de la enfermedad de von Willebrand, especialmente en el monitoreo de la aplicación de la desmopresina, así como los factores y productos de banco de sangre [86, 112, 113, 115, 184] ;
- El PFA-100 es una prueba de diagnóstico y control en el caso de la resistencia a la aspirina [132-136] y la resistencia al clopidogrel [44, 47, 148];
- El PFA-100 es una prueba de control de calidad en el banco de sangre [32, 149-155].; y
- El PFA-100 es una prueba médico-legal en el diagnóstico diferencial de las enfermedades hematológicas con manifestaciones hemorrágicas y el maltrato infantil [95, 96, 98, 162], entre otras muchas indicaciones.

En la **figura 22** se presenta un algoritmo de diagnóstico de enfermedades relacionadas con la función plaquetaria partiendo del PFA-100 utilizando la clínica y los cartuchos convencionales de colágeno/epinefrina y de colágeno/ADP [101].

## Epilogo

El PFA-100 es una nueva prueba de coagulación, substituta del tiempo de sangría, no invasiva, que permite evaluar *in vitro* la hemostasia primaria, dependiente de la integridad de la función plaquetaria. Si bien, el PFA-100, se ha diseñado como una prueba tamiz de enfermedades asociadas con la función plaquetaria, tanto congénitas como adquiridas, y en particular la enfermedad de von Willebrand, también es útil en la clínica en el seguimiento de la enfermedad de von Willebrand y el monitoreo de la anticoagulación con aspirina y clopidogrel, entre otros antiagregantes plaquetarios. Además de las citadas indicaciones clínicas, el PFA-100 es útil en el manejo de las plaquetas en banco de sangre y para dirimir problemas médico-legales relacionados con el maltrato infantil. Los laboratorios clínicos deben incluirla en los respectivos portafolios de servicios como una prueba substituta del tiempo de sangría que se ha tornado en una prueba obsoleta y los médicos deben incorporarla en el manejo de los pacientes.

Algoritmo



**Figura 22.** Algoritmo de diagnóstico a partir del PFA-100. Algoritmo que refleja una posible aproximación para la investigación de individuos potencialmente portadores de la enfermedad de von Willebrand u otras alteraciones funcionales de las plaquetas utilizando el PFA-100. Convenciones: TP: tiempo de protrombina; TTPa: tiempo parcial de tromboplastina activado; PFA: “platelet function analyzer”, FVIII:C: concentración de factor VIII de la coagulación; FvW:Ag: factor von Willebrand (antígeno); FvW:CB: ensayo de unión a colágeno; FvW:RCo: cofactor de ristocetina. Tomado de **Favaloro EJ**. Clinical utility of the PFA-100. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 2008;34:709-733 [101].

## Bibliografía

1. **Favaloro EJ, Mohammed S.** Platelet function testing: auditing local practice and broader implications. *Clin Lab Sci* 2010;23:21-31.
2. **Guevara-Arismendy NM, Escobar-Gallo GE, Campuzano-Maya G.** Utilidad clínica de la agregometría plaquetaria. *Medicina & Laboratorio* 2012;18:311-332.
3. **Franchini M.** The platelet-function analyzer (PFA-100) for evaluating primary hemostasis. *Hematology* 2005;10:177-181.
4. **Peterson P, Hayes TE, Arkin CF, Bovill EG, Fairweather RB, Rock WA, Jr., et al.** The preoperative bleeding time test lacks clinical benefit: College of American Pathologists' and Ameri-

- can Society of Clinical Pathologists' position article. *Arch Surg* 1998;133:134-139.
5. **Homocik M, Jilma B, Hergovich N, Stohlawetz P, Panzer S, Speiser W.** Monitoring of aspirin (ASA) pharmacodynamics with the platelet function analyzer PFA-100. *Thrombosis and Haemostasis* 2000;83:316-321.
  6. **Feuring M, Schultz A, Losel R, Wehling M.** Monitoring acetylsalicylic acid effects with the platelet function analyzer PFA-100. *Seminars in thrombosis and Hemostasis* 2005;31:411-415.
  7. **Fitzgerald DJ, Maree A.** Aspirin and clopidogrel resistance. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007;114-120.
  8. **Geiger J, Teichmann L, Grossmann R, Aktas B, Steigerwald U, Walter U, et al.** Monitoring of clopidogrel action: comparison of methods. *Clin Chem* 2005;51:957-965.
  9. **Feher G, Feher A, Pusch G, Koltai K, Tibold A, Gasztonyi B, et al.** Clinical importance of aspirin and clopidogrel resistance. *World Journal of Cardiology* 2010;2:171-186.
  10. **Koessler J, Ehrenschwender M, Kobzar A, Brunner K.** Evaluation of the new INNOVANCE(R) PFA P2Y cartridge in patients with impaired primary haemostasis. *Platelets* 2012;23:571-578.
  11. **Jang J, Lim J, Chang K, Kim Y, Kim M, Park HI, et al.** A comparison of INNOVANCE(R) PFA P2Y and VerifyNow P2Y12 assay for the assessment of clopidogrel resistance in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *J Clin Lab Anal* 2012;26:262-266.
  12. **Dovlatova NL, Jakubowski JA, Sugidachi A, Heptinstall S.** The reversible P2Y antagonist cangrelor influences the ability of the active metabolites of clopidogrel and prasugrel to produce irreversible inhibition of platelet function. *J Thromb Haemost* 2008;6:1153-1159.
  13. **Jakubowski JA, Li YG, Small DS, Payne CD, Tomlin ME, Luo J, et al.** A comparison of the VerifyNow P2Y12 point-of-care device and light transmission aggregometry to monitor platelet function with prasugrel and clopidogrel: an integrated analysis. *J Cardiovasc Pharmacol* 2010;56:29-37.
  14. **James S, Budaj A, Aylward P, Buck KK, Cannon CP, Cornel JH, et al.** Ticagrelor versus clopidogrel in acute coronary syndromes in relation to renal function: results from the Platelet Inhibition and Patient Outcomes (PLATO) trial. *Circulation* 2010;122:1056-1067.
  15. **Favaloro EJ.** Clinical application of the PFA-100. *Current opinion in hematology* 2002;9:407-415.
  16. **White GC, Marder VJ, Schulman S, Aird WC, Bennett JS.** Overview of basic coagulation and fibrinolysis. In: *Hemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice*, edited by Marder VJ, Aird WC, Bennett JS, Schulman S, White GC. Philadelphia, PA, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2013, p. 103-109.
  17. **Calverley DC.** Platelet function in hemostasis and thrombosis. In: *Wintrobe's Clinical Hematology*, edited by Greer JP, Arber DA, Glader B, List AF, Means RTJ, Paraskevas F, et al. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2013, p. 411-427.
  18. **Brummel-Ziedins KE, Orfeo T, Everse SJ, Mann KG.** Blood coagulation and fibrinolysis. In: *Wintrobe's Clinical Hematology*, edited by Greer JP, Arber DA, Glader B, List AF, Means RTJ, Paraskevas F, et al. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2013, p. 428-497.
  19. **Kunicki TJ, Nugent DJ.** Qualitative disorders of platelet function. In: *Wintrobe's Clinical Hematology*, edited by Greer JP, Arber DA, Glader B, List AF, Means RTJ, Paraskevas F, et al. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2013, p. 1128-1142.
  20. **Duke WW.** The relation of blood platelets to hemorrhagic disease. Description of a method for determining the bleeding time and coagulation time and report of three cases of hemorrhagic disease relieved by transfusion. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 1910;55:1185.
  21. **Harker LA, Slichter SJ.** The bleeding time as a screening test for evaluation of platelet function. *N Engl J Med* 1972;287:155-159.
  22. **Francis J, Francis D, Larson L, Helms E, Garcia M.** Can the Platelet Function Analyzer (PFA)-100 test substitute for the template bleeding time in routine clinical practice? *Platelets* 1999;10:132-136.
  23. **Proctor RR, Rapaport SI.** The partial thromboplastin time with kaolin. A simple screening test for first stage plasma clotting factor deficiencies. *Am J Clin Pathol* 1961;36:212-219.
  24. **Zhou L, Schmaier AH.** Platelet aggregation testing in platelet-rich plasma: description of procedures with the aim to develop standards in the field. *Am J Clin Pathol* 2005;123:172-183.

25. **Michelson AD.** Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood* 1996;87:4925-4936.
26. **Michelson AD, Frelinger AL, 3rd, Furman MI.** Current options in platelet function testing. *Am J Cardiol* 2006;98:4N-10N.
27. **Pakala R, Waksman R.** Currently available methods for platelet function analysis: advantages and disadvantages. *Cardiovascular Revascularization Medicine : including molecular interventions* 2011;12:312-322.
28. **Campuzano-Maya G.** Del hemograma manual al hemograma de cuarta generación. *Medicina & Laboratorio* 2007;13:511-550.
29. **White JG.** Electron microscopy methods for studying platelet structure and function. *Methods Mol Biol* 2004;272:47-63.
30. **Furie B, Furie BC.** Thrombus formation *in vivo*. *J Clin Invest* 2005;115:3355-3362.
31. **Weibel ER, Palade GE.** New Cytoplasmic Components in Arterial Endothelia. *J Cell Biol* 1964;23:101-112.
32. **Rivera J, Lozano ML, Vicente V.** *In vitro* changes of platelet parameters: lessons from blood banking. *Methods Mol Biol* 2004;273:57-72.
33. **Crosby D, Poole AW.** Platelet dense-granule secretion: the [3H]-5-HT secretion assay. *Methods Mol Biol* 2004;272:95-96.
34. **Hartert H.** [Thrombelastography, a method for physical analysis of blood coagulation]. *Z Gesamte Exp Med* 1951;117:189-203.
35. **De Nicola P, Mazzetti GM.** Evaluation of thrombelastography. *Am J Clin Pathol* 1955;23:447-452.
36. **Kundu S, Sio R, Mitu A, Ostgaard R.** Evaluation of platelet function by PFA-100™. *Clin Chem* 1994;40:1827-1828.
37. **Kundu SK, Heilmann EJ, Sio R, Garcia C, Davidson RM, Ostgaard RA.** Description of an *in vitro* platelet function analyzer--PFA-100. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 1995;21 Suppl 2:106-112.
38. **Kundu SK, Heilmann EJ, Sio R, Garcia C, Ostgaard RA.** Characterization of an *in vitro* platelet function analyzer, PFA-100. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis : official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 1996;21:241-249.
39. **Kratzer MA, Bellucci S, Caen JP.** Detection of abnormal platelet functions with an *in vitro* model of primary haemostasis. *Haemostasis* 1985;15:363-370.
40. **Kratzer MA, Born GV.** Simulation of primary haemostasis *in vitro*. *Haemostasis* 1985;15:357-362.
41. **Kretschmer V, Schikor B, Sohngen D, Dietrich G.** *In vitro* bleeding test--a simple method for the detection of aspirin effects on platelet function. *Thromb Res* 1989;56:593-602.
42. **Harrison P, Lordkipanidze M.** Clinical test of platelet function. In: *Platelets*, edited by Michelson AD. London: Academic Press, 2013, p. 519-557.
43. **Jilma B.** Platelet function analyzer (PFA-100): a tool to quantify congenital or acquired platelet dysfunction. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 2001;138:152-163.
44. **Linnemann B, Schwonberg J, Rechner AR, Mani H, Lindhoff-Last E.** Assessment of clopidogrel non-response by the PFA-100 system using the new test cartridge INNOVANCE PFA P2Y. *Annals of Hematology* 2010;89:597-605.
45. **Mammen EF, Alshameeri RS, Comp PC.** Preliminary data from a field trial of the PFA-100 system. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 1995;21 Suppl 2:113-121.
46. **Bock M, De Haan J, Beck KH, Gutensohn K, Hertfelder HJ, Karger R, et al.** Standardization of the PFA-100(R) platelet function test in 105 mmol/l buffered citrate: effect of gender, smoking, and oral contraceptives. *British Journal of Haematology* 1999;106:898-904.
47. **Koessler J, Kobsar AL, Rajkovic MS, Schaffer A, Flierl U, Pfoertsch S, et al.** The new INNOVANCE(R) PFA P2Y cartridge is sensitive to the detection of the P2Y receptor inhibition. *Platelets* 2011;22:19-25.
48. **Moeller A, Weippert-Kretschmer M, Prinz H, Kretschmer V.** Influence of ABO blood groups on primary hemostasis. *Transfusion* 2001;41:56-60.
49. **Marques MB, Anastasi J, Ashwood E, Baron B, Fitzgerald R, Fung M, et al.** The clinical pathologist as consultant. *Am J Clin Pathol* 2011;135:11-12.
50. **Cattaneo M, Federici AB, Lecchi A, Agati B, Lombardi R, Stabile F, et al.** Evaluation of the PFA-100 system in the diagnosis and therapeutic monitoring of patients with von Willibrand disease. *Thrombosis and Haemostasis* 1999;82:35-39.

51. **Kerenyi A, Schlamadinger A, Ajzner E, Szegei I, Kiss C, Pap Z, et al.** Comparison of PFA-100 closure time and template bleeding time of patients with inherited disorders causing defective platelet function. *Thrombosis Research* 1999;96:487-492.
52. **Schlamadinger A, Kerenyi A, Muszbek L, Boda Z.** Comparison of the O'Brien filter test and the PFA-100 platelet analyzer in the laboratory diagnosis of von Willebrand's disease. *Thrombosis and Haemostasis* 2000;84:88-92.
53. **Dean JA, Blanchette VS, Carcao MD, Stain AM, Sparling CR, Siekmann J, et al.** von Willebrand disease in a pediatric-based population--comparison of type 1 diagnostic criteria and use of the PFA-100 and a von Willebrand factor/collagen-binding assay. *Thrombosis and Haemostasis* 2000;84:401-409.
54. **Nitu-Whalley IC, Lee CA, Hermans C.** Reassessment of the correlation between the von Willebrand Factor activity, the PFA-100, and the bleeding time in patients with von Willebrand disease. *Thrombosis and Haemostasis* 2001;86:715-716.
55. **Cariappa R, Wilhite TR, Parvin CA, Luchtman-Jones L.** Comparison of PFA-100 and bleeding time testing in pediatric patients with suspected hemorrhagic problems. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology* : official journal of the American Society of Pediatric Hematology/Oncology 2003;25:474-479.
56. **Posan E, McBane RD, Grill DE, Motsko CL, Nichols WL.** Comparison of PFA-100 testing and bleeding time for detecting platelet hypofunction and von Willebrand disease in clinical practice. *Thrombosis and Haemostasis* 2003;90:483-490.
57. **Philipp CS, Miller CH, Faiz A, Dilley A, Michaels LA, Ayers C, et al.** Screening women with menorrhagia for underlying bleeding disorders: the utility of the platelet function analyser and bleeding time. *Haemophilia* 2005;11:497-503.
58. **Arrieta Blanco JJ, Bartolome Villar B, Juzgado A, Mourelle Martinez R.** Assessment of PFA-100 system for the measurement of bleeding time in oral surgery. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal* 2006;11:E514-519.
59. **Podda GM, Bucciarelli P, Lussana F, Lecchi A, Cattaneo M.** Usefulness of PFA-100 testing in the diagnostic screening of patients with suspected abnormalities of hemostasis: comparison with the bleeding time. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* : JTH 2007;5:2393-2398.
60. **Ng KF, Lawmin JC, Tsang SF, Tang WM, Chiu KY.** Value of a single preoperative PFA-100 measurement in assessing the risk of bleeding in patients taking cyclooxygenase inhibitors and undergoing total knee replacement. *British Journal of Anaesthesia* 2009;102:779-784.
61. **Jambor C, von Pape KW, Spannagl M, Dietrich W, Giebl A, Weisser H.** Multiple electrode whole blood aggregometry, PFA-100, and *in vivo* bleeding time for the point-of-care assessment of aspirin-induced platelet dysfunction in the preoperative setting. *Anesthesia and Analgesia* 2011;113:31-39.
62. **Chen F, Maridakis V, O'Neill E A, Beals C, Radziszewski W, de Lapeleire I, et al.** A randomized clinical trial comparing point-of-care platelet function assays and bleeding time in healthy subjects treated with aspirin or clopidogrel. *Platelets* 2011.
63. **Koscielny J, von Tempelhoff GF, Ziemer S, Radtke H, Schmutzler M, Sinha P, et al.** A practical concept for preoperative management of patients with impaired primary hemostasis. *Clin Appl Thromb Hemost* 2004;10:155-166.
64. **Harrison P.** The role of PFA-100 testing in the investigation and management of haemostatic defects in children and adults. *British Journal of Haematology* 2005;130:3-10.
65. **Lehman CM, Blaylock RC, Alexander DP, Rodgers GM.** Discontinuation of the bleeding time test without detectable adverse clinical impact. *Clin Chem* 2001;47:1204-1211.
66. **Lind SE.** The bleeding time does not predict surgical bleeding. *Blood* 1991;77:2547-2552.
67. **Harrison P, Mumford A.** Screening tests of platelet function: update on their appropriate uses for diagnostic testing. *Semin Thromb Hemost* 2009;35:150-157.
68. **Koscielny J, Ziemer S, Radtke H, Schmutzler M, Pruss A, Sinha P, et al.** A practical concept for preoperative identification of patients with impaired primary hemostasis. *Clin Appl Thromb Hemost* 2004;10:195-204.
69. **Buyukaskik Y, Karakus S, Goker H, Haznedaroglu IC, Ozatli D, Sayinalp N, et al.** Rational use of the PFA-100 device for screening of platelet function disorders and von Willebrand disease. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002;13:349-353.
70. **Harrison P, Robinson M, Liesner R, Khair K, Cohen H, Mackie I, et al.** The PFA-100: a potential rapid screening tool for the assessment of platelet dysfunction. *Clinical and Laboratory*

Haematology 2002;24:225-232.

71. **Cattaneo M.** Are the bleeding time and PFA-100 useful in the initial screening of patients with mucocutaneous bleedings of hereditary nature? *Journal of Thrombosis and Haemostasis* : JTH 2004;2:890-891.
72. **Roschitz B, Thaller S, Koestenberger M, Wirnsberger A, Leschnik B, Fritsch P, et al.** PFA-100 closure times in preoperative screening in 500 pediatric patients. *Thrombosis and Haemostasis* 2007;98:243-247.
73. **Acharya S, Barraclough J, Ibrahim MS, Oxby C, Jones SE, Parapia L, et al.** The usefulness of the platelet function analyser (PFA-100) in screening for underlying bleeding disorders in women with menorrhagia. *Journal of Obstetrics and Gynaecology* : the journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology 2008;28:310-314.
74. **Karger R, Reuter K, Rohlfes J, Nimsky C, Sure U, Kretschmer V.** The Platelet Function Analyzer (PFA-100) as a screening tool in neurosurgery. *ISRN Hematol* 2012;2012:839242.
75. **Sap F, Kavakli T, Kavakli K, Dizdärer C.** The prevalence of von Willebrand Disease and significance of *in vitro* bleeding time (PFA-100) in von Willebrand Disease screening in the Izmir Region. *Turk J Haematol* 2013;30:40-47.
76. **Favaloro EJ, Facey D, Henniker A.** Use of a novel platelet function analyzer (PFA-100) with high sensitivity to disturbances in von Willebrand factor to screen for von Willebrand's disease and other disorders. *American journal of hematology* 1999;62:165-174.
77. **Stasik CJ.** Principles, Indications, and Limitations of the Platelet Function Analyzer. College of American Pathologists. 2006. Disponible en [http://www.cap.org/apps/cap.portal?\\_nfpb=true&cntvwrPtl\\_t\\_actionOverride=%2Fportlets%2FcontentViewer%2Fshow&cntvwrPtl\\_t%7BactionForm.contentReference%7D=newspath%2F0608%2FPplatelet\\_Function\\_Analyzer.html&\\_pageLabel=cntvwr](http://www.cap.org/apps/cap.portal?_nfpb=true&cntvwrPtl_t_actionOverride=%2Fportlets%2FcontentViewer%2Fshow&cntvwrPtl_t%7BactionForm.contentReference%7D=newspath%2F0608%2FPplatelet_Function_Analyzer.html&_pageLabel=cntvwr).
78. Practice bulletin no. 128: diagnosis of abnormal uterine bleeding in reproductive-aged women. *Obstet Gynecol* 2012;120:197-206.
79. **Bradlow J, Coulter A, Brooks P.** *Patterns of referral.* Oxford: Health Services Research Unit. 1992.
80. **Oehler MK, Rees MC.** Menorrhagia: an update. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003;82:405-422.
81. **Kadir RA, Economides DL, Sabin CA, Owens D, Lee CA.** Frequency of inherited bleeding disorders in women with menorrhagia. *Lancet* 1998;351:485-489.
82. **Pesicka DR.** von Willebrand's disease: a common cause of menorrhagia. *JAAPA* 2004;17:40-44.
83. **Kujovich JL.** von Willebrand's disease and menorrhagia: prevalence, diagnosis, and management. *Am J Hematol* 2005;79:220-228.
84. **Miller CH, Philipp CS, Stein SF, Kouides PA, Lukes AS, Heit JA, et al.** The spectrum of haemostatic characteristics of women with unexplained menorrhagia. *Haemophilia* : the official journal of the World Federation of Hemophilia 2011;17:e223-229.
85. **James AH, Lukes AS, Brancazio LR, Thames E, Ortel TL.** Use of a new platelet function analyzer to detect von Willebrand disease in women with menorrhagia. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:449-455.
86. **Rose SS, Faiz A, Miller CH, Saidi P, Philipp CS.** Laboratory response to intranasal desmopressin in women with menorrhagia and platelet dysfunction. *Haemophilia* 2008;14:571-578.
87. **Sidonio RF, Jr., Smith KJ, Ragni MV.** Cost-utility analysis of von Willebrand disease screening in adolescents with menorrhagia. *J Pediatr* 2010;157:456-460, 460 e451.
88. **American Congress of Obstetricians and Gynecologists.** Committee Opinion: number 263, December 2001. Von Willebrand's disease in gynecologic practice. *Obstet Gynecol* 2001;98:1185-1186.
89. **American Congress of Obstetricians and Gynecologists.** ACOG Committee Opinion No. 451: Von Willebrand disease in women. *Obstet Gynecol* 2009;114:1439-1443.
90. **Hayward CP, Harrison P, Cattaneo M, Ortel TL, Rao AK.** Platelet function analyzer (PFA)-100 closure time in the evaluation of platelet disorders and platelet function. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* : JTH 2006;4:312-319.
91. **Carcao MD, Blanchette VS, Dean JA, He L, Kern MA, Stain AM, et al.** The Platelet Function Analyzer (PFA-100): a novel in-vitro system for evaluation of primary haemostasis in children. *British Journal of Haematology* 1998;101:70-73.
92. **Rand ML, Carcao MD, Blanchette VS.** Use of the PFA-100 in the assessment of primary, platelet-related hemostasis in a pediatric setting. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 1998;24:523-529.

93. **Streif W, Knofler R, Eberl W.** Inherited disorders of platelet function in pediatric clinical practice: a diagnostic challenge. *Klin Padiatr* 2010;222:203-208.
94. **Favaloro EJ.** Template bleeding time and PFA-100 have low sensitivity to screen patients with hereditary mucocutaneous hemorrhages: comparative study of 148 patients--a rebuttal. *Journal of thrombosis and haemostasis* : JTH 2004;2:2280-2282; author reply 2283-2285.
95. **Harrison P.** Platelet function analysis. *Blood Rev* 2005;19:111-123.
96. **Minford AM, Richards EM.** Excluding medical and haematological conditions as a cause of bruising in suspected non-accidental injury. *Arch Dis Child Educ Pract Ed* 2010;95:2-8.
97. **Fressinaud E, Veyradier A, Truchaud F, Martin I, Boyer-Neumann C, Trossaert M, et al.** Screening for von Willebrand disease with a new analyzer using high shear stress: a study of 60 cases. *Blood* 1998;91:1325-1331.
98. **Sharathkumar AA, Shapiro AD.** Trastornos de la función plaquetaria. *Federación Mundial de Hemofilia* 2008;1-28.
99. **Fressinaud E, Veyradier A, Sigaud M, Boyer-Neumann C, Le Boterff C, Meyer D.** Therapeutic monitoring of von Willebrand disease: interest and limits of a platelet function analyser at high shear rates. *Br J Haematol* 1999;106:777-783.
100. **Mammet EF, Comp PC, Gosselin R, Greenberg C, Hoots WK, Kessler CM, et al.** PFA-100 system: a new method for assessment of platelet dysfunction. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 1998;24:195-202.
101. **Favaloro EJ.** Clinical utility of the PFA-100. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 2008;34:709-733.
102. **Boccardo P, Remuzzi G, Galbusera M.** Platelet dysfunction in renal failure. *Semin Thromb Hemost* 2004;30:579-589.
103. **Kaw D, Malhotra D.** Platelet dysfunction and end-stage renal disease. *Semin Dial* 2006;19:317-322.
104. **Mezzano D, Tagle R, Panes O, Perez M, Downey P, Munoz B, et al.** Hemostatic disorder of uremia: the platelet defect, main determinant of the prolonged bleeding time, is correlated with indices of activation of coagulation and fibrinolysis. *Thromb Haemost* 1996;76:312-321.
105. **Noris M, Remuzzi G.** Uremic bleeding: closing the circle after 30 years of controversies? *Blood* 1999;94:2569-2574.
106. **Ho SJ, Gemmell R, Brighton TA.** Platelet function testing in uraemic patients. *Hematology* 2008;13:49-58.
107. **Bilgin AU, Karadogan I, Artac M, Kizilors A, Bliğin R, Undar L.** Hemodialysis shortens long *in vitro* closure times as measured by the PFA-100. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 2007;13:CR141-145.
108. **Knehtl M, Ponikvar R, Buturovic-Ponikvar J.** Platelet-related hemostasis before and after hemodialysis with five different anticoagulation methods. *Int J Artif Organs* 2013;36:717-724.
109. **Islam N, Fulop T, Zsom L, Miller E, Mire CD, Leb-run CJ, et al.** Do platelet function analyzer-100 testing results correlate with bleeding events after percutaneous renal biopsy? *Clinical nephrology* 2010;73:229-237.
110. **Ertug Z, Celik U, Hadimioglu N, Dinckan A, Ozdem S.** The assessment of PFA-100 test for the estimation of blood loss in renal transplantation operation. *Annals of transplantation* : quarterly of the Polish Transplantation Society 2010;15:46-52.
111. **Thomas S, Katbab H, abu Fanas SH.** Do preoperative cutaneous bleeding time tests predict the outcome of intraoral surgical bleeding? *Int Dent J* 2010;60:305-310.
112. **Hanebutt FL, Rolf N, Loesel A, Kuhlisch E, Siegert G, Knoefler R.** Evaluation of desmopressin effects on haemostasis in children with congenital bleeding disorders. *Haemophilia* 2008;14:524-530.
113. **van Vliet HH, Kappers-Klunne MC, Leebeek FW, Michiels JJ.** PFA-100 monitoring of von Willebrand factor (VWF) responses to desmopressin (DDAVP) and factor VIII/VWF concentrate substitution in von Willebrand disease type 1 and 2. *Thrombosis and Haemostasis* 2008;100:462-468.
114. **Ying CL, Tsang SF, Ng KF.** The potential use of desmopressin to correct hypothermia-induced impairment of primary haemostasis--an *in vitro* study using PFA-100. *Resuscitation* 2008;76:129-133.
115. **Favaloro EJ, Thom J, Patterson D, Just S, Bac-cala M, Dixon T, et al.** Potential supplementary utility of combined PFA-100 and functional von Willebrand factor testing for the laboratory assessment of desmopressin and factor concentrate therapy in von Willebrand disease. *Blood*

Coagulation & Fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis 2009;20:475-483.

116. **Colucci G, Stutz M, Rochat S, Conte T, Pavicic M, Reusser M, et al.** The effect of desmopressin on platelet function: a selective enhancement of procoagulant COAT-platelets in patients with primary platelet function defects. *Blood* 2014.
117. **Born G, Patrono C.** Antiplatelet drugs. *Br J Pharmacol* 2006;147 Suppl 1:S241-251.
118. **Wang TH, Bhatt DL, Topol EJ.** Aspirin resistance: an emerging clinical entity. *Eur Heart J* 2005;93:2-8.
119. **Rezkalla SH, Benz M.** Antiplatelet therapy from clinical trials to clinical practice. *Clin Med Res* 2003;1:101-104.
120. **Abrams J.** Medical therapy of unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2000;86:24J-33J; discussion 33J-34J.
121. **McNeil J, Tonkin A.** The MAGIC Study and the gastrointestinal effects of low-dose aspirin : editorial to: "Prospective cohort study of gastrointestinal complications and vascular diseases in patients taking aspirin: rationale and design of the MAGIC Study" by H. Origasa et al. *Cardiovasc Drugs Ther* 2011;25:503-504.
122. **Siller-Matula JM.** Hemorrhagic complications associated with aspirin: an underestimated hazard in clinical practice? *JAMA* 2012;307:2318-2320.
123. **Sostres C, Gargallo CJ.** Gastrointestinal lesions and complications of low-dose aspirin in the gastrointestinal tract. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2012;26:141-151.
124. **Fukuzawa M, Kawai T, Watanabe M, Tomiyama H, Yamashina A, Moriyasu F.** Correlation between *Helicobacter pylori* infection and low-dose aspirin use on damage of the upper gastrointestinal tract. *J Gastroenterol Hepatol* 2012;27 Suppl 3:76-81.
125. **Leung Ki EL, Chan FK.** Interaction of *Helicobacter pylori* infection and low-dose aspirin in the upper gastrointestinal tract: implications for clinical practice. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2012;26:163-172.
126. **Chan FK, Ching JY, Suen BY, Tse YK, Wu JC, Sung JJ.** Effects of *Helicobacter pylori* infection on long-term risk of peptic ulcer bleeding in low-dose aspirin users. *Gastroenterology* 2013;144:528-535.
127. **Song HJ, Kwon JW, Kim N, Park YS.** Cost effectiveness associated with *Helicobacter pylori* screening and eradication in patients taking nonsteroidal anti-inflammatory drugs and/or aspirin. *Gut Liver* 2013;7:182-189.
128. **Shenkman B, Matetzky S, Fefer P, Hod H, Einav Y, Lubetsky A, et al.** Variable responsiveness to clopidogrel and aspirin among patients with acute coronary syndrome as assessed by platelet function tests. *Thromb Res* 2008;122:336-345.
129. **Zheng AS, Churilov L, Colley RE, Goh C, Davis SM, Yan B.** Association of aspirin resistance with increased stroke severity and infarct size. *JAMA Neurol* 2013;70:208-213.
130. **Kasmeridis C, Apostolakis S, Lip GY.** Aspirin and aspirin resistance in coronary artery disease. *Curr Opin Pharmacol* 2013;13:242-250.
131. **Vesga BE, Echeverri D.** Resistencia al ácido acetil salicílico en pacientes con enfermedad coronaria. *Revista Colombiana de Cardiología* 2006;13:13-22.
132. **Bhat DL.** Aspirin resistance: more than just a laboratory curiosity. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:1127-1129.
133. **Hankey GJ, Eikelboom JW.** Aspirin resistance. *Lancet* 2006;367:606-617.
134. **Coakley M, Self R, Marchant W, Mackie I, Mallett SV, Mythen M.** Use of the platelet function analyser (PFA-100) to quantify the effect of low dose aspirin in patients with ischaemic heart disease. *Anaesthesia* 2005;60:1173-1178.
135. **Paniccia R, Antonucci E, Gori AM, Marcucci R, Poli S, Romano E, et al.** Comparison of different methods to evaluate the effect of aspirin on platelet function in high-risk patients with ischemic heart disease receiving dual antiplatelet treatment. *Am J Clin Pathol* 2007;128:143-149.
136. **Kottke-Marchant K, Powers JB, Brooks L, Kundu S, Christie DJ.** The effect of antiplatelet drugs, heparin, and preanalytical variables on platelet function detected by the platelet function analyzer (PFA-100). *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis : official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 1999;5:122-130.
137. **Harrison P, Robinson MS, Mackie IJ, Joseph J, McDonald SJ, Liesner R, et al.** Performance of the platelet function analyser PFA-100 in testing abnormalities of primary haemostasis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1999;10:25-31.
138. **Mimidis K, Papadopoulos V, Kartasis Z, Baka M, Tsalidis V, Bourikas G, et al.** Assessment of platelet adhesiveness and aggregation in mild

- acute pancreatitis using the PFA-100 system. *JOP : Journal of the pancreas* 2004;5:132-137.
139. Savi P, Pereillo JM, Uzabiaga MF, Combalbert J, Picard C, Maffrand JP, et al. Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel. *Thromb Haemost* 2000;84:891-896.
  140. Nguyen TA, Diodati JG, Pharand C. Resistance to clopidogrel: a review of the evidence. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1157-1164.
  141. Quinn MJ, Fitzgerald DJ. Ticlopidine and clopidogrel. *Circulation* 1999;100:1667-1672.
  142. Cattaneo M. Aspirin and clopidogrel: efficacy, safety, and the issue of drug resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1980-1987.
  143. Tsai TJ, Lai KH, Hsu PI, Lin CK, Chan HH, Yu HC, et al. Upper gastrointestinal lesions in patients receiving clopidogrel anti-platelet therapy. *J Formos Med Assoc* 2012;111:705-710.
  144. Jaremo P, Lindahl TL, Fransson SG, Richter A. Individual variations of platelet inhibition after loading doses of clopidogrel. *J Intern Med* 2002;252:233-238.
  145. Gurbel PA, Bliden KP. Durability of platelet inhibition by clopidogrel. *Am J Cardiol* 2003;91:1123-1125.
  146. Mobley JE, Bresee SJ, Wortham DC, Craft RM, Snider CC, Carroll RC. Frequency of non-response antiplatelet activity of clopidogrel during pretreatment for cardiac catheterization. *Am J Cardiol* 2004;93:456-458.
  147. Serebruany VL, Steinhubl SR, Berger PB, Malinin AI, Bhatt DL, Topol EJ. Variability in platelet responsiveness to clopidogrel among 544 individuals. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:246-251.
  148. Dorsam RT, Kunapuli SP. Central role of the P2Y12 receptor in platelet activation. *J Clin Invest* 2004;113:340-345.
  149. Salama ME, Raman S, Drew MJ, Abdel-Raheem M, Mahmood MN. Platelet function testing to assess effectiveness of platelet transfusion therapy. *Transfus Apher Sci* 2004;30:93-100.
  150. Tsantes AE, Mantzios G, Giannopoulou V, Tsigotis P, Bonovas S, Rapti E, et al. Monitoring aspirin treatment in patients with thrombocytosis: comparison of the platelet function analyzer (PFA)-100 with optical aggregometry. *Thrombosis research* 2008;123:100-107.
  151. Hobson AR, Qureshi Z, Banks P, Curzen N. The Potential Value of Near Patient Platelet Function Testing in PCI: Randomised Comparison of 600 mg versus 900 mg Clopidogrel Loading Doses. *Thrombosis* 2010;2010:908272.
  152. Tsantes AE, Dimoula A, Bonovas S, Mantzios G, Tsigotis P, Zoi K, et al. The role of the Platelet Function Analyzer (PFA)-100 and platelet aggregometry in the differentiation of essential thrombocythemia from reactive thrombocytosis. *Thrombosis Research* 2010;125:142-146.
  153. Tsantes AE, Nikolopoulos GK, Tsigotis P, Zoi K, Zomas A, Kapsimali V, et al. Direct evidence for normalization of platelet function resulting from platelet count reduction in essential thrombocythemia. *Blood Coagulation & Fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis* 2011;22:457-462.
  154. Tsantes A, Ikonomidis I, Papadakis I, Kottaridi C, Tsante A, Kalamara E, et al. Evaluation of the role of the new INNOVANCE PFA P2Y test cartridge in detection of clopidogrel resistance. *Platelets* 2012.
  155. Tsantes AE, Ikonomidis I, Papadakis I, Bonovas S, Gialeraki A, Kottaridi C, et al. Impact of the proton pump inhibitors and CYP2C19\*2 polymorphism on platelet response to clopidogrel as assessed by four platelet function assays. *Thromb Res* 2013;132:e105-111.
  156. Seghatchian J, Krailadsiri P. The platelet storage lesion. *Transfus Med Rev* 1997;11:130-144.
  157. Holme S, Sawyer S, Heaton A, Sweeney JD. Studies on platelets exposed to or stored at temperatures below 20 degrees C or above 24 degrees C. *Transfusion* 1997;37:5-11.
  158. Wagner SJ, Lieby D. Transfusion-associated bacterial sepsis: a concise review. *Immunohematology* 1998;14:33-35.
  159. Borzini P, Lazzaro A, Mazzucco L. Evaluation of the hemostatic function of stored platelet concentrates using the platelet function analyzer (PFA-100 ). *Haematologica* 1999;84:1104-1109.
  160. Beck KH. Quality control of platelets during storage by the PFA-100: a comparison to platelet aggregation. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis* 2002;27:247-253.
  161. Kristensen J, Eriksson L, Olsson K, Killander A, Hogman C. Functional capacity of transfused platelets estimated by the Thrombostat 4000/2. *Eur J Haematol* 1993;51:152-155.
  162. México: Secretaría de Salud. Detección temprana del abuso físico del el nacimiento hasta los 12

años de edad para el primer nivel de atención. Guía de Práctica clínica GPG 2001.

- 163. Rapaport SI.** Preoperative hemostatic evaluation: which tests, if any? *Blood* 1983;61:229-231.
- 164. Laposata M, Dighe A.** “Pre-pre” and “post-post” analytical error: high-incidence patient safety hazards involving the clinical laboratory. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:712-719.
- 165. Konkle BA.** Acquired disorders of platelet function. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011;2011:391-396.
- 166. Dalby MC, Davidson SJ, Burman JF, Davies SW.** Diurnal variation in platelet aggregation iwth the PFA-100 platelet function analyser. *Platelets* 2000;11:320-324.
- 167. Feuring M, Wehling M, Ruf A, Schultz A.** Circadian variation of platelet function measured with the PFA-100. *Platelets* 2009;20:466-470.
- 168. von Pape KW, Aland E, Bohner J.** Platelet function analysis with PFA-100 in patients medicated with acetylsalicylic acid strongly depends on concentration of sodium citrate used for anticoagulation of blood sample. *Thrombosis Research* 2000;98:295-299.
- 169. Favaloro EJ, Lippi G, Adcock DM.** Preanalytical and postanalytical variables: the leading causes of diagnostic error in hemostasis? *Semin Thromb Hemost* 2008;34:612-634.
- 170. Wallin O, Soderberg J, Grankvist K, Jonsson PA, Hultdin J.** Preanalytical effects of pneumatic tube transport on routine haematology, coagulation parameters, platelet function and global coagulation. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:1443-1449.
- 171. Bolliger D, Seeberger MD, Tanaka KA, Dell-Kuster S, Gregor M, Zenklusen U, et al.** Pre-analytical effects of pneumatic tube transport on impedance platelet aggregometry. *Platelets* 2009;20:458-465.
- 172. Hubner U, Bockel-Frohnhofer N, Hummel B, Geisel J.** The effect of a pneumatic tube transport system on platelet aggregation using optical aggregometry and the PFA-100. *Clinical Laboratory* 2010;56:59-64.
- 173. Kratz A, Salem RO, Van Cott EM.** Effects of a pneumatic tube system on routine and novel hematology and coagulation parameters in healthy volunteers. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131:293-296.
- 174. Lippi G, Fontana R, Avanzini P, Aloe R, Ippolito L, Sandei F, et al.** Influence of mechanical trauma of blood and hemolysis on PFA-100 testing. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2012;23:82-86.
- 175. Favaloro EJ.** Internal quality control and external quality assurance of platelet function tests. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 2009;35:139-149.
- 176. Favaloro EJ.** Time for a conceptual shift in assessment of internal quality control for whole blood or cell-based testing systems? An evaluation using platelet function and the PFA-100 as a case example. *Clin Chem Lab Med* 2012;1-8.
- 177. Favaloro EJ.** Time for a conceptual shift in assessment of internal quality control for whole blood or cell-based testing systems? An evaluation using platelet function and the PFA-100 as a case example. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:767-774.
- 178. Favaloro EJ, Bonar R.** External Quality Assessment/Proficiency Testing and Internal Quality Control for the PFA-100 and PFA-200: An Update. *Semin Thromb Hemost* 2014.
- 179. Plebani M.** The detection and prevention of errors in laboratory medicine. *Annals of Clinical Biochemistry* 2010;47:101-110.
- 180. Sciacovelli L, O’Kane M, Skaik YA, Caciagli P, Pellegrini C, Da Rin G, et al.** Quality Indicators in Laboratory Medicine: from theory to practice. Preliminary data from the IFCC Working Group Project “Laboratory Errors and Patient Safety”. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine : CCLM / FESCC* 2011;49:835-844.
- 181. Favaloro EJ, Lippi G.** Laboratory reporting of hemostasis assays: the final post-analytical opportunity to reduce errors of clinical diagnosis in hemostasis? *Clin Chem Lab Med* 2010;48:309-321.
- 182. Campuzano-Maya G.** Valores críticos en el laboratorio clínico: de la teoría a la práctica. *Medicina & Laboratorio* 2011;17:331-350.
- 183. Plebani M, Lippi G.** Personalized (laboratory) medicine: a bridge to the future. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:703-706.
- 184. Franchini M, Gandini G, Manzato F, Lippi G.** Evaluation of the PFA-100 system for monitoring desmopressin therapy in patients with type 1 von Willebrand’s disease. *Haematologica* 2002;87:670.