

## Utilidad del PFA-100 en una población colombiana como método de tamizaje en enfermedad de von Willebrand y trastornos de la función plaquetaria

Milton Alberto Lombana,<sup>1</sup> Gloria Ramos-Ramos,<sup>2</sup> Ana Milena Torres<sup>3</sup>

### RESUMEN

**Antecedentes:** en la práctica clínica los métodos de tamizaje con pobre reproducibilidad y rendimiento operativo dificultan la evaluación de los trastornos hereditarios de la función plaquetaria. Hace poco se propuso la prueba PFA-100 que, al parecer, es un método más apropiado. En Colombia no se cuenta con experiencia cuantificada ni publicada al respecto.

**Objetivo:** informar la primera experiencia colombiana del rendimiento diagnóstico del PFA-100 en pacientes con sospecha de enfermedad de Von Willebrand y trastornos plaquetarios funcionales no farmacológicos.

**Material y método:** estudio transversal, de validación de pruebas diagnósticas, con recolección prospectiva de datos. Se incluyeron pacientes con sospecha de enfermedad de Von Willebrand, trastornos plaquetarios funcionales y un grupo de controles sanos. A todos los pacientes se les realizó la prueba PFA-100 de manera independiente, con determinación simultánea de antígeno de Von Willebrand, cofactor ristocetina, factor VIII y agregación plaquetaria. Se determinó la sensibilidad, especificidad, LR+ y LR- del PFA-100 y el tiempo de sangría como método alternativo.

**Resultados:** se incluyeron 38 pacientes de la ciudad de Bogotá. La prueba PFA-100 tuvo una sensibilidad de 90%, LR negativo de 0.12, especificidad de 85.7% y LR positivo de 6.3. El tiempo de sangría tuvo sensibilidad de 40% y LR negativo de 0.6.

**Conclusiones:** en pacientes con sospecha de enfermedad de Von Willebrand o trastornos de la función plaquetaria la aplicación de la prueba PFA-100 en nuestro grupo de estudio tuvo un alto rendimiento diagnóstico. En pacientes con sospecha clínica de enfermedad de Von Willebrand o defectos de la función plaquetaria se recomienda la prueba PFA-100 como método de tamizaje, no así con el tiempo de sangría por su pobre sensibilidad.

**Palabras clave:** disfunción plaquetaria, Von Willebrand, PFA-100, agregación plaquetaria, sensibilidad, especificidad.

### ABSTRACT

**Background:** The evaluation of inherited disorders of platelet function in clinical practice is hampered by the use of screening methods with poor reproducibility and operational performance. Recently the use of evidence as the PFA-100 seems to be a more appropriate method. In Colombia there is not quantified or published experience in this regard.

**Objective:** The main objective of this study is to present the first Colombian experience of the diagnostic performance of the PFA-100 in patients with suspected Von Willebrand disease (VWD) and non-pharmacological functional platelet disorders.

**Materials and methods:** We performed a cross-sectional study of validation of diagnostic tests, with prospective data collection. We included patients with suspected VWD, functional platelet disorders and a group of healthy controls.

All patients underwent PFA-100 test independently, with simultaneous determination of Von Willebrand antigen, ristocetin cofactor, factor VIII and platelet aggregation. We determined the sensitivity, specificity, LR + and LR- of PFA-100 and bleeding time as an alternative method.

**Results:** 38 subjects were included from Bogota. The PFA-100 had a sensitivity of 90%, negative LR 0,12, a specificity of 85.7% and positive LR 6,2. The bleeding time had a sensitivity of 40% and negative LR 0,6.

**Conclusions:** In patients with suspected VWD or platelet function disorders using PFA-100 in our study group had a high diagnostic yield. It is recommended the use of PFA-100 as a screening method in patients with clinical suspicion of VWD or platelet function defects, not with bleeding time due to its poor sensitivity.

**Key words:** Platelet dysfunction, von Willebrand, PFA-100, platelet aggregation, sensitivity, specificity.

<sup>1</sup> Médico especialista en Medicina Interna, Fellow en Hematología y Oncología Clínica, especialista en Epidemiología general. Servicio de Hematología y Oncología, Hospital Militar Central, Universidad Militar Nueva Granda, Bogotá, Colombia

<sup>2</sup> Bacterióloga, especialista en hemostasia, coagulación y epidemiología. Servicio de Hematología y Oncología, Hospital Militar Central, Universidad Militar Nueva Granda, Bogotá, Colombia

<sup>3</sup> Médica especialista en epidemiología general, Universidad El Boque, Bogotá, Colombia.

Correspondencia: Dr. Milton Alberto Lombana, Calle 15A, 69-85, torre 5, apartamento 303, Reservas de la Hacienda, Cali, Colombia. Correo electrónico: miltonlombana@gmail.com

Recibido: mayo 2013

Aceptado: junio 2013

Este artículo debe citarse como: Lombana MA, Ramos-Ramos G, Milena-Torres A. Utilidad del PFA-100 en una población colombiana como método de tamizaje en enfermedad de von Willebrand y trastornos de la función plaquetaria. Rev Hematol Mex 2013;14:71-77.

La enfermedad de Von Willebrand se caracteriza por la falta o disfunción de la proteína de vW, proteína mediadora de la adhesión plaquetaria y estabilización del factor VIII circulante. Su prevalencia varía, dependiendo de la población estudiada, entre 0-6 a 1.3% en pacientes con síntomas de sangrado anormal, bajas concentraciones de vW e historia familiar compatible. En mujeres con sangrado menstrual excesivo la prevalencia es, incluso, de 12% según algunos reportes.<sup>1-4</sup>

Los trastornos plaquetarios hereditarios son un grupo de enfermedades en los que la función plaquetaria impide la adecuada hemostasia, a pesar de ser numéricamente normales. Su prevalencia es considerablemente más baja que la enfermedad de Von Willebrand; sin embargo, sus repercusiones clínicas en pacientes afectados es de suma importancia debido a que mediante los estudios de laboratorio de rutina no es posible tener una confirmación del padecimiento y, por lo tanto, los pacientes suelen diagnosticarse tardíamente, casi siempre después de tener eventos clínicos recurrentes.<sup>5,6</sup>

Con el propósito de identificar más rápida y eficientemente a los pacientes susceptibles a la enfermedad se han desarrollado pruebas de tamizaje, una de las más utilizadas es el tiempo de sangría, método con pobre concordancia y bajo rendimiento diagnóstico entre diferentes estudios.<sup>7</sup>

Ya hace más de 15 años que se presentaron los primeros reportes de la probabilidad de medir *in vitro* más rápidamente y con precisión la función plaquetaria.<sup>8</sup> Entre estos métodos, el PFA-100 (*Platelet Function Analyzer*) es un dispositivo de evaluación de la función plaquetaria en sangre total citrada.

En el escenario del tamizaje para pacientes con enfermedad de Von Willebrand y trastornos de la función plaquetaria, la mayor parte de los estudios ha demostrado sensibilidades cercanas a 90%.<sup>9</sup> Sin embargo, los resultados varían de población a población, y sobresale, en el único estudio con población exclusivamente latinoamericana (Chile), el hallazgo de una sensibilidad muy baja de sólo 35%.<sup>10</sup>

Esto acentúa la importancia de establecer el rendimiento de la prueba en la población a estudiar, considerando que sus resultados dependen, además de las variables biológicas estudiadas, del tipo de tubos usados, de la concentración de citrato, del tiempo de procesamiento, de la temperatura, de la altitud de la ciudad, entre otros.<sup>11</sup> En nuestro conocimiento, no existen estudios en población colombiana que validen esos resultados, ni se dispone de

datos acerca de su rendimiento diagnóstico ni puntos de corte específicos.

Los objetivos de este trabajo son: determinar el rendimiento diagnóstico del PFA-100 en pacientes con sospecha de enfermedad de Von Willebrand y trastornos plaquetarios hereditarios o adquiridos no farmacológicos, comparado con sujetos sanos en una población de pacientes del Hospital Militar Central de Bogotá. Como objetivos secundarios se planteó determinar la sensibilidad, especificidad, LR + y LR- en cada subgrupo de pacientes con PFA-100 y el tiempo de sangría. Además, se consideró establecer la media e intervalo de referencia de los valores de PFA-100 para la ciudad de Bogotá, en el grupo de sujetos normales.

## MATERIAL Y MÉTODO

Estudio analítico, de corte transversal, tipo validación de pruebas diagnósticas. Se determinó un tamaño de muestra de 34 sujetos con sensibilidad promedio de 95% y especificidad de 70%, con precisión de 90% y prevalencia estimada de 3% según los datos de la bibliografía.<sup>1-4</sup> Para los análisis estadísticos respectivos se utilizó el programa Stata, versión 11.2. Se determinó el IC de 95% para todos los resultados y nivel de significación estadística menor de 0.05%. Como hipótesis alterna se planteó al PFA-100 como método de tamizaje con alta sensibilidad en pacientes con sospecha de enfermedad de Von Willebrand y trastornos hereditarios de la función plaquetaria.

El grupo de estudio incluyó a 20 sujetos sanos (sin antecedentes personales ni familiares de sangrado, asintomáticos y con los resultados de Ag. vW, cofactor ristocetina y curva de agregación normales) a quienes se aplicó la prueba PFA-100 para obtener el valor promedio y los límites de normalidad. El otro grupo lo conformaron sujetos con sospecha de enfermedad de Von Willebrand y trastornos plaquetarios hereditarios y se excluyeron los que habían recibido transfusión de plaquetas en los últimos 15 días o coexistieran con hemofilia. Todas las pruebas de laboratorio y los estudios de PFA-100 se realizaron de manera ciega, para evitar sesgos en las fases operador dependiente.

### Mediciones e instrumentos utilizados

*Tiempo de sangría:* se realizó con el dispositivo estandarizado Surgicut®. Se considera normal el intervalo entre 2 y 8 minutos.

*Factor de von Willebrand:* se midió mediante prueba de ELISA (Laboratorio Helena). Los valores esperados están entre los límites 50 y 160%.

*Cofactor de ristocetina:* la prueba se realiza por espectrofotometría en el agregómetro plaquetario Aggram (Laboratorio Helena). Los valores esperados estaban en los límites de 58 y 166%.

*Agregación plaquetaria por espectrofotometría:* prueba semicuantitativa basada en los cambios de transmisión óptica, con agonistas plaquetarios ADP 10 UM, epinefrina 300 UM, colágeno 10 mcg/mL y ristocetina de 1.5 mg/mL. La curva se considera normal cuando los porcentajes de agregación están entre 50 y 100%, disminuida entre 30 y 50% y ausente menor de 30%.

*PFA 100:* (equipo Siemens) usa un dispositivo de aspiración a través de un reservorio de sangre que lleva la muestra a un capilar y una membrana cubierta con colágeno y un cartucho con epinefrina (col/EPI) o ADP (col/ADP). Este estímulo bioquímico y las tasas de alto flujo circulatorio en el capilar activan las plaquetas y producen agregación y llevan a la formación de un coágulo estable de plaquetas en el sitio de apertura. El tiempo requerido para la oclusión completa de esta apertura se conoce como tiempo de cerrado.<sup>12,13,14</sup> Los límites normales del tiempo de cerrado registrados en el inserto del producto son de 71 y 118 segundos para el cartucho con col/ADP y de 85 y 165 segundos para col/EPI.<sup>12</sup>

## RESULTADOS

De febrero a julio de 2011 se incluyeron 38 pacientes que cumplían los criterios de inclusión y exclusión, ingresados durante un periodo de seis meses. Se excluyeron tres pacientes que, después de realizar los exámenes, informaron el consumo de ASA.

En el Cuadro 1 se describen las características demográficas del grupo de estudio.

Los valores a partir de los cuales se definió un tiempo de cerrado elevado en PFA-100 fueron más de 156 segundos con Col/EPI y más de 114 segundos con Col/ADP. (Cuadro 2)

En la población total de pacientes el PFA-100 con Col/Epi y Col/ADP tuvo una sensibilidad de 90%, y especificidad de 85.7%. Se obtuvo un LR+ de 6.3 y LR- de 0.12 (Cuadro 3).

**Cuadro 1.** Características demográficas de los sujetos

Característica n=38	Porcentaje Rango
<b>Género</b>	
Hombres	49%
Mujeres	51%
<b>Edad</b>	35 años (18-60)
<b>Sujetos sanos</b>	28 (73%)
<b>Pacientes</b>	10 (27%)
Enfermedad de Von Willebrand Tipo 1	7
Deficiencia de gránulos densos	3
Población total	38 (100%)
<b>Grupo de trombocitosis (&gt;600.000)</b>	6 (100%)
Trombocitemia esencial	3
Trombocitosis reactiva	3
<b>Síntomas de sangrado anormal (pacientes)</b>	
Presentes	54.5%
Ausentes	45.5%

**Cuadro 2.** Valores de PFA establecidos para Bogotá

PFA-100	Promedio	Rango
Colágeno/Epinefrina	120 segundos	83-156
Colágeno/ADP	93 segundos	60-114

El tiempo de sangría se realizó en 36 pacientes, que dejó de manifiesto un pobre rendimiento diagnóstico con sensibilidad de 40%, pero una alta especificidad, cercana a 100%, sin encontrarse ningún caso con un valor superior a ocho minutos en la población de sanos (Cuadro 3).

Al analizar un punto de corte diferente al sugerido por el inserto del dispositivo del tiempo de sangría, por medio de curvas ROC (características operativas del receptor) se obtuvo un valor de seis segundos con una sensibilidad de 90% y especificidad de 84% en los sujetos estudiados con un área bajo la curva similar a la obtenida por PFA-100 (Figura 1).

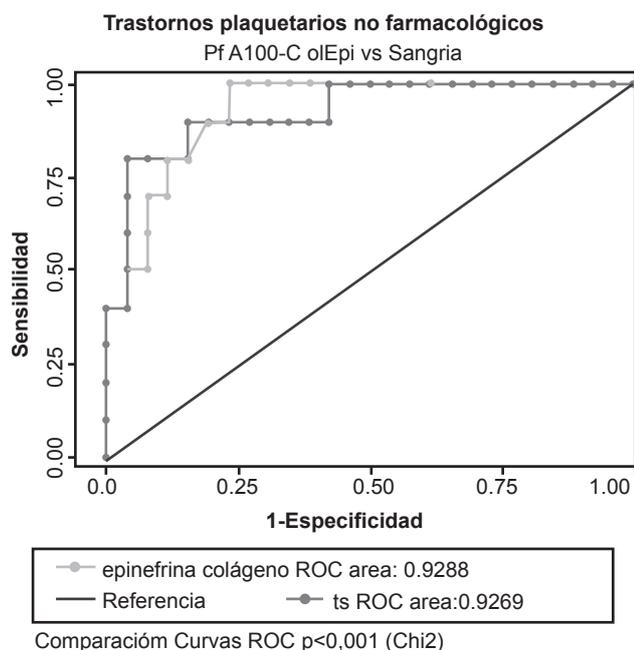
Al evaluar el uso de PFA-100 en la población que incluía sólo los pacientes con enfermedad de Von Willebrand la sensibilidad fue de 87.5% y la especificidad de 85%. En la población de pacientes con trastornos de función plaquetaria la sensibilidad fue de 100% y la especificidad de 86% (Cuadro 3).

De los cuatro pacientes falsos positivos, uno tenía hipotiroidismo no controlado con síntomas de sangrado

**Cuadro 3.** Rendimiento diagnóstico del PFA-100 y tiempo de sangría

Población	Sensibilidad	Especificidad	LR+	LR-
PFA 100 Col/EPI>156;Col/ADP>114 Col/EPI<156;Col/ADP<114				
Población Total	90% IC95%(59,6-98,2)	85.7% IC95%(68,5-94,3)	6.3 IC95%(2,48-15,98)	0,12 IC95%(0,02-0,76)
Enfermedad de Von Willebrand	85.7% IC95%(48,7-97,4)	85.7% IC95%(68,5-94,3)	6.0 IC95%(2,31-15,61)	0,17 IC95%(0,03-1,04)
Trastornos plaquetarios hereditarios	100% IC95%(43,8-100%)	85.7% IC95%(68,5-94,3)	7.0 IC95%(2,83-17,34)	NE*
Tiempo de sangría > 8 seg				
Población Total	40% IC95%(16,8-68,7)	100% IC95%(87,1-100)	NE*	0,60 IC95%(0,36-1,00)

\*No evaluable

**Figura 1.** Comparación de curvas ROC PFA-100 vs Tiempo de sangría

mucocutáneo anormal, a pesar de tener las otras pruebas del estudio normales. El segundo paciente tenía antecedente de ingestión de medicamento antigripal en los últimos cinco días (no ASA). El tercer paciente tenía antecedente de glomerulonefritis de varios años, con función renal normal hasta hace dos años, pero sin antecedente de sangrado mucocutáneo anormal ni de consumo actual de medicamentos. El cuarto paciente permaneció asintomático, sin ningún tipo de antecedentes patológicos relevantes.

El único paciente falso negativo tuvo diagnóstico de enfermedad de Von Willebrand tipo 1 con antecedentes familiares y con síntomas de sangrado anormal por menorragias. Además, se identificaron tres pacientes con trombocitemia esencial confirmada por criterios de OMS, a quienes se les suspendió el consumo de ASA e hidroxiurea 15 días antes de la toma de muestras. Estos pacientes tuvieron resultados prolongados evidenciados por un PFA-100 mayor que el valor de referencia con Col/Epi o Col/ADP; o por una alteración en la curva de agregación plaquetaria. Para controlar estos hallazgos por el número de plaquetas a tres pacientes de la unidad de cuidados intensivos se les realizaron los mismos estudios de laboratorio, que reportaron: trombocitosis mayor de 600,000, reactiva por proceso inflamatorio sistémico. De estos pacientes, dos tenía PFA-100 y agregación normal y un paciente tenía alteración en PFA con estudios de agregación plaquetaria normal (Cuadro 4).

## DISCUSIÓN

Las pruebas de tamizaje para estudiar pacientes con sospecha de enfermedad de Von Willebrand y trastornos de la función plaquetaria se han realizado, tradicionalmente, con el tiempo de sangría, cuya aplicación ha disminuido considerablemente debido a la poca reproducibilidad interoperator y el pobre rendimiento diagnóstico reportado en la bibliografía médica.

En la actualidad, el uso de PFA-100 ha remplazado el tiempo de sangría como método de tamizaje en otras regiones. En nuestro medio este método está recientemente

**Cuadro 4.** Rendimiento diagnóstico del PFA-100 y agregación plaquetaria en pacientes con trombocitosis

Población	Sensibilidad		Especificidad		LR+	LR-
PFA100 Y AGREGACIÓN PLAQUETARIA						
Población con trombocitosis	100%	IC95%(43,8-100)	66,7%	IC95%(20,8-93,9)	3,0 IC95%(0,61-14,86)	NE*

\*No evaluable

disponible en laboratorios especializados de referencia, por lo que aún no se conocen los datos locales de su rendimiento. La bibliografía reporta sensibilidades de 90% en la mayor parte de los estudios.<sup>15-42</sup> Sin embargo, el estudio publicado por Quiroga y su grupo en población de Chile, evidenció una baja sensibilidad de sólo 40%. Este reporte incluyó 148 pacientes, de los que 68 se diagnosticaron con enfermedad de Von Willebrand o defectos de la función plaquetaria.<sup>10</sup> Sus resultados no son consistentes con otros estudios, incluida una revisión reciente de Favalaro y sus colaboradores en la que al evaluar más de mil pacientes de diferentes estudios, la sensibilidad fue de 90% en enfermedad de Von Willebrand y de 71% en más de 700 pacientes con disfunción plaquetaria.<sup>9</sup> Sin embargo, el estudio de Quiroga, el único publicado en población latinoamericana, junto al nuestro, refuerza la necesidad de contar con este tipo de reportes para determinar si el rendimiento diagnóstico de este tipo de pruebas es similar al reportado en otras poblaciones, cuando se sabe que diferentes factores pueden producir variación en los resultados.

En nuestra población, el uso del PFA-100 tuvo una sensibilidad de 90% en la población total y de 87% en pacientes con enfermedad de Von Willebrand, lo que está en concordancia con la mayor parte de los estudios reportados.

El rendimiento del tiempo de sangría fue bajo, con sólo 40% de sensibilidad, a pesar de que se realizó una técnica estandarizada, hallazgos también concordantes con otros reportados previamente.<sup>7</sup> No obstante, llama la atención que el análisis por curva ROC evidenciara un rendimiento similar entre PFA-100 y tiempo de sangría con un punto de corte de seis segundos. Sin embargo, esto fue un hallazgo exploratorio y requiere confirmarse en un estudio adecuadamente diseñado para determinar diferencias por comparaciones.

La descripción del uso de PFA-100 y pruebas de agregación plaquetaria en pacientes con trombocitosis y sospecha de enfermedad mieloproliferativa clonal, se evaluó recientemente por Tsantes y sus colaboradores en 26 pacientes con trombocitemia esencial y 25 pacientes con trombocitemia reactiva. Su estudio encontró que la combinación de estos métodos tuvo una especificidad de 100% y al definir como anormal una alteración en uno de los dos estudios (agregación o PFA-100), la sensibilidad era de 100% en su población.<sup>43</sup> César JM y su grupo describieron hallazgos similares con sensibilidad de 92.7%.<sup>44</sup> Esto concuerda con nuestros tres pacientes con trombocitemia esencial, en quienes se evidenció alteración en todos los casos con al menos uno de los dos métodos.

La principal limitación de nuestro estudio es el bajo número de pacientes analizados. Sin embargo, el tamaño de muestra calculado fue de 34 pacientes; se incluyeron 41 y los resultados concordantes con otros estudios soportan la validez de los mismos.

Las fortalezas de nuestro estudio son: aplicación de un patrón de referencia y la prueba a evaluar a todos nuestros pacientes de manera ciega e independiente. Además, el desarrollo prospectivo del estudio permite disminuir el sesgo de selección y confusión al momento de interpretar los resultados de los pacientes evaluados.

Nuestro estudio tuvo como objetivo reportar una experiencia del rendimiento diagnóstico con el PFA como método de tamizaje en población colombiana; por lo tanto, con este diseño no es posible presentar comparaciones con conclusiones definitivas entre este método y el tiempo de sangría, y mucho menos un análisis económico al respecto.

Como conclusiones se recomienda el uso de PFA-100 como método de tamizaje en pacientes con sospecha clínica de enfermedad de Von Willebrand o defectos rutinarios de la función plaquetaria. En virtud de su pobre sensibilidad, el uso del tiempo de sangría como método de

tamizaje no puede recomendarse con los datos actuales; sin embargo, se sugiere la realización de un estudio comparativo entre estos métodos, con un tamaño de muestra apropiado y con comparación por medio de curvas ROC.

Es necesario realizar un estudio multicéntrico para determinar la validez y rendimiento del PFA-100 y agregación plaquetaria en pacientes con trombocitosis y sospecha de trombocitemia esencial, con el fin de identificar si es posible usarlo como un método rápido y costo-efectivo en el tamizaje y en el seguimiento de estos pacientes.

*Agradecimientos:* al servicio de Hematología-Oncología y al Laboratorio Clínico del Hospital Militar Central por la colaboración en la revisión y aporte de pacientes.

## REFERENCIAS

- Kaushansky K, Lichtman M. Von Willebrand Disease. Williams Hematology. 8<sup>th</sup> ed. 2010; 127.
- Friedman K. Inherited coagulation disorders. Greer et al. Wintrobe's Clinical Hematology. 12<sup>th</sup> ed. 2009; 57.
- National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI). The diagnosis, evaluation, and management of von Willebrand disease. Bethesda (MD): U.S. Department of Health and Human Services; 2007;112.
- Sadler JE. Von Willebrand Disease. Colman, Robert W. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. 5<sup>th</sup> ed. 2006;60.
- Kaushansky K, Lichtman M. Hereditary qualitative platelet disorders. Williams Hematology. 8<sup>th</sup> ed. 2010;121.
- Kunicki TJ. Qualitative disorders of platelet function. Greer et al. Wintrobe's Clinical Hematology. 12<sup>th</sup> ed. 2009;56.
- Lind SE. The bleeding time. Platelets 2<sup>nd</sup> ed. 2007;485-493.
- Kundu S, Heilmann E, Sio R, Garcia C, Davidson R, Ostgaard R. Description of an in vitro platelet function analyzer -PFA-100. Sem Thromb Hemost 1995;21(suppl.2):106-112.
- Favaloro EJ. Clinical utility of the PFA-100. Semin Thromb Hemost 2008;34:709-33. Epub 2009 Feb 12.
- Quiroga T, Goycoolea M, Muñoz B, et al. Template bleeding time and PFA-100 have low sensitivity to screen patients with hereditary mucocutaneous hemorrhages: comparative study in 148 patients. Thromb Haemost 2004;2:892-898.
- Dade® PFA-100® Reagents. B4170 G20A U5735 (445) H/CS/R Edition February 2008
- Kundu S, Heilmann E, Sio R, Garcia C, Ostgaard R. Characterization of an in vitro platelet function analyzer -PFA-100. Clin App Thrombosis-Hemostasis 1996;2:241-249.
- Harrison P, Robinson MS, Mackie IJ, Joseph J, McDonald SJ, Liesner R, Savidge GF, Pasi J, Machin SJ. Performance of the platelet function analyzer PFA-100 in testing abnormalities of primary haemostasis. Blood Coagul Fibrinolysis 1999;10:25-31.
- Cattaneo M, Lecchi A, Agati B, Lombardi R, Zighetti M. Evaluation of platelet function with the PFA-100 system in patients with congenital defects of platelet secretion. Thromb Res 1999; 96:213-217.
- 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.
- Ortel T, James A, Thames E, Moore K, Greenberg C. Assessment of primary hemostasis by PFA-100® analysis in a tertiary care center. Thromb Haemost 2000;84: 93-97.
- Kretschmer V, Weippert-Kretschmer M: Determination and treatment of disorders of primary hemostasis: Experience with routine application of the in vitro bleeding test. Hämostaseologie 1999;19:168-175.
- Kerenyi A, Schlammadinger A, Ajzner E, Szegedi I, Kiss C, Pap Z, Boda Z, Muszbek L. Comparison of the PFA-100 closure time and template bleeding time of patients with inherited disorders causing defective platelet function. Thromb Res1999;96:487-492.
- Fressinaud E, Veyradier A, Truchaud F, Martin I, Boyer-Neumann C, Trossaert M, Meyer D. Screening for von Willebrand Disease with a new analyzer using high shear stress: A study of 60 cases. Blood 1998;91:1325-1331.
- Cattaneo M, Federici AB, Lecchi A, Agati B, Lombardi R, Stabile F, Bucciarelli P. Evaluation of the PFA-100® system in the diagnosis and therapeutic monitoring of patients with von Willebrand disease. Thromb Haemost 1999;82:35-39.
- 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 analyzer at high shear rates. Br J Haematol 1999;106:777-783.
- 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. Am J Hematol 1999;62:165-174.
- Meskal A, Vertessen F, Van der Planken M, Berneman ZN. The platelet function analyzer (PFA-100) may not be suitable for monitoring the therapeutic efficiency of von Willebrand concentrate in type III von Willebrand disease. Ann Hematol 1999;78:426-430.
- Kerenyi A, Schlammadinger A, Ajzner E, et al. Comparison of PFA-100 closure time and template bleeding time of patients with inherited disorders causing defective platelet function. Thromb Res 1999;96:487-492.
- Harrison P, Robinson MS, Mackie IJ, et al. Performance of the platelet function analyser PFA-100 in testing abnormalities of primary haemostasis. Blood Coagul Fibrinolysis 1999;10:25-31.
- Dean JA, Blanchette VS, Carcao MD, et al. von Willebrand disease in a paediatric-based population-comparison of type 1 diagnostic criteria and use of the PFA-1001 and a von Willebrand factor/collagen-binding assay. Thromb Haemost 2000;84:401-409.
- Schlammadinger A, Kerenyi A, Muszbek L, Boda Z. Comparison of the O'Brien filter test and the PFA-100 platelet analyser in the laboratory diagnosis of von Willebrand's disease. Thromb Haemost 2000;84:88-92.
- Ortel TL, James AH, Thames EH, Moore KD, Greenberg CS. Assessment of primary hemostasis by PFA-100 analysis in a tertiary care center. Thromb Haemost 2000;84:93-97.
- Favaloro EJ, Kershaw G, Bukuya M, Hertzberg M, Koutts J. Laboratory diagnosis of von Willebrand disorder (VWD) and monitoring of DDAVP therapy: efficacy of the PFA-100 and VWF: CBA as combined diagnostic strategies. Haemophilia 2001;7:180-189.

30. Harrison P, Robinson M, Liesner R, et al. The PFA-100: a potential rapid screening tool for the assessment of platelet dysfunction. *Clin Lab Haematol* 2002;24:225-232.
31. Buyukasik Y, Karakus S, Goker H, 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.
32. Wuillemin WA, Gasser KM, Zeerleder SS, Lammle B. Evaluation of a Platelet Function Analyser (PFA-100) in patients with a bleeding tendency. *Swiss Med Wkly* 2002;132:443-448.
33. Nitu-Whalley IC, Lee CA, Brown SA, Riddell A. The role of the platelet function analyzer (PFA-100) in the characterization of patients with von Willebrand's disease and its relationships with von Willebrand factor and the ABO blood group. *Haemophilia* 2003;9:298-302.
34. Cariappa R, Wilhite TR, Parvin CA, Luchtman-Jones L. Comparison of PFA-100 and bleeding time testing in pediatric patients with suspected hemorrhagic problems. *J Pediatr Hematol Oncol* 2003;25:474-479.
35. 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. *Thromb Haemost* 2003;90:483-490.
36. Koscielny J, Ziemer S, Radtke H, et al. A practical concept for preoperative identification of patients with impaired primary hemostasis. *Clin Appl Thromb Hemost* 2004;10:195-204.
37. Philipp CS, Miller CH, Faiz A, et al. Screening women with menorrhagia for underlying bleeding disorders: the utility of the platelet function analyzer and bleeding time. *Haemophilia* 2005;11:497-503.
38. Penas N, Perez-Rodriguez A, Torea JH, et al. Willebrand disease R1374C: type 2A or 2M? A challenge to the revised classification. High frequency in the northwest of Spain (Galicia) *Am J Hematol* 2005;80:188-196.
39. Favalaro EJ, Lloyd J, Rowell J, et al. Comparison of the pharmacokinetics of two von Willebrand factor concentrates [Biostat and AHF (High Purity)] in people with von Willebrand disorder. A randomized cross-over, multi-centre study. *Thromb Haemost* 2007;97:922-930.
40. 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. *J Thromb Haemost* 2007;5:2393-2398.
41. Fressinaud E, Veyradier A, Truchaud F, 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.
42. Mammen EF, Comp PC, Gosselin R, et al. PFA-100 system: a new method for assessment of platelet dysfunction. *Semin Thromb Hemost* 1998;24:195-202.
43. Tsantes AE, Dimoula A, Bonovas S, Mantzios G. The role of the Platelet Function Analyzer (PFA)-100 and platelet aggregation in the differentiation of essential thrombocythemia from reactive thrombocytosis. *Thromb Res* 2010;125:142-146.
44. Cesar JM, de Miguel D, Garcia Avello A, Burgaleta C. Platelet dysfunction in primary thrombocythemia using the platelet function analyzer, PFA-100. *Am J Clin Pathol* 2005;123:772-777.