

**Función plaquetaria y diagnóstico de enfermedad de von Willebrand**

**Platelet function tests and von Willebrand disease diagnosis**

## **Control de calidad interno y externo en métodos de función plaquetaria**

**Internal and external quality assessment for platelet function methods**

**López MS**

*Grupo Bioquímico, Laboratorio Central del Hospital Italiano de Buenos Aires, Argentina.*

marinasollopez@hotmail.com



**TOPICOS DE LABORATORIO**

HEMATOLOGÍA  
Volumen 20 • Número Extraordinario  
XII Congreso del Grupo CAHT: 149-155  
Septiembre 2016

**Palabras clave:** Calidad,  
Agregación plaquetaria,  
Prueba global plaquetaria (PFA).

**Keywords:** Quality,  
Platelet aggregation,  
Platelet function analyser.

### **Control de calidad interno**

#### **Agregación plaquetaria**

##### **Introducción**

El estudio de agregación plaquetaria por el método de transmisión de luz (LTA) está basado en el monitoreo y detección de la transmisión de luz a través de una cubeta que contiene plasma rico en plaquetas (PRP) incubadas a 37°C. Dicha cubeta contiene además un imán que, al girar por impulso magnético, simula un movimiento similar al flujo sanguíneo para que, luego de agregar el agonista plaquetario (ADP, adrenalina, colágeno, ácido araquidónico, ristocetina, entre otros), las plaquetas activadas se agreguen uniéndose unas a otras, lo que llevará a que la turbidez que presentaba en un principio dicho plasma rico disminuya hasta asemejarse a un plasma pobre en plaquetas (PPP). A medida que esto ocurre, la absorción de luz por parte del PRP disminuirá y

aumentará la transmitancia óptica, generando una curva de agregación con una morfología característica para cada agonista ensayado.

##### **Etapa preanalítica**

Para este método de agregación plaquetaria la guía H58-A de la CLSI recomienda utilizar muestra de plasma obtenida de extracción sanguínea por venopunción con aguja de un grosor entre 19-21mm en tubos que contienen como anticoagulante citrato de sodio en una concentración de 3.2%. Una vez obtenidas las muestras, éstas deben ser mezcladas gentilmente de tres a seis veces. La concentración de anticoagulante debe ser ajustada en aquellos pacientes que presentan un hematocrito superior a 55%. En caso de tener que transportar la muestra, se lo

debe hacer a temperatura ambiente. El procesamiento de la misma debe completarse dentro de un período de cuatro horas desde el momento de la recolección.

Con respecto al hematocrito de las muestras, cuando éste es muy elevado se genera un aumento de la concentración de agonista plaquetario a utilizar para obtener una respuesta adecuada. Esto ocurre debido a que existe una relación directa entre el anticoagulante citrato de sodio y la cantidad de calcio libre disponible. Muchos autores sugieren que se ajuste la cantidad de citrato de sodio en los tubos en los que se va a recolectar la muestra para compensar valores de hematocrito mayores o igual a 45%. Esto permite cantidad suficiente de calcio libre para que pueda ser posible una respuesta de agregación máxima para un individuo en particular<sup>(1)</sup>.

Otras consideraciones importantes sobre el estado de la muestra son:

- La temperatura a la cual la muestra debe ser transportada o mantenida hasta el momento del procesamiento es temperatura ambiente (20-25° C). El espécimen no debe ser sometido a bajas temperaturas (congelación, *packs* con hielo, etc.).
- La posición en la que se deben mantener los tubos siempre es vertical y derecha, nunca acostada.
- No se deben provocar manipulaciones traumáticas, como vibraciones, sacudidas o agitaciones (todo esto puede llevar a hemólisis y activación plaquetaria)<sup>(1)</sup>.

El ajuste en muestra con hematocrito alto y las consideraciones detalladas anteriormente son válidas para todos los métodos que evalúan funcionalidad plaquetaria.

La ISTH enumera una serie de variables preanalíticas a tener en cuenta como:

- Las muestras de sangre deben ser recolectadas después de un período corto de descanso del paciente con el fin de atenuar el efecto que produce el ejercicio en la liberación de adrenalina sobre la agregación plaquetaria.
- El paciente no debe fumar por al menos un período de 30 minutos, ya que de lo contrario esto también lleva a liberación de adrenalina que puede afectar la agregación plaquetaria.
- No se debe ingerir cafeína por un período de dos horas.

- Se debe dejar asentado un registro de la medicación que toma el paciente previo a la toma de la muestra de sangre.
- El tratamiento con fármacos que produzcan una inhibición reversible de la agregación plaquetaria debe ser suspendido por lo menos 3 días antes de la realización del estudio.
- El tratamiento con fármacos que produzcan una inhibición irreversible de la agregación plaquetaria (por ejemplo aspirina), debe ser detenido por lo menos 10 días antes de la realización del estudio.
- Estos dos últimos puntos no deben ser llevados a cabo en aquellos casos en donde el estudio de función plaquetaria sea pedido para el control de la terapia antiagregante.
- Es incierto si la toma de muestras para función plaquetaria debe o no ser recolectada estando en ayunas. Si bien las variaciones en la glucemia y en la lipemia pueden tener un leve efecto en el análisis, no ha sido demostrado que dicho efecto interfiera significativamente en el diagnóstico de las trombocitopatías. Sin embargo, los pacientes no deben ser estudiados luego de haber ingerido alimentos con alto contenido graso, para evitar la formación de quilomicrones en el plasma, los que interferirán en la transmisión de luz<sup>(2)</sup>.

### Preparación de la muestra

Para este estudio es necesario contar con PRP y PPP. Ambos son obtenidos mediante centrifugación de la muestra a baja y luego a alta velocidad, respectivamente.

Existen trabajos publicados en los cuales el objeto de estudio es comparar plasmas ricos en plaquetas obtenidos luego de la centrifugación a diferentes rangos de revoluciones por minuto (rpm), en los cuales se llega a la conclusión de que el rango óptimo es entre 800-1300 rpm (equivalente a 200-250 x g, dependiendo del largo del brazo de la centrifuga a utilizar), ya que a menores velocidades el PRP obtenido presenta una ligera contaminación con glóbulos rojos, lo que afecta la respuesta plaquetaria frente a los agonistas ensayados, mientras que a velocidades superiores se produce una agregación y aglutinación plaquetaria menor y más dispersa<sup>(3)</sup>.

En nuestro laboratorio el procedimiento a seguir es primero centrifugar la muestra durante 10 minutos a 800 rpm. Luego extraer el plasma rico en plaquetas

obtenido de cada tubo de un mismo paciente y separarlo en un tubo plástico seco. Una vez realizado esto, centrifugar los tubos primarios de donde se separó el plasma rico a 3000 rpm durante 10 minutos para obtener plasma pobre en plaquetas.

Antes de comenzar con el análisis del PRP obtenido, se realiza un recuento plaquetario del mismo. El rango de recuento plaquetario del PRP óptimo es de aproximadamente 200.000-400.000/mm<sup>3</sup>. Valores por debajo de 100.000/mm<sup>3</sup> son inferiores al límite de sensibilidad del agregómetro. La ISTH establece que resultados obtenidos a partir de PRP con recuentos plaquetarios inferiores a 150.000/mm<sup>3</sup> son inexactos y se debe tener mayores precauciones a la hora de interpretar resultados anormales<sup>(2)</sup>.

Ante la necesidad de determinar si el estudio de función plaquetaria es normal o no en pacientes trombocitopénicos, se debe establecer un rango de referencia, tanto para las amplitudes como para las pendientes de las curvas obtenidas con cada agonista para PRPs con recuentos menores a 100.000/mm<sup>3</sup>. En nuestro sector se estableció un rango de referencia para pendientes y amplitudes con ADP, adrenalina, ácido araquidónico y colágeno para PRP con recuentos inferiores a 100000/m<sup>3</sup>. Para ello se diluyeron 20 PRPs con recuentos plaquetarios y agregación plaquetaria normales con PPP, hasta alcanzar un recuento plaquetario entre 70.000-110.000/mm<sup>3</sup> aproximadamente. Luego de diluir el PRP se lo analizó con los mismos agonistas utilizados.

Con respecto a los PRP con recuentos superiores a 400.000/mm<sup>3</sup>, existen diversas opiniones sobre su análisis, ya que hay algunos autores que sugieren diluir el PRP con PPP hasta alcanzar un valor de recuento plaquetario cercano a 250.000/mm<sup>3</sup> aproximadamente, mientras que otros establecen que es mejor utilizar el PRP sin diluir hasta concentraciones de 600000/mm<sup>3</sup><sup>(2)</sup>.

La CLSI detalla en su Guía H58-A que a medida que aumenta el número de plaquetas en el PRP, la oportunidad de que las plaquetas colisionen en la cubeta se incrementa lo que resulta en:

- un aumento en el grado de agregación.
- una mayor variación relativa en la densidad óptica.

Es por esta razón que la concentración plaquetaria del PRP debe ser “estandarizada” (ajustar el PRP a un valor diana con el uso de PPP)<sup>(1)</sup>.

Otras publicaciones establecen que ajustar el PRP para estandarizar el recuento plaquetario no siempre es necesario y puede afectar la respuesta plaquetaria frente a ciertos agonistas, particularmente los agonistas débiles (ADP y adrenalina), dando amplitudes menores que cuando se utiliza PRP nativo (sin diluir). Sin embargo, utilizar PRP ajustado puede aumentar la sensibilidad del método de agregación a desórdenes hemorrágicos comunes. Se llega a la conclusión de que, si bien en la agregación por transmisión óptica el PRP ajustado parece ser superior al PRP nativo para la detección de anomalías plaquetarias, fuera de eso la diferencia entre uno y otro no es clínicamente significativa<sup>(2,4,5)</sup>.

Algo en lo que hay común acuerdo y es de gran importancia es establecer rangos de referencia para cada agonista plaquetario para la población analizada<sup>(4,5)</sup>. El mismo debe ser establecido con al menos 20 donantes sanos, idealmente 40, como lo recomienda la North American Specialized Coagulation Laboratory Association (NASCOLA), incluido en el informe, además de una interpretación de cada curva y una interpretación final del estudio. Para el cálculo del rango de referencia se aconseja el uso de tests estadísticos no paramétricos, percentilos<sup>(5)</sup>.

Otro control que se debe realizar a la hora de procesar una muestra para agregación plaquetaria es la temperatura en la que se encuentran los canales donde se colocan las cubetas de reacción. Dicha temperatura debe ser igual a 37°C con un rango de aceptabilidad de +/- 0.5°C.

Temperaturas bajas (0°C - 4°C) causan que la plaqueta se contraiga y pierda su sistema microtubular. Además producen pérdida reversible del factor de von Willebrand en el plasma por aumento de proteólisis, lo que afectaría el análisis de agregación con ristocetina (RIPA). Además, las plaquetas agregan espontáneamente cuando se las almacenan a bajas temperaturas.

Por otro lado, exposición de las plaquetas a altas temperaturas por periodos superiores a 90 minutos, lleva a que la respuesta frente a los agonistas ensayados falle.

Para controlar la temperatura a la cual se exponen las cubetas de reacción en el agregómetro, una vez por mes realizamos la medición de temperatura de cada canal que posee el instrumento, colocando una cubeta con agua durante unos 5 minutos en cada canal una vez que el agregómetro haya llegado a tem-

peratura, y colocamos dentro de la cubeta un termómetro para medir la temperatura que alcanza el agua dentro de la cubeta.

Fuera del agregómetro, la temperatura a la cual se debe conservar la muestra es temperatura ambiente (aproximadamente 25°C)<sup>(1)</sup>.

Otro control de calidad interno que realizamos en nuestro sector y que es recomendado por la CLSI es el test de linealidad. Dicho control lo llevamos a cabo semestralmente y comprende la medición del porcentaje de transmitancia de cubetas con PRP sin diluir (el cual correspondería a 0% de transmitancia), PRP diluido al ¼ (25% de transmitancia), PRP diluido al ½ (50% de transmitancia), PRP diluido al ¾ (75% de transmitancia) y PPP (100% de transmitancia). Llevar a cabo este procedimiento nos permite llevar un control del estado del agregómetro a nivel de la funcionalidad de la transmisión de luz y además de la concentración plaquetaria en cada cubeta medida, ya que si se obtiene una respuesta superior al 100% de transmitancia, esto puede ser debido a un problema en la calibración del instrumento o que se detectan plaquetas en el PPP (la concentración plaquetaria en el PPP debe ser  $<10 \times 10^9/L$ )<sup>(1)</sup>.

La CLSI también propone como control de calidad y como buena práctica de laboratorio, evaluar la competencia de los distintos operadores que llevan a cabo el estudio de agregación plaquetaria. Esto se controla testeando un mínimo de 10 muestras por duplicado y calculando los coeficientes de variación de cada pareja de duplicados. Además, se recomienda procesar una muestra de un donante sano que no haya recibido medicaciones que afecten la funcionalidad plaquetaria en cada jornada de trabajo<sup>(5)</sup>.

Por último, esta guía también aconseja que si, de tener más de un agregómetro en funcionamiento, se debe controlar la reproducibilidad entre instrumentos como entre canales de cada uno de los mismos<sup>(1)</sup>.

## Prueba global plaquetaria PFA

### Introducción

El PFA-100 o PFA-200 ha reemplazado en los laboratorios de Hemostasia el tiempo de coagulación y sangría, técnica muy poco sensible y difícil de estandarizar.

El equipo utiliza dos tipos de cartuchos cada uno con una dupla de agonistas colágeno/epinefrina (Col/Epi) y colágeno/ADP (Col/ADP). Se coloca un volumen de 800 µL como mínimo en un reservorio

en cada cartucho y luego, mediante un sistema de vacío, la sangre circula por un capilar interno en el cartucho para finalmente atravesar un poro revestido por una membrana en el cual se encuentran los agonistas plaquetarios. La estimulación y activación plaquetaria por parte de los agonistas llevará a la adhesión y la posterior agregación de las plaquetas a dicho poro, ocluyéndolo. El instrumento mide, finalmente, el tiempo de oclusión en cada cartucho, y dicho tiempo es el parámetro reportado.

Esta prueba es muy sensible a distintas alteraciones hemostáticas, como enfermedad de von Willebrand, trombocitopatías severas (síndrome de Bernard-Soulier y tromboastenia de Glanzman). Además es sensible a la antiagregación con aspirina, por lo que sirve en el monitoreo de la terapia antiagregante y también para verificar el efecto de esta droga ante un procedimiento invasivo. Al ser una prueba de chequeo es muy útil, por su rapidez en la obtención de resultados y en el fácil manejo instrumental, como análisis de la funcionalidad plaquetaria previo a alguna intervención médica como por ejemplo biopsia renal, o en una neurocirugía por hematoma o hemorragia cerebral en pacientes que supuestamente recibían aspirina.

Con respecto a la sensibilidad de cada cartucho por separado, el cartucho Col/Epi es más sensible a los defectos en la hemostasia primaria que el cartucho Col/ADP, esto se ve por ejemplo en la antiagregación con aspirina, la cual produce una prolongación del tiempo de oclusión del Col/Epi, mientras que el Col/ADP puede tener un tiempo de oclusión normal. En el caso de defectos severos en la hemostasia primaria (enfermedad de Von Willebrand o trombocitopatías severas) ambos cartuchos presentan tiempos de oclusión prolongados<sup>(6,7)</sup>.

Como control de calidad interno, el fabricante aconseja que, ante cada cambio de lote para cada tipo de cartucho, se procese por duplicado (misma muestra en ambos canales de medición) una muestra normal. Los tiempos de oclusión obtenidos son graficados en el mismo equipo para poder determinar si los mismos se encuentran dentro del rango de normalidad establecido en el laboratorio y además se calcula el coeficiente de variación entre los dos canales para poder determinar si ambos canales arrojan tiempos similares, ya que, de lo contrario, el equipo podría tener un problema de calibración ante lo cual se debe informar al servicio técnico para que sea solucionado.

## **Agregación plaquetaria por impedancia eléctrica utilizando sangre entera**

### **Introducción**

El método de impedancia eléctrica (o resistencia eléctrica) es no óptico. Un electrodo es insertado dentro de una cubeta que contiene la muestra de sangre entera. El electrodo está compuesto por dos cables metálicos que están inmersos en la muestra. Al aplicar una corriente eléctrica en el rango de milivoltios, el instrumento mide las variaciones de la carga eléctrica como resistencia o impedancia entre los dos cables. El nivel de agregación plaquetaria es medida en unidades ohms.

A diferencia de la LTA, los resultados no son expresados como porcentajes sino como unidades físicas absolutas.

Existe también un método para medir agregación por impedancia en sangre entera, basado en un ensayo celular de un solo uso, con un total de cuatro electrodos recubiertos de plata que forman dos sensores independientes (MEA).

Al agregar el agonista en la cubeta, las plaquetas se estimulan, se activan y agregan. La acumulación de plaquetas resulta en un incremento en la resistencia eléctrica en el circuito (a medida que las plaquetas se agregan, la impedancia aumenta). En agregación por impedancia, el grado y la velocidad de agregación son medidos y cuantificados en ohms y en ohms por minuto (la medida de resistencia eléctrica). En MEA, los resultados son expresados en "unidades de agregación" (AU) arbitrarias<sup>(1)</sup>.

Existen diversos factores que pueden afectar la impedancia: integridad física del electrodo, temperatura de la muestra, velocidad de agitación y hematocrito.

Es importante limpiar los electrodos entre corridas y al final del día, de acuerdo a lo que estipula el fabricante. En caso de la agregación por impedancia en equipos multi-electrodos las cubetas con los electrodos son descartables.

### **Etapas preanalíticas**

El anticoagulante a utilizar es citrato de sodio 3.2%. Una vez extraída la muestra, los tubos deben ser mezclados gentilmente de tres a seis veces.

La muestra debe ser procesada antes de transcurridas las tres horas desde el momento de la recolección.

Para este tipo de agregación, en el cual se utiliza sangre entera, los reactivos deben ser isotónicos

para evitar la lisis de los glóbulos rojos.

### **Preparación de la muestra**

Inmediatamente antes de ser analizado, el espécimen debe ser mezclado gentilmente mediante inversión manual. La concentración plaquetaria en la muestra va a determinar si ésta debe ser o no diluida. Para todos los agonistas, excepto el ADP, si la concentración plaquetaria en una muestra de sangre entera se encuentra en un rango entre  $100 \times 10^9/L$  a  $1000 \times 10^9/L$ , dicha muestra debe ser diluida en partes iguales con solución salina estéril sin conservantes inmediatamente antes del análisis. Especímenes con recuento plaquetario menor a  $100 \times 10^9/L$  deben ser analizados sin diluir.

Para utilizar el agonista ADP, la concentración de plaquetas debe ser mayor de  $225 \times 10^9/L$  (esto no es recomendado para MEA), sin embargo, muestras con recuentos menores a  $225 \times 10^9/L$ , deben ser medidas sin diluir si se utiliza ADP<sup>(1)</sup>.

### **Liberación de ATP plaquetario**

En respuesta a los agonistas plaquetarios, se produce la secreción de ATP de los gránulos densos y ésta puede ser medida por una técnica de luminiscencia. El principio se basa en medir la secreción mediante la utilización de un ensayo de luminiscencia que utiliza luciferin-luciferasa para detectar ATP extracelular, en combinación simultánea con la medición de agregación plaquetaria. El ATP liberado de los gránulos densos plaquetarios se une con la luciferin-luciferasa lo que genera luz<sup>(1)</sup>.

Las variables preanalíticas son similares a las establecidas para las técnicas de agregación plaquetaria.

### **Control de calidad externo**

Existen diversas organizaciones internacionales que distribuyen muestras problema (*surveys*) para el control de calidad entre laboratorios de todo el mundo para pruebas que evalúan funcionalidad plaquetaria.

El NASCOLA ha lanzado un control de calidad externo (EQA), el cual ha sido evaluado en cuanto a su performance por diversos autores. Para agregación plaquetaria mediante transmisión de luz, NASCOLA, propone un *survey* en el que se entrega a los distintos laboratorios muestras problema entre las cuales puede haber muestras normales y/o anormales. Los envíos son dos por año y cada uno contiene muestras de cinco casos reales.

Los laboratorios participantes deben clasificar la

respuesta obtenida para cada muestra como “normal”, “normal para un recuento plaquetario bajo”, “anormal”, “anormal para un recuento plaquetario bajo”, “no es seguro (resultados variables)”, basado en las amplitudes obtenidas para cada agonista ensayado.

Además deben detallar una interpretación de las curvas obtenidas y, si las hubiera, comentar otras anomalías encontradas<sup>(6)</sup>.

Diversos autores han publicado sobre el control de calidad externo para la prueba global plaquetaria (PFA). The Royal College of Pathologists of Australasia (RCPA) ha distribuido entre los años 2008-2011 un total de 19 grupos de muestras problema a diversos laboratorios para llevar a cabo un control de calidad para esta prueba. Estas muestras incluyeron especímenes normales, muestras con aspirina y otras con defectos en la hemostasia primaria leves, moderados o severos. Además, a cada laboratorio se le otorgó instrucciones específicas de cómo procesar cada muestra. Luego del procesamiento los laboratorios debían informar los resultados de los tiempos de oclusión obtenidos<sup>(8)</sup>.

Otra organización de control de calidad externo es el Colegio Americano de Patólogos (CAP), ante el cual nuestro laboratorio se encuentra acreditado. Para agregación plaquetaria y PFA el CAP posee un *survey* (platelet function PF para agregación plaquetaria y PF1 para PFA). Son dos envíos por año y en cada uno se remiten:

- PF: 4 tubos vacutainer de citrato de sodio 3.2%, 2 tubos de plástico de 10 ml conteniendo alguna sustancia incógnita que afecte o no la funcionalidad plaquetaria y 2 viales con un agonista específico cada uno.

En algunos *surveys*, el CAP indica que, además de utilizar los agonistas que ellos proveen, se utilicen también los reactivos que el laboratorio utiliza habitualmente. De esta manera no sólo se controla la técnica y al operador, sino también los reactivos utilizados por cada laboratorio.

- PF1: 4 tubos vacutainer de citrato de sodio 3.2% y 2 tubos de plástico de 10 ml conteniendo alguna sustancia incógnita que afecte o no la funcionalidad plaquetaria.

Para llevar a cabo este *survey* se debe extraer sangre de un donante sano utilizando los tubos vacutainer que envía el CAP. Luego se debe colocar un cierto

volumen, que es detallado en las instrucciones enviadas, en cada uno de los tubos de plástico de 10 ml. Una vez realizado esto se prosigue con la metodología habitual para cada estudio, centrifugación, obtención de PRP y PPP en el caso de agregación plaquetaria y procesamiento directo de esos tubos utilizando cartucho Col/Epi y Col/ADP en el caso de PFA.

Una vez finalizado el procesamiento se deben informar los resultados en las planillas que otorga el CAP. Para el caso de agregación plaquetaria, se informa como dato numérico la amplitud máxima obtenida para cada agonista y para cada muestra, así como también si el resultado obtenido es normal o anormal.

Para prueba global plaquetaria se informa como resultado numérico el tiempo de oclusión obtenido para cada cartucho y para cada muestra, así como también si dicho resultado es normal o anormal.

El CAP también presenta en el mismo *survey* PF, la opción tanto para agregación por impedancia como para el método de liberación de ATP plaquetario. En el caso de la opción por el método de impedancia, el resultado que se informa son los ohms obtenidos, mientras que para el método de liberación de ATP, el resultado a informar es si la respuesta es normal o anormal.

Un control correcto de calidad interno y externo, controlando funcionamiento de reactivos, equipos y habilidades de procesamiento en las técnicas de funcionalidad plaquetaria es sumamente importante por las características de la muestra (viabilidad de las plaquetas *ex vivo*), y de los procedimientos involucrados en pruebas biológicas de este tipo. Además, la interpretación correcta de los hallazgos obtenidos en muestras de pacientes con alteraciones de sangrado permitirán ayudar al médico a realizar diagnósticos más precisos.

#### **Declaración de conflictos de interés:**

La autora declara que no posee conflictos de interés.

#### **Bibliografía**

1. Christie DJ, Avari T, Carrington LR et al. Platelet Function Testing by Aggregometry; Approved guideline. CLSI document H58-A. Vol 38; No. 31. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

2. Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, Hayward CPM, Kenny D, Nugent D, Nurden P, Rao AK, Schmaier AH, Watson SP, Lussana F, Pugliano MT, Michelson AD. Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry: a consensus of the working party from the platelet physiology subcommittee of SSC/ISTH. *J Thromb Haemost.* 2013;11:1183–9.
3. Femia EA, Pugliano MT, Podda G, Cattaneo M. Comparison of different procedures to prepare platelet-rich plasma for studies of platelet aggregation by light transmission aggregometry. *Platelets.* 2012;23:7-10.
4. Castilloux JF, Moffat KA, Liu Y, Seecharan J, Pai M, Hayward CPM. A prospective cohort study of light transmission platelet aggregometry for bleeding disorders: Is testing native platelet-rich plasma non-inferior to testing platelet count adjusted samples? *Thromb Haemost.* 2011;106:675–682.
5. Hayward CPM, Moffat KA, Raby A, Israels S, Plumhoff E, Flynn G, Zehnder J. Development of North American Consensus Guidelines for Medical Laboratories That Perform and Interpret Platelet Function Testing Using Light Transmission Aggregometry. *Am J Clin Pathol.* 2010; 134:955-963.
6. Hayward CPM, Moffat KA, Plumhoff E, Timleck M, Hoffman S, Spitzer E, Van Cott EM, Meijer P. External Quality Assessment of Platelet Disorder Investigations: Results of International Surveys on Diagnostic Tests for Dense Granule Deficiency and Platelet Aggregometry Interpretation. *Semin Thromb Hemost.* 2012; 38:622–631.
7. López MS, Martinuzzo M, D'Adamo MA, Barrera L, Otaño JC. Prueba global plaquetaria de hemostasia primaria (PFA). Experiencia en un hospital polivalente en Argentina. XI Congreso Argentino de Hemostasia y Trombosis. II Curso Educativo de la ISTH. *Acta Bioquímica Latinoamericana.* 2014, Suplemento 1: 29 Poster 9.
8. Favalaro EJ, Bonar R. Proficiency testing/external quality assurance for the PFA-100®. *Clin Chem Lab Med.* 2012;50(8):1393–1401.