

- Berücksichtigung der notwendigen Eiweissmenge. Arch. Hyg. 45 (1902), 11.
12. Palmblad, J., L. Levi, A. Burger, A. Melander, U. Westgren, H. von Schenk en G. Skude: Acta med. scand. 201 (1977), 15.
 13. Passmore, R. J. A., J. A. Strong, Y. E. Swindells en N. el Din: The effect of overfeeding on two fat young women. Brit. J. Nutr. 17 (1963), 373.
 14. Radcliffe, J. D. en A. J. F. Webster: Regulation of food intake during growth in fatty and lean female Zucker rats given diets of different protein content. Brit. J. Nutr. 36 (1976), 457.
 15. Warwick, P. M., R. Toft en J. S. Garrow: Individual differences in energy expenditure. Abstr. II Int. Congress on Obesity. Intern. J. Obes. 2 (1978), 396.
 16. Widdowson, E. M.: Nutritional individuality. Proc. Nutr. Soc. 21 (1962), 121.

Kwaliteitsbewaking van serumcholesterolbepalingen

door F. J. M. SCHOUTEN,
F. VAN DER HAAR*,
R. J. J. HERMUS**,
M. B. KATAN,
D. KROMHOUT***

Bij het epidemiologisch onderzoek naar de verbanden tussen voeding en atherosclerose speelt de bepaling van het cholesterolgehalte in serum een belangrijke rol. De eisen die de epidemioloog aan de kwaliteit van cholesterolbepalingen stelt, zijn in het algemeen verschillend van wat de clinicus verlangt. Voor de clinicus is vooral de vraag van belang of het meestal incidenteel bepaalde cholesterolgehalte 'normaal' of 'afwijkend' is. Kleine onnauwkeurigheden spelen daarbij geen rol, aangezien de diagnose mede tot stand komt op grond van een groot aantal andere waarnemingen. Epidemiologische onderzoeken daarentegen zijn gericht op het opsporen van vaak kleine verschillen in serumcholesterolgehalten tussen populaties – al dan niet door hetzelfde laboratorium – of volgen individuen over soms langere tijd. In deze gevallen is standaardisatie van de bepalingen essentieel.

In de standaardisatie speelt het begrip nauwkeurigheid (8) een centrale rol. De nauwkeurigheid bestaat uit twee componenten, nl. *precisie* (Engels: 'precision') en *juisheid* (Engels: 'accuracy'). De precisie heeft betrekking op de reproduceerbaarheid van de bepaling, d.w.z. in hoeverre vindt men binnen één laboratorium hetzelfde resultaat, als een cholesterolbepaling in één serum verschillende keren wordt uitgevoerd. De standaarddeviatie voor zo'n serie bepalingen, eventueel uitgedrukt in procenten van het gemiddelde (variatioëfficiënt), is een maat voor de (im)precisie. Dit geeft echter geen uitsluitel over eventuele niveauverschillen tussen laboratoria of binnen één laboratorium in de loop der jaren. Hierover verschaft de *juisheid* informatie. 'Juisheid' is gedefinieerd als de mate waarin het gemiddelde van een serie cholesterolbepalingen in één serum, uitgevoerd door een willekeurig laboratorium, overeenstemt met de door een referentielaboratorium m.b.v. een definitieve of een referentiemethode aan dat serum toegekende waarde – de zgn. 'gezochte waarde' (Engels: 'target value'). Het verschil tussen het door het willekeurige laboratorium gevonden gemiddelde en de gezochte waarde is de *onjuis-*

heid, die ook wel onzuiverheid of systematische fout wordt genoemd (Engels: 'bias' of 'systematic error').

Hoe belangrijk de juistheid en precisie van de cholesterolbepaling voor epidemiologisch onderzoek zijn, moge blijken uit het volgende voorbeeld. Voor Nederland (3, 4) is een gemiddeld serumcholesterolgehalte voor schoolkinderen van 4-13 jaar gerapporteerd dat circa 15 mg/dl (circa 0,4 mmol/l) hoger ligt dan dat van vergelijkbare groepen Amerikaanse schoolkinderen (1, 2). Zonder standaardisatie van laboratoriumbepalingen is dit gegeven van weinig belang, omdat de systematische verschillen tussen niet-gestandaardiseerde laboratoria vaak van dezelfde orde of groter zijn. Het feit echter dat alle betrokken laboratoria gestandaardiseerd zijn t.o.v. hetzelfde WHO Referentie Laboratorium sluit systematische fouten in de bepalingen voor een belangrijk gedeelte uit. Het verschil in gemiddeld serumcholesterolgehalte tussen kinderen uit beide landen is daarmee vermoedelijk reëel en zou de aanleiding kunnen vormen voor een onderzoek naar verschillen in determinanten van het serumcholesterolgehalte, zoals voedingspatronen.

Om bij epidemiologisch onderzoek naar het verband tussen voeding en serumcholesterol de precisie en juistheid te kunnen waarborgen neemt het lipidenlaboratorium van de vakgroep Humane Voeding sinds 1974 deel aan het 'Coöperatieve cholesterol standardization program' van de Wereld Gezondheidsorganisatie. Dit programma wordt gecoördineerd door het WHO Collaborating Center for Research in blood lipids, gevestigd in het Center for Disease Control te Atlanta, V.S., en door het WHO Regional Lipid Reference Center for Europe, te Praag. In het navolgende zal alleen van het eerste centrum sprake zijn.

Het programma van het Center for Disease Control bestaat uit vier fasen.

Fase I is een aanlooperperiode. Het laboratorium ontvangt hiervoor gedetailleerde vragenlijsten en instructies met betrekking tot apparatuur, chemicaliën en statistische verwerking, plus 60 serum monsters diepgevroren in droogijs. De monsters dienen in een periode van 5-10 weken geanaly-

* Thans Muhimbili Medical Center, Dar es Salaam

** Thans Centraal Instituut voor Voedingsonderzoek TNO, Zeist

*** Thans Instituut voor Sociale Geneeskunde R.U., Leiden

seerd te worden. In tegenstelling tot alle volgende zendingen worden hierbij de cholesterolgehalten van tevoren medegedeeld. Deze fase dient om het laboratorium vertrouwd te maken met de methodieken en om de belangrijkste problemen op te sporen.

In fase II wordt voor het eerst 'blind' gewerkt. Het laboratorium ontvangt wederom 60 monsters maar verneemt nu pas na afloop in hoeverre de gevonden waarden overeenkomen met de door het Center for Disease Control toegekende waarden ('target values'). Wordt hierbij aan de eisen voldaan, dan begint fase III, de eigenlijke standaardisatiefase. Hierin moeten over een periode van 9-12 maanden 120 monsters geanalyseerd worden, waarbij aan de resultaten onder meer de volgende eisen gesteld worden (7):

- het gemiddelde van de gerapporteerde waarden moet per serum binnen 5% van de gezochte waarde liggen;
- de standaardafwijking mag niet meer bedragen dan resp. 7, 8 en 9 mg/dl (resp. 0,18, 0,21 en 0,23 mmol/l) op een niveau van resp. 100-200, 200-300 en meer dan 300 mg/dl (resp. 2,6-5,2, 5,2-7,8 en meer dan 7,8 mmol/l).

Als aan de eisen voldaan wordt, mag het laboratorium over deze periode gestandaardiseerd genoemd worden en ontvangt ten bewijze hiervan een certificaat.

De nu volgende fase IV is de 'continuous surveillance'-fase en duurt in principe onbepaald. Ieder kwartaal worden 54 onbekende sera geanalyseerd en periodiek ontvangt het laboratorium een rapport met uitslagen waaruit blijkt of het certificaat nog geldig is.

Onze resultaten voor deze standaardisatieprocedure zijn afgebeeld in fig. 1. De variatiecoëfficiënt voor de externe controlesera lag in het algemeen tussen 1 en 2%, met als

hoogste waarde 2,7%. Aan de eisen voor precisie werd dus ruimschoots voldaan. De onjuistheid (systematische fout) bedroeg voor sera op het midden-niveau circa 0,5% en voor de beide andere niveaus 1 à 2%, met als uitersten +2,5 en -2,4%, en bleef dus ruim binnen de WHO-marge. Deze resultaten zijn vergelijkbaar met die van bij het WHO-referentie laboratorium gestandaardiseerde klinieken in de V.S. die zijn gespecialiseerd op lipidenonderzoek, zgn. lipid research clinics (5, 6).

Het handhaven van deze kwaliteit vereist veel tijd en uiterste aandacht. Het vermindert bovendien de produktiviteit. Van de beschikbare analyseplaatsen is nl. bij de door ons gebruikte procedures minder dan 50% beschikbaar voor de bepaling van onbekende serummonsters; de rest wordt in beslag genomen door blanco's, calibratiesera, interne en externe controles en diverse standaardisatieprocedures. Daarnaast kost de vervaardiging en ijking van zowel calibratie- als controlesera veel tijd en aandacht. Standaardisatie is daardoor een tijdrovende en kostbare zaak. Voor het adequaat kunnen interpreteren van resultaten van epidemiologisch onderzoek is deze standaardisatie echter een *conditio sine qua non*.

Dankwoord

De auteurs zijn veel dank verschuldigd aan de heer H. Verwey en mw. B. Nijhof, die een belangrijk gedeelte van de analyses uitvoerden.

Dit onderzoek werd mede mogelijk gemaakt door een subsidie van de Nederlandse Hartstichting.

Summary

Quality control of serum cholesterol determinations

Measurements of cholesterol concentrations in serum must be rigorously standardized in order to meet the requirements of epidemiological nutritional research among 'normal people'. Results for such a standardization program are reported here. Control sera were provided by the WHO Reference Center, C.D.C., Atlanta, Ga., USA. Over a two-year period, precision (expressed as coefficient of variation) varied between 0.7 and 2.7%, and accuracy (expressed as % absolute bias) between 0 and 2.5%. These values lie well within the limits set by WHO/C.D.C..

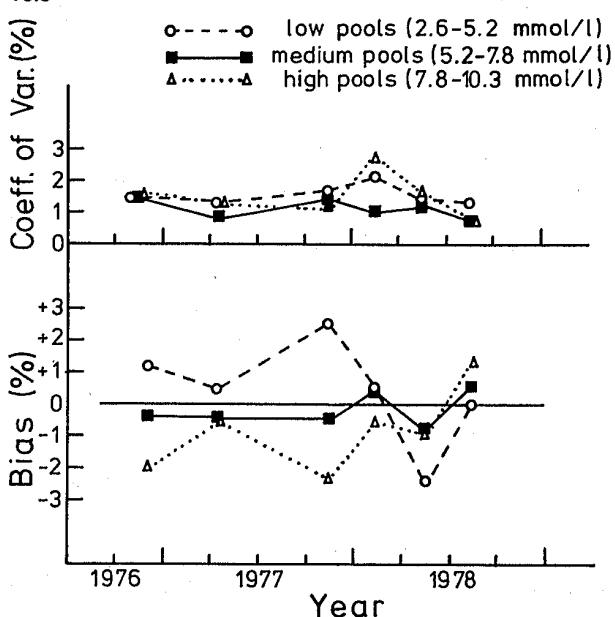
Quality control procedures are tedious and time-consuming, but without them epidemiological investigations that involve different laboratories or time-trend evaluations are at best of questionable value.

Literatuur

1. Ellefson, R. D., L. R. Eiveback, P. A. Hodgson en W. H. Weidman: Cholesterol and triglycerides in serum lipoproteins of young persons in Rochester, Minnesota. *Mayo Clin. Proc.* **53** (1978), 307.
2. Frericks, R. R., S. R. Srinivasan, L. S. Webber en G. S. Berenson: Serum cholesterol and triglyceride levels in 3446 children from a biracial community. *The Bogalusa Heart Study. Circulation* **54** (1976), 302.
3. Haar, F. van der en D. Kromhout; Food intake, nutritional anthropometry and blood chemical parameters in 3 selected Dutch schoolchildren populations. *Proefschrift. Wageningen* 1978.
4. Kromhout, D., F. van der Haar en J. G. A. J. Hautvast: Coronary heart disease risk factors in Dutch schoolchildren - results of a pilot study. *Prev. Med.* **6** (1977), 500.
5. Lippel, K. et al.: Analytical performance and comparability of the determination of cholesterol by twelve lipid research clinics. *Clin. Chem.* **23** (1977), 1744.

Fig. 1. Precisie (uitgedrukt als variatiecoëfficiënt) en juistheid (uitgedrukt als procentuele systematische fout) voor de bepaling van cholesterolconcentraties in externe controlesera met verschillende niveaus

Fig. 1. Precision (expressed as coefficient of variation) and accuracy (expressed as % bias) for the determination of cholesterol concentrations of external control sera at several levels



6. Lippel, K. et al.: External quality-control survey of cholesterol analysis performed by twelve lipid research clinics. *Clin. Chem.* 24 (1978), 1477.
7. **Manual of laboratory operations.** Lipid research clinics pro-

gram. Vol. I. Lipid and lipoprotein analysis. DHEW Publ. (NIH) 75-628, 1974.

8. **Nederlands Normalisatie Instituut.** Terminologie voor het beschrijven van meetnauwkeurigheid. NEN 3114. Rijswijk 1973.

Aanwijzingen voor een rol van voedingseiwitten bij de beïnvloeding van het serumcholesterolgehalte

door R. J. J. HERMUS*,
A. H. M. TERPSTRA
G. M. DALLINGA-THIE

Dierlijk voedsel en atherosclerose

In 1908-1909 publiceerde IGNATOWSKI (14) de resultaten van zijn voedingsexperimenten met konijnen. Deze hadden tot doel de gevolgen te onderzoeken van de consumptie van voor deze dieren ongewoon voedsel zoals melk, vlees en eieren, voor de stofwisseling en nierfunctie van herbivoren. Een en ander in relatie tot de veranderde voedingsgewoonten in het Rusland van toen. In het verloop van deze experimenten nam hij waar dat vele van zijn dieren duidelijke veranderingen in de aorta vertoonden. Deze veranderingen bestonden vooral uit een verdikking van de intima, gepaard gaande met het verschijnen van grote cellen; een beeld dat gelijkenis vertoont met atherosclerose bij de mens. IGNATOWSKI (14) schreef deze aortaveranderingen toe aan directe beschadiging van de arteriewand door het dierlijke eiwit. Hiermee waren voor de eerste maal atherosclerotische verschijnselen experimenteel opgewekt en was een weg aangegeven voor verder experimenteren. Verder onderzoek (1910-1912) naar de aard van het atherogène agens in het dierlijk voedsel bracht STUCKEY (23) tot de opvatting dat niet eiwitrijk voedsel, zoals b.v. kippevlees, maar vooral voedsel, rijk aan vetachtige stoffen, de beschreven vaatveranderingen kon opwekken. Met name eierdooier en hersenen bleken sterk werkzaam. STUCKEY meende eerst het effect van neutraal vet (triglyceriden) te kunnen uitsluiten, terwijl WESSELKIN (24) ook voor lecithine geen werking kon aantonen. In feite bleef dus alleen het cholesterol als atherogeen agens over. ANITSCHKOW (1) rondde vervolgens het, aan de Petersburgse geneeskundige militaire academie verrichte, werk af. Hij diende aan zijn konijnen gedurende 1-4 maanden 0,2-0,8 g cholesterol per dag, opgelost in 10-12 ml zonnebloemolie, per maagsonde toe. De dieren kregen verder hun normale voer bestaande uit hooi en haver. Bij alle dieren die cholesterol hadden toegediend gekregen, waren, in tegenstelling tot de controles die uitsluitend zonnebloemolie kregen, veranderingen in de aortawand opgetreden. Deze veranderingen bestonden hoofdzakelijk uit een afzetting van dubbelbrekende kristallen van vetachtige stoffen in de intima van de aorta, alsmede uit hyperplasie van de vaatwand. ANITSCHKOW (1) concludeerde dat de veranderingen onder invloed van cholesterol identiek waren aan die welke IGNA-

TOWSKI (14) met dierlijk voedsel en STUCKEY (23) met eigeel en hersenen hadden opgewekt. De zogenaamde voedings-geïnduceerde atherosclerose werd blijkbaar veroorzaakt door het cholesterol dat in dit voedsel aanwezig was. Deze conclusie werd nog versterkt doordat eveneens in deze periode LEMOINE (17) door chemisch onderzoek van humaan autopsiemateriaal cholesterol als belangrijkste component van het atheroom identificeerde.

Atherosclerose zonder cholesterol

Niet alleen door het werk van ANITSCHKOW kwam het cholesterol centraal te staan bij de bestudering van atherogenese, maar ook het voeren van cholesterol werd essentieel beschouwd voor de inductie van experimentele atherosclerose. Zelfs ARMSTRONG (2) schreef nog recent in zijn overzicht over diermodellen: 'Dietary cholesterol is generally used as a sine qua non for the induction of atherosclerosis. Some exogenous source of sterol... seems to be necessary for significant lesion formation in most species'. Echter, LAMBERT c.s. (16) en WIGAND (25) publiceerden onafhankelijk van elkaar dat hypercholesterolemie en atherosclerose konden worden geïnduceerd bij konijnen met een cholesterolvrij, semisynthetisch rantsoen. Vooral omdat ook de aanwezigheid van vet in dit rantsoen géén vereiste is voor de inductie van hypercholesterolemie, ontstond weer meer belangstelling voor de invloed van de overige bestanddelen van het voedsel op verschijnselen, samenhangend met atherosclerose. Een semisynthetisch rantsoen bestaat uit een eiwit, meest caseïne, zetmeel en/of suiker, een variabele hoeveelheid vet, vitamines, mineralen en materiaal dat volume en bulk geeft, als cellulose, stro of houtzaagsel.

Konijnen, die worden gevoerd met normaal handelsvoer, bezitten zeer lage cholesterolwaarden (25-27 mg/100 ml) en vertonen nooit atherosclerose. Ook indien aan dit handelsvoer verzadigd vet wordt toegevoegd, gaat het serumcholesterol nauwelijks omhoog en ontstaat er géén atherosclerose. KRITCHEVSKY en TEPPER (15) onderzochten een groot aantal factoren uit het handelsvoer, die niet of in mindere mate aanwezig waren in het semisynthetisch rantsoen, doch konden geen duidelijke oorzaak voor dit effect vinden. HOWARD c.s. (12) wist echter een sterke reductie van het serumcholesterol en de graad van atherosclerose te bewerkstelligen door caseïne in het semisynthetisch dieet

* Thans CIVO-TNO, Zeist