

21. Schidlovsky, G. and Ahmed, M. (1973): *Ibid.*, **51**, 225.
 22. Hellstrom, K. E. and Hellstrom, I. (1970): *Ann. Rev. Microbiol.*, **24**, 373.
 23. Cepellini, R., Bonnard, G. D., Coppo, F., Miggiano, V. C., Pospish, M., Curtoni, E. S. and Pellagrino, M. (1971): *Transplant. Proc.* **3**, 58.
 24. Kasakura, S. (1971): *J. Immunol.*, **107**, 1296.
 25. Leikin, S. in Schwarz, M. R., ed. (1972): *Proceedings of the Vth Leukocyte Culture Conference*, p. 725. New York: Academic Press.
 26. Walker, J. S., Freeman, C. B. and Harris, R. (1972): *Brit. med. J.*, **3**, 469.
 27. Schlesinger, M. (1964): *J. Immunol.*, **93**, 255.
 28. Gusdon, J. P., Leake, N. H. and Burt, R. L. (1970): *Amer. J. Obstet. Gynec.*, **108**, 1056.
 29. Faulk, W. P., Jeannet, M., Creighton, W. D. and Carbonara, A. (1974): *J. clin. Invest.*, **54**, 1011.
 30. Overweg, J. and Engelfriet, C. P. (1969): *Vox Sang. (Basel)*, **16**, 97.
 31. Sjogren, H. O., Hellstrom, I., Bansal, S. C. and Hellstrom, K. E. (1971): *Proc. natl Acad. Sci. (Wash.)*, **68**, 1372.
 32. Baldwin, R. W., Price, M. R. and Robins, R. A. (1972): *Nature (New Biol.)*, **238**, 185.

Laboratoriumstandaardisatie en Kwaliteitskontrolle in Antistolterapie

S. BRINK, H. CLOETE, R. ROBERTS, W. HOLM

SUMMARY

Standardisation and quality control are now available for the laboratory tests which are needed to control the blood levels of anticoagulants. The most important cause for variation in results between different laboratories is the use of different types of thromboplastin. The British standards are based on the use of a national reagent with a national system of reporting supported by quality control with lyophilised plasma and thromboplastin preparations. It offers a model which has been adopted at Tygerberg Hospital, and could be used to standardise anticoagulant therapy in this country. Human brain thromboplastin is preferred to the commercially available rabbit preparations. For the first time, as far as we know, a phenol-saline extract of baboon brain thromboplastin was examined. Preliminary results indicate that it compares well with human brain extracts.

S. Afr. med. J., **50**, 205 (1976).

Standaardisatie en kwaliteitskontrolle is nou beskikbaar vir die laboratoriumtoetse wat nodig is vir die kontrole- ring van terapeutiese bloedvlakke van antistolmiddels. Quick (1947) se oorspronklike protrombientyd word mees- al gebruik, maar met 'n verskeidenheid van modifikasies. Die uiteenlopendheid van die resultate wat verkry word is te wyte aan die verskillende tipes tromboplastien wat ge-

bruik word, soos byvoorbeeld kommersiële beesbrein- of haasbrein-ekstrakte en plaaslik voorbereide mensbrein- tromboplastien. Die metodes van tromboplastien-ekstrak- sie beïnvloed ook die resultate. Asetoonpreparate, gedroog- de of salien-fenolpreparate sal verskillende resultate gee. Verskille in toetsgroepe dra verder by tot die uiteenlopende resultate van verskillende laboratoriums en die verskei- denheid doseringsvlakke wat vir antistolmiddels beskryf is. Standaardisatie en kwaliteitskontrolle was dus dringend benodig.

Die Britse sisteem van antistolkwaliteitskontrolle berus op die gebruik van 'n amptelike standaard verwysings- reagens, wat uit mensbrein-tromboplastien bestaan. Dit is die 'British comparative thromboplastin' (BCT). Stan- daardisering word verder verkry deur 'n nasionale een- vormigheid van verslaggewing, die 'British comparative ratio' (BCR). BCT is deel van die 'Manchester compara- tive reagent' (MCR) wat uniform deur die Verenigde Ko- ninkryk gebruik word en onderwerp word aan streng onafhanklike toetsprosedures deur 12 gespesialiseerde Brit- se laboratoriums. MCR word in groot maat geprosesseer onder leiding van dr. L. Poller, voorsitter van die Wêreld- gesondheidsraad se Sentrum vir Navorsing en Verwysing van Antistolkontrolereagense te Manchester. Bykans 300 Britse hospitale en ongeveer 100 corsese laboratoriums¹ neem alreeds aan hierdie skema deel. BCT word aanvaar deur die Wêreldgesondheidsraad as die internasionale standaard vir antistolkwaliteitskontrolle.

Die onderliggende prinsiep is die aanvaarding dat alle hospitale wat deelneem aan die skema, eenvormige resultate sal lewer op gegewe plasmamonsters wanneer die aange- wese protrombientydtegniek gebruik word. Die trombo- plastien gestandaardiseerde verhouding (TGV) is die ver- houding wat verwag word van 'n gegewe plasmamonster as BCT gebruik is in stede van die plaaslike tromboplastien.

Ons wil hiermee ten eerste verslag doen oor die inskake- ling van die Tygerbergse laboratorium by hierdie inter- nasionale netwerk. Ten tweede is daar vir die eerste maal,

Departement Hematologie, Tygerberg-hospitaal, Parowvallei, en Universiteit van Stellenbosch

S. BRINK, M.B. CH.B., L.F. PAT. (S.A.)
 H. CLOETE, DIP. M.L.T. (S.A.)
 R. ROBERTS, A.I.M.L.T. (U.K.)
 W. HOLM, DIP. M.L.T. (S.A.)

Gebaseer op 'n referaat gelewer tydens die 19de Akademiese Jaardag van die Mediese Fakulteit van die Universiteit van Stellenbosch, gehou te Parowvallei, 31 Julie 1975.

sover ons weet, gebruik gemaak van bobbejaanbrein-tromboplastien wat geprosesseer is met 'n fenol-salien ekstraksiemethode.

MATERIAAL EN METODEDES

'British Comparative Thromboplastin'

Dit is goedgegunstiglik verskaf deur dr. L. Poller as 'n vloeibare 0,5% fenolsuspensie, en ook in 'n poeiervorm (verkry met vriesdroging), wat per lugpos uitgestuur word en by 4°C gestoor word.

Mensbrein-tromboplastien

'n Gestandaardiseerde fenol-salien ekstraksiemethode soos voorgestel deur die Internasionale Studiegroep van Antistolkontrolering is gebruik. Twee mensbreinpreparate is tot dusver ondersoek. Die ekstraksiemethode is beskikbaar op navraag.

Bobbejaan-tromboplastien

Vars breinpreparate van bobbejane (*Papio ursinus*) is soos die mensbreinekstrakte voorberei. Twee bobbejaanpreparate is tot dusver ondersoek.

Haasbrein-tromboplastien

Kommersiële Dade, Simplastin en Hyland preparate is gerekonstitueer volgens die vervaardigers se instruksies.

Normale Plasma

Plasma is versamel in een-tiende volume van 3,8% natriumsitraat as antistolmiddel. Plasma van 20 gesonde Blanke mans is bymekaargevoeg en gestoor by -80°C in 0,1-ml deelvolumes.

Kumarienplasma

Dit is verkry vanaf pasiënte terwyl hulle warfarin antistolerapie in die Antistolkliniek te Tygerberg-hospitaal ondergaan het. Die plasma is versamel in een-tiende volume van 3,8% natriumsitraat as antistolmiddel. Die plasma is geskei na sentrifugasie van 5 minute teen 3 500 o.p.m. en is getoets binne 4 uur na versameling. Dit word gestoor, indien nodig, by 4°C.

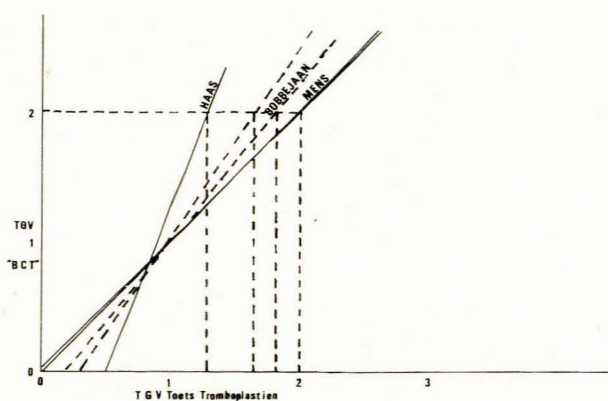
Protrombierenverhouding

Tromboplastien word in 0,1-ml hoeveelhede in chemies skoon, ongekrapte, ongebruikte, glastoetsbuisies (75 × 10 mm) geplaas. Die suspensie kan warm gehou word vir tydperke tot 1 uur voor gebruik. Byvoeging van 0,1 ml toetsplasma geskied met 'n Oxford (of soortgelyke) pipet, dit word gemeng en laat staan vir 60 sekondes tot 3 minute, waarna 0,1 ml 0,025M CaCl₂ bygevoeg word vir

rekalsifikasie. Die stolyd in sekondes word met 'n stophorlosie bepaal. Duplikaatondersoeke word op elke monster uitgevoer. Resultate word uitgedruk as protrombierenverhoudings (PV), naamlik: pasiënt se tyd/kontroletyd.

Metode vir Korrelasie met BCT en Bepaling van TGV² (Afb. 1)

Tien tot 20 monsters kumarienplasma word gebruik. Die protrombierenverhoudings word gelyktydig op dieselfde monsters getoets met die plaaslike toets-tromboplastienpreparaat en met BCT. Die verhoudings van elkeen word bepaal en met mekaar vergelyk met 'n regressielyn. BCT word arbitrêr gedefinieer met 'n TGV van 2. Die TGV van die toets-tromboplastien is waar dit met BCT se waarde van 2 ooreenstem op die regressielyn.



Afb. 1. Gemiddelde regressielyne vir korrelasie met BCT en bepaling van TGV van mensbrein- (2,0), bobbejaanbrein- (1,64 en 1,82) en kommersiële haasbrein-tromboplastien (1,15).

Rapportering van Roetinemonsters se Resultate

Die regressielyn word gebruik as 'n kalibrasiekurve vir die omsetting van die protrombierenverhouding na die nou internasionaal gekontroleerde protrombieren gestandaardiseerde verhouding (PGV). Hierdie PGV-waardes kan met gemak afgelees word vir enige toetsmonster, en is vergelykbaar met die Britse BCR sisteem van rapportering. Voorafopgestelde tabelle is beskikbaar vir verskillende TGV-vlakke (byvoorbeeld vanaf 1,3 tot 2,5), wat die roetinewerk aansienlik vergemaklik.^{3,4} Terapeutiese vlakke word aanvaar as tussen 1,8 en 3,0.

RESULTATE

Dit is belangrik dat die TGV nie te ver afwyk van die BCT se waarde van 2 nie. Die volgende is 'n voorbeeld van die waardes van 2 monsters wat met beide die plaaslike haasbrein-tromboplastien met TGV van 1,15 en met BCT getoets was. Die eerste, 'n normale monster, se stolyd was 12 sekondes met beide reagense. Die abnormale monster was 15,5 sekondes met haasbrein en 34 sekondes met BCT, wat beide dui op 'n PGV van 3. Die haasbrein

was dus minder sensitief vir veranderings. Tussen normaal en hoë antistoleratievlakke was daar 'n speling van slegs $3\frac{1}{2}$ sekondes met haasbrein-tromboplastien, in teenstelling met 22 sekondes met BCT.

Vergelyking tussen Kommersiële Haasbrein-, Bobbejaanbrein-tromboplastien en BCT

Dade se preparaat met 'n TGV van 1,31, Hyland s'n met 'n TGV van 1,18 en Simplastin met 'n TGV van 1,32 het nie so goed vergelyk met BCT as die eerste dag van die bobbejaanbrein-ekstrak, met 'n TGV van 1,84 nie. Die punt waar die regressielyn die 0-punt van die absissa gesny het was 0,01, regressie 0,99 en die helling van die lyn 0,93.

Kommersiële Haasbreinpreparate (Afb. 2)

Dade se produkte het TGVs gelewer wat gevarieer het tussen 1,14 en 1,49. Die 0-punt van die absissa het gevarieer tussen 0,78 en 1,07.

Bobbejaanbrein-tromboplastien (Afb. 2)

Die 2 bobbejaanbrein-preparate het voorlopige resultate gelewer wat goed met mensbrein vergelyk, maar wat tog nie dieselfde hoë sensitiwiteit na stabilisasie besit nie. Die TGV het tussen 1,6 en 1,7 gevarieer en die regressielyn het die absissa by die 0-punt gesny, heelwat nader as die haasbreinpreparate. Die 0,5% fenolsuspensie is stabiel by 4°C vir ten minste 76 dae, alhoewel die gehalte vinnig afneem wanneer dit by -20°C gestoor word. Na 3 maande se stoor by 4°C is daar egter gevind dat die 0-punt op die regressielyn herhaaldelik buite die aanvaarde grense vir 'n goeie toetsreagens geval het, naamlik buite $-0,2$ tot $0,2$.

Mensbrein-tromboplastien (Afb. 2, Tabel I)

Twee mensbrein-tromboplastienpreparate het na stabilisasie van 14 dae goed vergelyk met BCT, met 'n TGV

wat gewissel het tussen 1,81 en 2,16. Die regressielyn is in die meeste gevalle binne 0,2 vanaf die oorsprong, en die 2 preparate was stabiel vir 91 en 84 dae onderskeidelik, te oordeel na gereelde TGV-bepalings direk met BCT. Hierdie salien-fenolsuspensies word gebruik vir die kontroliering van die roetine antistoleratiemonsters te Tygerberg-hospitaal.

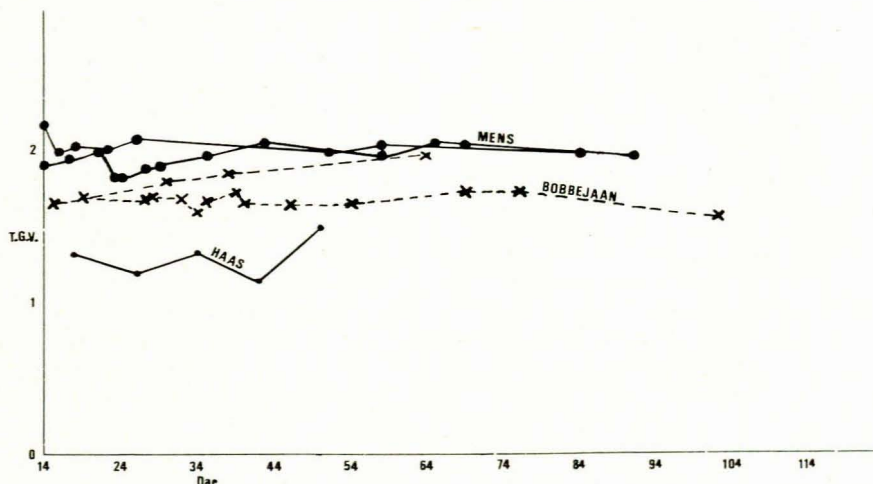
BESPREKING

Hierdie studie het twee hoofgevolge gehad. Ten eerste het dit vir die Antistolkliniek groot veranderinge meegebring. Die kontroliering van antistolvlakke deur middel van kapillêre monsters en Thrombotest, dit wil sê kommersiële preparate van beesbrein-tromboplastien is laat vaar, en daar is oorgeslaan na venepunksies en plasmamonsters en die gebruik van plaaslike vars mensbrein-tromboplastien wat met 'n fenol-salien ekstraksiemethode geprosesseer is.

Die kontrole van antistolerapie is meer betroubaar wanneer mensbrein-tromboplastien gebruik word in plaas van die huidige kommersiële haasbreinpreparate.⁴ Die eindpunt van stolling is makliker sigbaar wanneer mensbrein-tromboplastien gebruik word. Ten tweede is bobbejaan-tromboplastien geprosesseer met 'n nuwe modifikasie. Voorlopige toetse met die bobbejaanbrein-ekstrakte dui op waardes wat baie beter vergelyk met mensbrein as haasbrein.

Vyf vriesgedroogde (geliofiliseerde) verwysingstromboplastiene is nou opgestel by die Nasionale Instituut vir Biologiese Standaard en Kontrole in Londen, en elkeen is gekalibreer in terme van die sensitiwiteit van 'n oorspronklike verwysingsreagens.⁵ Hierdie preparate is opgestel vir kalibrasie van die 5 algemene tromboplastienpreparate wat op die oomblik gebruik word, en is ook beskikbaar om ons eie laboratorium se preparate mee te kalibreer. Uiteindelik kan alle tromboplastien op dieselfde basis gekalibreer word.

Streng kriteria⁶ is neergelê vir 'n aanvaarde verwysingspreparaat. Tromboplastien wat groot verskille tussen die waardes van normale en abnormale plasmas aandui, word



Afb. 2. Stabiliteit van mensbrein- en bobbejaanbrein-tromboplastien by 4°C en vergelyking met kommersiële haasbreinpreparate.

TABEL I. TGV EN OORSPRONGWAARDES VAN TOETSTROMBOPLASTIENE

Periode van stoor (dae)	Bobbejaan 1	Bobbejaan 2	Mens 1	Mens 2
14			1,89	0,10
15		1,64	0,29	
16				1,99
17			1,93	0,03
19	1,68	0,02		2,05
21			1,99	-0,14
22				2,00
23			1,81	-0,14
24			1,81	0,18
26			1,87	0,04
27	1,67	-0,07		2,10
28	1,69	0,48		-0,17
29			1,89	-0,27
30		1,78	0,20	
32	1,67	0,35		
34	1,58	0,07		
35	1,65	0,45		
38		1,84	0,28	
39	1,72	0,29		
40	1,65	0,51		
43			2,04	-0,27
46	1,63	0,73		
51				1,97
54	1,64	0,23		-0,11
58			1,95	-0,12
64		1,96	0,05	2,02
65			2,04	0,005
69	1,72	0,50	2,02	-0,10
76	1,72	0,36		
84				1,96
91			1,95	0,09
102	1,55	0,35		

sensitief genoem. 'n Lae of variërende sensitiviteit word veral vir faktor VII en X gevind. Een moontlike oorsaak vir lae sensitiviteit is kontaminasie van die tromboplastien met geaktiveerde stollingsfaktore of intermediëre bloedprodukte van die orgaan wat gebruik word vir die paraat.

Daar is 'n groot behoefte in Suid Afrika vir standaardisasie op die gebied van antistoldoseringstylakke. Uniformiteit van resultate sal verseker dat reisende pasiënte wat antistolerapie ondergaan, gereedlik by sekere hospitale kan aanmeld vir 'n bloedtoets en verseker kan wees van eenvormige bevindinge. Daar is twee moontlikhede.⁷ Ten eerste kan die laboratorium hul eie plaaslik vervaardigde mensbren-tromboplastien gebruik en dit gereeld laat kalibreer. Ten tweede kan die tromboplastien, soos in Brittanje, op groot skaal plaaslik verwerk word en in voldoende hoeveelhede beskikbaar gestel word.

Op klein skaal kan daar begin word om aan sekere hospitale in die Wes-Kaap van die Stellenbosch-gestans-

daardiseerde tromboplastien beskikbaar te stel. Hierdie dienste kan dan geleidelik uitgebrei word namate personeel en fondse vir so 'n omvattende projek beskikbaar gestel word. Ons hoop dat ons in die nabye toekoms voldoende verwerkte voorraad sal hê om 'n standaard van protrombientydtoets dwarsdeur Suid-Afrika te kan daarstel.

Ons bedank prof. J. G. Steytler, hoof van die Departement Hematologie, Tygerberg-hospitaal, vir fasiliteite om hierdie studie uit te voer, die Internasionale Studiegroep van Antistolkontrolering vir die verskaffing van BCT en die salienfenol ekstraksiemotode, en die personeel van die Karl Bremer Primaatkolonie vir die beskikbaarstelling van bobbejaanbren.

VERWYSINGS

1. Poller, L. (1975): *Thrombos. Diathes. haemorrh.* (Stuttg.), **33**, 157.
2. *Idem* (1970): *Association of Clin. Path.*: Broadsheet No. 71.
3. Biggs, R. (1972): *Human Blood Coagulation*, 1ste uitg., p. 307. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
4. Bradlow, B. A., Saunders, C., Whitbread, P., Lurie, A., Penfold, G. K. en Metz, J. (1974): *S. Afr. med. J.*, **48**, 1857.
5. Biggs, R. en Bangham, D. R. (1971): *Brit. med. J.*, **3**, 470.
6. Hills, M. en Ingram, G. I. C. (1973): *Brit. J. Haemat.*, **25**, 445.
7. Leck, I., Thompson, J. M. en Poller, L. (1973): *Ibid.*, **25**, 453.