

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ REVIEW

Βιολογικοί δείκτες για την εκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης Εφαρμογές και μέθοδοι

Η εκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης του πληθυσμού είναι σημαντική για την αξιολόγηση συσχετίσεων διατροφής και υγείας και τον σχεδιασμό παρεμβάσεων σε ατομικό επίπεδο και στην κοινότητα. Μεταξύ των μεθόδων που χρησιμοποιούνται για την καταγραφή των διατροφικών δεδομένων περιλαμβάνονται οι ανακλήσεις πρόσληψης 24ώρου, τα ερωτηματολόγια συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων και τα διατροφικά ημερολόγια. Ωστόσο, πηγές σφαλμάτων μπορεί να επηρεάσουν τη σχετική εγκυρότητα των μεθόδων καταγραφής διατροφικών δεδομένων. Η μέτρηση των επιπέδων δεικτών σε βιολογικά δείγματα συστήνεται ως αντικειμενικός δείκτης καταγραφής και παρακολούθησης της πρόσληψης, καθώς και ως μέθοδος αναφοράς για τον έλεγχο της σχετικής εγκυρότητας των διατροφικών ερωτηματολογίων (βιοδείκτες πρόσληψης, *biomarkers of intake*). Η πλειοψηφία των έγκυρων και αξιόπιστων δεικτών μετράται σε δείγματα αίματος και ούρων 24ώρου. Η λήψη και η διαχείριση των δειγμάτων αίματος γίνεται από κατάλληλα εκπαιδευμένο προσωπικό, ενώ η συλλογή ούρων 24ώρου πραγματοποιείται εξ ολοκλήρου από τους συμμετέχοντες. Στην παρούσα ανασκόπηση παρουσιάζονται οι ευρέως χρησιμοποιούμενοι διατροφικοί βιοδείκτες, καθώς και τα στάδια προετοιμασίας και συλλογής δείγματος ούρων 24ώρου για τη μέτρηση των δεικτών σε επιδημιολογικές μελέτες. Η πλήρης και ορθή συλλογή των βιολογικών δειγμάτων συμβάλλει στην αξιόπιστη μέτρηση των δεικτών και στο πλαίσιο αυτό σαφείς οδηγίες που θα επιτρέψουν την ορθότερη εφαρμογή του πρωτοκόλλου από τους συμμετέχοντες είναι απαραίτητες.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η καταγραφή της διατροφικής πρόσληψης από τους συμμετέχοντες συχνά χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της κατανάλωσης τροφίμων και θρεπτικών συστατικών και την αξιολόγηση των διατροφικών συνθηκών του πληθυσμού, καθώς και των συσχετίσεων διατροφής και υγείας.¹ Η συλλογή των διατροφικών δεδομένων μπορεί να γίνει με μεθόδους καταγραφής σε πραγματικό χρόνο (*real-time recording methods*) ή ανάκλησης (*recall methods*). Στην πρώτη κατηγορία ανήκει η τήρηση διατροφικού ημερολογίου (*food diary*) 24ώρου ή περισσότερων ημερών (συνήθως 3–7 ημέρες) με ή χωρίς ζύγιση των τροφίμων που καταναλώνονται. Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν οι μέθοδοι ανάκλησης περιστασιακής πρόσληψης (όπως η ανάκληση πρόσληψης 24ώρου, *24hour dietary recall*) ή συνήθους πρόσληψης (όπως η συμπλήρωση διατροφικού ιστορικού ή ερωτηματολογίου συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων,

Food Frequency Questionnaire). Σε μελέτες διατροφικής επιτήρησης (*nutrition surveillance*) χρησιμοποιούνται συχνότερα οι μέθοδοι ανάκλησης 24ώρου ή τήρησης διατροφικού ημερολογίου, ενώ το ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων εφαρμόζεται κυρίως σε μελέτες που στόχο έχουν τη συσχέτιση της συνήθους διατροφής με τον κίνδυνο νόσησης.^{1,2}

Όμοια, με κάθε μέτρηση βιολογικού ή άλλου χαρακτηριστικού καθώς και στην εκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης μπορεί να ενέχονται τυχαία και συστηματικά σφάλματα, τα οποία επηρεάζουν την ακρίβεια και τη σχετική εγκυρότητα των εκτιμώμενων προσλήψεων, καθώς και των συσχετίσεων παραγόντων της διατροφής με τον κίνδυνο νόσησης. Πιθανές πηγές συστηματικών σφαλμάτων αποτελούν η αδυναμία ανάκλησης του είδους και της ποσότητας των καταναλισκόμενων τροφίμων από τον συμμετέχοντα, σφάλματα στους πίνακες σύνθεσης τροφίμων που χρησιμο-

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2019, 36(1):47–55
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2019, 36(1):47–55

Α. Νιφόρου,¹
Α. Νάσκα,^{1,2}
Φ. Ορφανός,^{1,2}
Ε. Βαλάνου,¹
Ε. Πέππα,¹
Α. Τριχοπούλου^{1,2}

¹Ελληνικό Ίδρυμα Υγείας, Αθήνα
²Συνεργαζόμενο Κέντρο Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας για τη Διατροφή και την Υγεία, Εργαστήριο Υγιεινής, Επιδημιολογίας και Ιατρικής Στατιστικής, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα

Biomarkers for the assessment of dietary intake: Applications and methods

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

Βιοδείκτες
Διατροφή
Επιδημιολογία
Ούρα 24ώρου

Υποβλήθηκε 21.12.2017
Εγκρίθηκε 29.12.2017

ποιούνται στον υπολογισμό της πρόσληψης ενέργειας και θρεπτικών συστατικών, όπως και η εμπρόθετα εσφαλμένη περιγραφή της κατανάλωσης συγκεκριμένων τροφίμων (π.χ. υπερ-εκτίμηση της κατανάλωσης φρούτων/λαχανικών) ή θρεπτικών συστατικών (π.χ. υπο-εκτίμηση της πρόσληψης λιπών/σακχάρων) από τον συμμετέχοντα, η οποία μπορεί να καθορίζεται από χαρακτηριστικά όπως το φύλο, η ηλικία και το σωματικό βάρος των ατόμων.¹⁻³

Οι διατροφικοί βιοχημικοί δείκτες (*dietary biomarkers*) αποτελούν διατροφο-εξαρτώμενα συστατικά που μετρώνται σε βιολογικά δείγματα (ούρα, αίμα και άλλους ιστούς) και μπορεί να αντανakλούν είτε τα επίπεδα της διατροφικής πρόσληψης, είτε τη μεταβολική πορεία ενός συστατικού των τροφίμων, ή την κατάσταση θρέψης (*nutritional status*) ενός ατόμου. Είναι επίσης πιθανό να αποτελούν δείκτες λειτουργικότητας ή κλινικής κατάστασης του ατόμου ως προς την πρόσληψη απαραίτητων ή άλλων θρεπτικών συστατικών. Υπό μια ευρεία έννοια, οι διατροφικοί βιοδείκτες μπορεί να θεωρηθούν ως η βιολογική συνέπεια της πρόσληψης συστατικών των τροφών, π.χ. αποβολή της περίσσειας του προσλαμβανόμενου νατρίου στα ούρα ή στα επίπεδα ομοκυστεΐνης ορού σε σχέση με την πρόσληψη φυλλικού οξέος με την τροφή. Εκτός από την εκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης ή της κατάστασης θρέψης ενός ατόμου, βιοδείκτες χρησιμοποιούνται και ως μέθοδοι αναφοράς για τον έλεγχο της σχετικής εγκυρότητας (*relative validity*) διατροφικών ερωτηματολογίων.^{1,2,4}

Η παρούσα ανασκόπηση εστιάζει χαρακτηριστικά στην παρουσίαση των κατ' εξοχήν χρησιμοποιούμενων βιοδεικτών διατροφικής πρόσληψης (*biomarkers of intake*), καθώς και στα ζητήματα μεθοδολογίας κατά τη χρήση τους.

2. ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ

Οι βιοδείκτες διατροφικής πρόσληψης παρέχουν στοιχεία για την κατανάλωση τροφίμων και θρεπτικών συστατικών, αντανakλώντας είτε την πρόσφατη είτε τη συνήθη διατροφική πρόσληψη του ατόμου ή τον μεταβολισμό παραγόντων της διατροφής. Είναι δυνατόν να μετρηθούν:^{1,5} (α) Σε δείγματα ούρων, πλάσματος και ορού αίματος, αντανakλώντας την πρόσληψη των πρόσφατων ωρών ή ημερών, (β) σε ερυθροκύτταρα ή λιπώδη ιστό, παρέχοντας στοιχεία για την πρόσληψη των προηγούμενων εβδομάδων ή μηνών και (γ) σε δείγματα ονύχων, δοντιών ή τριχών, αντανakλώντας την πρόσληψη των προηγούμενων μηνών ή ετών.

2.1. Κατηγοριοποίηση των βιοδεικτών διατροφικής πρόσληψης

Ανάλογα με τη φύση της σχέσης μεταξύ της διατροφικής

πρόσληψης και των επιπέδων του δείκτη, οι βιοδείκτες ταξινομούνται επίσης σε:⁵

2.1.1. Δείκτες πλήρους ή μερικής ανάκτησης (βιοδείκτες ανάκτησης)

Ακολουθούν δοσο-εξαρτώμενη σχέση με την πρόσληψη, είναι ευαίσθητοι και δεν επηρεάζονται από διατομικές (*inter-individual*) διαφορές στη μεταβολική πορεία των διατροφικών συστατικών. Οι βιοδείκτες ανάκτησης (*recovery biomarkers*) αποτελούν τις κατ' εξοχήν χρησιμοποιούμενες μεθόδους αναφοράς για την εκτίμηση της σχετικής εγκυρότητας των διατροφικών ερωτηματολογίων. Παραδείγματα δεικτών ανάκτησης αποτελούν τα επίπεδα προϊόντων μεταβολισμού του διπλά επισημασμένου ύδατος (*doubly labelled water, DLW*) στα ούρα που αντανakλούν την ενεργειακή κατανάλωση, και τα επίπεδα αζώτου και καλίου επίσης στα ούρα, τα οποία αντανakλούν την πρόσληψη πρωτεϊνών και καλίου, αντίστοιχα. Στην κατηγορία αυτή μπορεί να συμπεριληφθούν και βιοδείκτες που επίσης ακολουθούν σχέση δόσης-απόκρισης με τη διατροφική πρόσληψη, αλλά τα τελικώς ανακτώμενα βιολογικά επίπεδα είναι χαμηλότερα της πρόσληψης. Στην αγγλική βιβλιογραφία οι βιοδείκτες αυτοί αναφέρονται ως "predictive biomarkers", ενώ παραδείγματα αποτελούν η φρουκτόζη και η σουκρόζη ούρων 24ώρου (δείκτες πρόσληψης σακχάρων).

2.1.2. Δείκτες συγκέντρωσης

Σχετίζονται με τη διατροφική πρόσληψη αλλά επηρεάζονται από τον μεταβολισμό του ατόμου ή άλλα προσωπικά χαρακτηριστικά, όπως η ηλικία, το φύλο, η παχυσαρκία, το κάπνισμα και η σωματική δραστηριότητα. Καθώς οι βιοδείκτες συγκέντρωσης (*concentration biomarkers*) δεν αντανakλούν την απόλυτη διατροφική πρόσληψη, είναι λιγότερο κατάλληλοι για την εκτίμηση της σχετικής εγκυρότητας των ερωτηματολογίων αλλά χρησιμοποιούνται σε μελέτες συσχέτισης παραγόντων της διατροφής με τον κίνδυνο νόσησης. Παραδείγματα δεικτών της εν λόγω κατηγορίας αποτελούν τα επίπεδα λιπαρών οξέων στο αίμα και στον λιπώδη ιστό, ηλεκτρολυτών στα ούρα και βιταμινών στο αίμα, περιλαμβανομένων των καροτενοειδών.

2.1.3. Δείκτες αντικατάστασης

Οι δείκτες αντικατάστασης (*replacement biomarkers*) είναι παρόμοιοι με τους δείκτες συγκέντρωσης αλλά αναφέρονται σε συστατικά με περιορισμένες ή μη διαθέσιμες πληροφορίες στους πίνακες σύνθεσης τροφίμων. Π.χ. στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι αφλατοξίνες και μερικά φυτοοιστρογόνα.

2.2. Παράγοντες που επηρεάζουν τις τιμές των δεικτών διατροφικής πρόσληψης

Εκτός από την πρόσληψη, τα επίπεδα των βιοδεικτών επηρεάζονται από πλήθος άλλων παραγόντων, όπως:^{1,5,6}

2.2.1. Γενετικοί παράγοντες

Γενετικοί παράγοντες συμβάλλουν στις μεταξύ των ατόμων παρατηρούμενες διαφορές σχετικά με την απορρόφηση, τον μεταβολισμό, την κατανομή, την αποθήκευση και την έκκριση θρεπτικών συστατικών. Η γενετική ποικιλομορφία, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ γονιδίων, αλλά και μεταξύ γονιδίων και θρεπτικών συστατικών ενδέχεται να οδηγούν σε διαφορετικές αποκρίσεις στους διατροφικούς παράγοντες.

2.2.2. Παράγοντες που σχετίζονται με προσωπικά χαρακτηριστικά και επιλογές διαβίωσης

Παράγοντες που σχετίζονται με προσωπικά χαρακτηριστικά και επιλογές διαβίωσης, όπως το φύλο, η ηλικία, το σωματικό βάρος, η κοινωνικοοικονομική κατάσταση, το κάπνισμα, η κατανάλωση οινοπνεύματος και η λήψη διατροφικών συμπληρωμάτων, επηρεάζουν τις τιμές των δεικτών διατροφικής πρόσληψης. Επίσης, φυσιολογικοί μηχανισμοί, όπως η εντεροηπατική κυκλοφορία θρεπτικών συστατικών (λιγνάνες, φυτοοιστρογόνα), η βακτηριακή χλωρίδα του εντέρου, οι μεταβολικές και οι φλεγμονώδεις διαταραχές, το stress και υποκείμενα νοσήματα επίσης επηρεάζουν τα επίπεδα των δεικτών.

2.2.3. Διατροφικοί παράγοντες

Οι διατροφικοί παράγοντες μπορεί να αφορούν σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ των θρεπτικών συστατικών ή σε μεταβολές στην περιεκτικότητα των τροφίμων λόγω της θερμικής ή άλλης επεξεργασίας τους. Για παράδειγμα, η περιεκτικότητα λαχανικών σε βιταμίνη C εξαρτάται από τη θερμική τους κατεργασία καθώς σε υψηλές θερμοκρασίες η βιταμίνη οξειδώνεται. Επίσης, η απορρόφηση του φυλλικού

οξέος περιορίζεται με την ταυτόχρονη υψηλή πρόσληψη φυτικών ινών, ενώ η αξιοποίηση των καρτενοειδών μπορεί να επηρεάζεται από την περιεκτικότητα της διατροφής σε λιπίδια, δεδομένης της λιποδιαλυτότητάς τους.

2.2.4. Παράγοντες που σχετίζονται με τον τύπο του εξεταζόμενου βιολογικού δείγματος, τις διαδικασίες συλλογής, μεταφοράς και επεξεργασίας, καθώς και τις συνθήκες αποθήκευσής του

Παράγοντες που σχετίζονται με τον τύπο του εξεταζόμενου βιολογικού δείγματος (π.χ. ούρα, πλάσμα, ορός), τις διαδικασίες συλλογής, μεταφοράς και επεξεργασίας, καθώς και τις συνθήκες αποθήκευσής του. Για παράδειγμα, η έκθεση του πλάσματος στο φως και σε ακατάλληλες θερμοκρασίες μπορεί να προκαλέσει οξείδωση της βιταμίνης C και επομένως τη μείωση των επιπέδων της στο ληφθέν δείγμα.

2.2.5. Τεχνικές ανάλυσης των δειγμάτων

Συγκεκριμένα, τα επίπεδα των βιοδεικτών επηρεάζονται από την ακρίβεια και τα όρια ανίχνευσης των τεχνικών ανάλυσης, καθώς και τις μεταξύ των εργαστηρίων διακυμαινόμενες εκτιμήσεις.

Εξ αιτίας των ανωτέρω παραγόντων, ο αριθμός των αξιόπιστων και έγκυρων βιοδεικτών που μπορεί να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης είναι περιορισμένος.

2.3. Ευρέως χρησιμοποιούμενοι βιοδείκτες διατροφικής πρόσληψης

Στους πίνακες 1–3 συνοψίζονται οι ευρέως χρησιμοποιούμενοι βιοδείκτες της πρόσληψης μακροθρεπτικών συστατικών, βιταμινών, μετάλλων και ιχνοστοιχείων. Συγκεκριμένα, παρατίθενται τα διατροφικά συστατικά τα οποία αντανakλούν οι βιοδείκτες και παρουσιάζονται στοιχεία σχετικά με την ερμηνεία τους. Οι πληροφορίες

Πίνακας 1. Βιοδείκτες διατροφικής πρόσληψης, βιολογικά δείγματα όπου ανευρίσκονται και η χρήση τους – μακροθρεπτικά συστατικά.

Βιοδείκτης πρόσληψης	Βιολογικό δείγμα	Σχόλια για τη χρήση τους
<i>Μακροθρεπτικό συστατικό/δείκτης</i>		
Πρωτεΐνη/επίπεδα αζώτου ^{5,7,8}	Ούρα 24ώρου	Σε υγιές ενήλικο άτομο το οποίο βρίσκεται σε ισοζύγιο αζώτου, η πρωτεΐνη που λαμβάνεται μέσω της τροφής σχετίζεται ισχυρά με το άζωτο το οποίο αποβάλλεται στα ούρα κατά τη διάρκεια ενός 24ώρου
Σάκχαρα/φρουκτόζη και σουκρόζη ^{5,9}	Ούρα 24ώρου	Οι συγκεντρώσεις σουκρόζης και φρουκτόζης σε ούρα 24ώρου μπορεί να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση της πρόσληψης απλών σακχάρων

Πίνακας 2. Βιοδείκτες διατροφικής πρόσληψης, βιολογικά δείγματα όπου ανευρίσκονται και η χρήση τους – βιταμίνες.

Βιοδείκτης πρόσληψης	Βιολογικό δείγμα	Σχόλια για τη χρήση τους
<i>Βιταμίνη/δείκτης</i>		
Vit C/ασκορβικό οξύ ^{5,10,11}	Πλάσμα	Δείκτης κατάλληλος σε περιπτώσεις χαμηλών προσλήψεων της βιταμίνης
Vit D/25-υδροξυβιταμίνη D [25(OH)D] ¹²	Ορός	Δείκτης πρόσληψης της βιταμίνης κατάλληλος για την αξιολόγηση πληθυσμών με χαμηλή έκθεση σε UV-B ακτινοβολία
Vit K/φυλλοκινόνη ¹³	Αίμα	Δείκτης βραχυχρόνιας διατροφικής πρόσληψης (short-term intake)
Φυλλικό οξύ ¹⁴	Ορός/πλάσμα	Δείκτης πρόσφατης πρόσληψης
	Ερυθροκύτταρα	Δείκτης μακροχρόνιας πρόσληψης (long-term intake)
Vit A ¹⁵	Τιμές συγκέντρωσης στο ήπαρ ή συνολική περιεκτικότητα σώματος	Ικανοποιητική συσχέτιση με τη συνήθη πρόσληψη βιταμίνης A, σε ευρύ φάσμα τιμών προσλήψεων
Θειαμίνη (vit B ₁) ¹⁶	Ούρα 24ώρου	Δείκτης πρόσφατης πρόσληψης σε άτομα με επαρκή επίπεδα της βιταμίνης
Ριβοφλαβίνη (vit B ₂) ¹⁷	Ούρα 24ώρου (κατά προτίμηση) ή πρωινό δείγμα ούρων	Δείκτης πρόσφατης πρόσληψης
Παντοθενικό οξύ (vit B ₅) ¹⁸	Ούρα	Δείκτης πρόσφατης πρόσληψης

Πίνακας 3. Βιοδείκτες διατροφικής πρόσληψης, βιολογικά δείγματα όπου ανευρίσκονται και η χρήση τους – μέταλλα και ιχνοστοιχεία.

Βιοδείκτης πρόσληψης	Βιολογικό δείγμα	Σχόλια για τη χρήση τους
<i>Μέταλλα, ιχνοστοιχεία/δείκτης</i>		
Ιώδιο ¹⁹	Ούρα 24ώρου Περιστασιακή συλλογή δειγματος ούρων	Δείκτης πρόσφατης πρόσληψης, εφόσον το άτομο βρίσκεται σε σταθερή κατάσταση (steady state) Επιτρέπει την εκτίμηση της διάμεσης τιμής πρόσληψης σε επίπεδο πληθυσμού
Μολυβδαίνιο ²⁰	Ούρα 24ώρου Πλάσμα	Δείκτης βραχυχρόνιας πρόσληψης (short-term intake) Δείκτης μακροχρόνιας πρόσληψης (long-term intake)
Κάλιο ^{5,21,22}	Ούρα 24ώρου	Μία συλλογή 24ώρου ανά άτομο (single 24h collection) αρκεί για την εκτίμηση της μέσης ημερήσιας πρόσληψης του πληθυσμού. Πολλαπλές συλλογές ανά άτομο απαιτούνται για την εκτίμηση της συνήθους πρόσληψης ενός ατόμου
Σελήνιο ²³	Ούρα Τρίχες/όνυχες	Δείκτης πρόσφατης πρόσληψης Δείκτης μακροχρόνιας πρόσληψης
Νάτριο ²²	Ούρα 24ώρου	Μία συλλογή 24ώρου ανά άτομο αρκεί για την εκτίμηση της μέσης ημερήσιας πρόσληψης του πληθυσμού. Πολλαπλές συλλογές ανά άτομο απαιτούνται για την εκτίμηση της συνήθους πρόσληψης ενός ατόμου
Χρώμιο ²⁴	Ούρα/πλάσμα/ορός	Οι τιμές περιεκτικότητας των βιολογικών δειγμάτων αντανακλούν μεταβολές μετά τη λήψη διατροφικών συμπληρωμάτων. Δεν είναι όμως σαφές αν αντανακλούν και μεταβολές στη συνήθη πρόσληψη

που παρατίθενται στους πίνακες προέρχονται από τις αντίστοιχες επιστημονικές γνωμοδοτήσεις της Ευρωπαϊκής Αρχής Ασφάλειας Τροφίμων σχετικά με τις τιμές αναφοράς της διατροφικής πρόσληψης των εκάστοτε θρεπτικών συστατικών (The European Food Safety Agency Opinions on Dietary Reference Values). Για τα θρεπτικά συστατικά που δεν αναφέρονται στους πίνακες 1–3 δεν υπάρχει διαθέσιμος βιοδείκτης τον οποίο, σύμφωνα με την τρέχουσα γνώση, η Αρχή να θεωρεί επαρκώς αξιόπιστο και έγκυρο για την αξιολόγηση της διατροφικής πρόσληψης των ατόμων.

Για την εκτίμηση της συνολικής ενεργειακής δαπάνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος του DLW.^{2,5,7} Ο υπολογισμός βασίζεται στην παρακολούθηση του ρυθμού έκκρισης στα ούρα δύο δειγμάτων ισοτόπων ύδατος (H₂¹⁸O και ²H₂O) σε διάστημα 15 ημερών. Οι μετρήσεις στα ούρα χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση των εκλυόμενων με την αναπνοή όγκων CO₂ και O₂, οι οποίοι στη συνέχεια χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της συνολικής ενεργειακής δαπάνης βάσει ειδικών εξισώσεων θερμομετρίας. Αν και οι εκτιμήσεις βασίζονται σε αρκετές

παραδοχές, η ακρίβεια των μετρήσεων εξαρτάται από τα αναλυτικά εργαστήρια και το κόστος των υλικών και αναλύσεων είναι σημαντικό, η μέθοδος πλεονεκτεί γιατί παρέχει στοιχεία για την ενεργειακή δαπάνη που σχετίζονται με το σύνολο των δραστηριοτήτων του ατόμου και δεν προκαλεί όχληση στους συμμετέχοντες στο πλαίσιο της καθημερινότητάς τους.²⁵ Τέλος, για την εκτίμηση της πρόσληψης των ω-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (συγκεκριμένα, του εικοσαπεντανοϊκού οξέος [EPA] και του δοκοσαεξανοϊκού οξέος [DHA]) μπορεί να χρησιμοποιηθούν μετρήσεις της συγκέντρωσης αυτών στο πλάσμα και στον λιπώδη ιστό.²⁹

Όπως διαφαίνεται από τα ανωτέρω στοιχεία, ο αριθμός των διαθέσιμων έγκυρων βιοδεικτών διατροφικής πρόσληψης είναι περιορισμένος. Για τον λόγο αυτόν, η αξιολόγηση της πρόσληψης των ατόμων εξακολουθεί να βασίζεται στη συμπλήρωση ερωτηματολογίων, τα οποία όμως πρέπει προηγουμένως να έχουν αξιολογηθεί ως προς τη σχετική εγκυρότητά τους μέσω συγκρίσεων με τα επίπεδα βιοδεικτών της διατροφικής πρόσληψης.

2.4. Οι βιοδείκτες διατροφικής πρόσληψης ως μέθοδοι αναφοράς στην αξιολόγηση διατροφικών ερωτηματολογίων

Η εκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης μέσω των επιπέδων δεικτών σε βιολογικά δείγματα χρησιμοποιείται σε μελέτες αξιολόγησης της σχετικής εγκυρότητας διατροφικών ερωτηματολογίων. Οι μελέτες αυτές έχουν ως στόχο την αξιολόγηση της συσχέτισης της εκτιμώμενης με την πραγματική πρόσληψη, η οποία αντανάκλαται στα επίπεδα των βιοδεικτών. Οι βιοδείκτες δεν βασίζονται στην υποκειμενική καταγραφή/ανάκληση της διατροφικής πρόσληψης, δεν επηρεάζονται από την ακρίβεια των πινάκων σύνθεσης τροφίμων και επομένως δεν υπόκεινται σε σφάλματα όμοια με εκείνα των ερωτηματολογίων. Ωστόσο, έχουν και οι ίδιοι περιορισμούς στη χρήση τους, καθώς εξωγενείς (π.χ. σφάλματα συλλογής, διαχείρισης και ανάλυσης δειγμάτων) και ενδογενείς παράγοντες (π.χ. η μεταβολική πορεία ενός θρεπτικού συστατικού) μπορεί να επηρεάσουν τις τιμές τους.^{1,2}

Οι βιοδείκτες διατροφικής πρόσληψης που χρησιμοποιούνται συχνότερα για την αξιολόγηση της σχετικής εγκυρότητας ερωτηματολογίων είναι τα επίπεδα αζώτου και καλίου σε δείγμα ούρων 24ώρου, μετρήσεις που είναι οικονομικές, εύκολες και πρακτικές.^{5,7,8,22,26} Χρήσιμη είναι επίσης και η τεχνική του διπλά επισημασμένου ύδατος για την αξιολόγηση των τιμών της συνολικής ενεργειακής πρόσληψης, όπως αυτές υπολογίζονται από τα διατροφικά ερωτηματολόγια.^{5,7}

3. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ

Η πλειοψηφία των έγκυρων και αξιόπιστων δεικτών μετράται σε δείγματα αίματος και ούρων 24ώρου. Η λήψη και η διαχείριση των δειγμάτων αίματος γίνεται από κατάλληλα εκπαιδευμένο προσωπικό και μπορεί να εξαρτάται από τον μετρούμενο δείκτη. Η συλλογή ούρων 24ώρου, όμως, πραγματοποιείται εξ ολοκλήρου από τους συμμετέχοντες στη μελέτη και στη συνέχεια παρουσιάζονται τα στάδια προετοιμασίας και συλλογής δείγματος ούρων 24ώρου στο πλαίσιο επιδημιολογικών ερευνών ή σε μελέτες αξιολόγησης της σχετικής εγκυρότητας διατροφικών ερωτηματολογίων. Αν και στο κείμενο που ακολουθεί έμφαση δίνεται σε στοιχεία που ενδέχεται να επηρεάσουν τα αποτελέσματα πληθυσμιακών μελετών, η επαρκής ενημέρωση και η κατάλληλη εκπαίδευση των ατόμων για τη συλλογή ούρων 24ώρου μπορεί να αφορά και σε άλλες κλινικές πράξεις.

3.1. Συλλογή δείγματος ούρων 24ώρου για τη μέτρηση βιοδεικτών διατροφικής πρόσληψης

3.1.1. Κριτήρια επιλογής συμμετεχόντων

Τα κριτήρια επιλογής των ατόμων για συμμετοχή καθορίζονται από το αντικείμενο της μελέτης, λαμβάνοντας υπ' όψη και τους παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν τα μετρούμενα επίπεδα των δεικτών. Παραδείγματος χάρη, νόσοι και καταστάσεις όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, η καρδιακή ανεπάρκεια, η νεφρική νόσος, σύνδρομο δυσαπορρόφησης, οίδηματώδεις καταστάσεις, η λήψη διουρητικών ή άλλων φαρμάκων επηρεάζουν το ισοζύγιο ύδατος και επομένως άτομα με διάγνωση τέτοιων καταστάσεων δεν μπορούν να συμπεριληφθούν στη μελέτη. Επίσης, η κατάσταση εγκυμοσύνης και η τήρηση ειδικού διατροφικού προγράμματος αποτελούν παράγοντες αποκλεισμού από τη συμμετοχή.^{7,27,28}

3.1.2. Προετοιμασία της μελέτης

3.1.2.1. Ηθικοί προβληματισμοί. Η συλλογή ανθρώπινων βιολογικών δειγμάτων και σχετικών δεδομένων ενέχει ηθικά ζητήματα. Η έγκριση της μελέτης από την αρμόδια επιτροπή Βιοηθικής είναι απαραίτητη για την επιβεβαίωση της διεξαγωγής της με τον ορθό ηθικά τρόπο, τη διασφάλιση και προστασία των δικαιωμάτων των συμμετεχόντων και την εξασφάλιση των όρων πρόσβασης των συλλεγόμενων πληροφοριών. Πριν από τη διεξαγωγή οποιασδήποτε συνέντευξης ή συλλογής δειγμάτων, οι συμμετέχοντες πρέπει να ενημερώνονται για τον σκοπό αυτής και να δίνουν την ενυπόγραφη συγκατάθεσή τους. Είναι σημαντικό να τονί-

ζεται επίσης η διασφάλιση του απορρήτου της ταυτότητας των συμμετεχόντων και το γεγονός ότι οι ίδιοι έχουν το δικαίωμα να γνωρίζουν τις λεπτομέρειες της συμμετοχής τους, τη χρήση των δεδομένων που συλλέγονται, τις αναλύσεις και τα αποτελέσματα τα οποία θα προκύψουν.^{2,28}

3.1.2.2. Προγραμματισμός των σταδίων της μελέτης. Είναι σημαντικό να καθορίζεται εξ αρχής ο χρόνος συλλογής και ο χώρος παράδοσης των δειγμάτων ούρων 24ώρου. Οι συμμετέχοντες αποφασίζουν μετά από συνεννόηση με τους ερευνητές την ημέρα συλλογής. Είναι προτιμότερο οι συμμετέχοντες να επιλέξουν για τη συλλογή μια ημέρα που θα βρίσκονται περισσότερο στον τόπο κατοικίας τους ή θα χρειαστεί να βρεθούν εκτός για μικρό χρονικό διάστημα. Η παράδοση των ούρων 24ώρου πρέπει να γίνεται εντός μίας ημέρας από την ολοκλήρωση της συγκέντρωσης του δείγματος. Αν δεν είναι εφικτή η μεταφορά αμέσως μετά τη συλλογή, το δείγμα μπορεί να διατηρηθεί σε δροσερό και σκιερό μέρος για 1–2 ημέρες, μέχρι τη μεταφορά του. Στην περίπτωση που το πρωτόκολλο της μελέτης προβλέπει και τη συλλογή πρόσθετων στοιχείων μέσω ερωτηματολογίων, συστήνεται η συμπλήρωση των ερωτηματολογίων να γίνεται την ημέρα παράδοσης των δειγμάτων ούρων.²⁸ Οι διαδικασίες συλλογής των δειγμάτων και προετοιμασίας τους για μεταφορά πρέπει να περιγράφονται λεπτομερώς και με σαφήνεια στο πρωτόκολλο της μελέτης. Η επικοινωνία με το εργαστήριο ανάλυσης των δειγμάτων, η περιγραφή της εργαστηριακής διαχείρισης και των τεχνικών ανάλυσης θα πρέπει επίσης να καταγράφονται. Τέλος, για την επίτευξη υψηλών ποσοστών συμμετοχής και την αποφυγή συστηματικού σφάλματος μη απόκρισης (non-response bias) συστήνεται η χρήση κινήτρων προς τους συμμετέχοντες είτε στην έναρξη συλλογής των στοιχείων ή, προτιμότερα, κατά την ολοκλήρωσή της. Πιθανά κίνητρα αποτελούν η συμβολική χρηματική αμοιβή, η προσφορά δελτίων συμμετοχής σε κληρώσεις ή ένα συμβολικό μη χρηματικό δώρο.²

3.1.3. Συλλογή των δεδομένων

Η συλλογή ούρων 24ώρου παρουσιάζει δυσκολίες καθώς καθιστά περισσότερο ενεργή τη συμμετοχή του ατόμου προκαλώντας σε αυτό πρόσθετη επιβάρυνση, ενώ προϋποθέτει, παράλληλα, ειδικό σχεδιασμό για τη συλλογή, τη μεταφορά, την ασφάλεια και την ανάλυση των δειγμάτων. Για τη συλλογή, οι συμμετέχοντες λαμβάνουν (α) τουλάχιστον δύο δοχεία συλλογής των ούρων του 24ώρου, (β) ένα βοηθητικό για τη συλλογή χωνί (για τις γυναίκες κυρίως), (γ) μια παραμάνα για την υπενθύμιση της συλλογής και (δ) ένα ημερολόγιο για την καταγραφή της ημερομηνίας και της ώρας έναρξης και λήξης της συλλογής, παρατηρήσεων όπως τη λήψη φαρμακευτικής αγωγής ή

διατροφικών συμπληρωμάτων και πιθανών αποκλίσεων από το πρωτόκολλο συλλογής (π.χ. απώλεια ούρων).

3.1.3.1. Οδηγίες προς τους συμμετέχοντες. Η ολοκληρωμένη συλλογή ούρων 24ώρου απαιτεί την κατανόηση της διαδικασίας και την τήρηση του πρωτοκόλλου από τον συμμετέχοντα. Στην πρώτη συνάντηση, τα άτομα πρέπει να λαμβάνουν γραπτές οδηγίες για τη συλλογή του δείγματος. Οι ερευνητές οφείλουν να εξηγούν τη διαδικασία κατ' αρχάς προφορικά και στη συνέχεια να διαθέτουν χρόνο στους συμμετέχοντες να διαβάσουν τις γραπτές οδηγίες και να διατυπώσουν ερωτήσεις. Επίσης, είναι ιδιαίτερα σημαντικό οι ερευνητές να διευκρινίζουν στους συμμετέχοντες ότι δεν πρέπει να αλλάξουν τις διατροφικές τους συνήθειες πριν ή κατά τη διάρκεια της συλλογής. Η συλλογή των ούρων 24ώρου αρχίζει με την απομάκρυνση των πρώτων πρωινών ούρων την ημέρα έναρξης της συλλογής. Στη συνέχεια, καταγράφεται στο ημερολόγιο η ημέρα και η ώρα αυτής της πρώτης πρωινής ούρησης (ημέρα και ώρα έναρξης της συλλογής). Ακολούθως, τα ούρα που αποβάλλονται κατά τη διάρκεια της ημέρας, δηλαδή των επόμενων 24 ωρών, συλλέγονται όλα στο δοχείο συλλογής. Για τη συμπλήρωση του 24ώρου, στο δοχείο θα αποθηκευτούν και τα πρώτα πρωινά ούρα της επόμενης ημέρας. Με τη συλλογή του τελευταίου δείγματος του 24ώρου καταγράφεται στο ημερολόγιο η ημέρα και η ώρα αυτού (ημέρα και ώρα λήξης της συλλογής). Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή ώστε να μην υπάρχουν καθόλου απώλειες από το δείγμα των ούρων που συλλέγεται. Εάν όμως κάτι τέτοιο συμβεί, ζητείται από τον συμμετέχοντα να σημειώσει μια εκτίμηση της ποσότητας που χάθηκε στο ημερολόγιο. Στο ημερολόγιο συλλογής, τα άτομα καταγράφουν επίσης αποκλίσεις από τις οδηγίες (πρωτόκολλο) συλλογής, καθώς και άλλες παρατηρήσεις εφόσον υπάρχουν.^{7,27,28}

3.1.3.2. Σωματομετρικά χαρακτηριστικά. Στοιχεία για το σωματικό βάρος και το ανάστημα των συμμετεχόντων είναι χρήσιμα για την περαιτέρω ανάλυση των δεδομένων και πρέπει να συλλέγονται κατά τη διαδικασία.²⁸ Συστήνεται η μέτρηση (και όχι η δήλωση) των σωματομετρικών χαρακτηριστικών των συμμετεχόντων, η οποία θα πραγματοποιείται υπό προτυποποιημένες συνθήκες και με συσκευές που βαθμονομούνται σε τακτά χρονικά διαστήματα.

3.1.4. Εκτίμηση της πληρότητας της συλλογής (completeness of 24h urine collection)

Η εκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης με τη μέτρηση βιοδεικτών σε ούρα 24ώρου μπορεί να επηρεαστεί από τη μη ολοκληρωμένη συλλογή (incomplete collection), η οποία έχει ως αποτέλεσμα την υποεκτίμηση των επιπέδων των μετρούμενων δεικτών (αρνητικό σφάλμα). Παράλληλα έχει

παρατηρηθεί και συλλογή δείγματος πέραν των 24 ωρών, με αποτέλεσμα την υπερεκτίμηση των μετρήσεων (θετικό σφάλμα).²⁹ Επομένως, είναι σημαντικό να εξασφαλιστεί η ολοκληρωμένη ορθή συλλογή, γεγονός που απαιτεί τη σύνταξη απλών και κατανοητών οδηγιών για τους συμμετέχοντες και εξαρτάται από την επαρκή ενημέρωση και εκπαίδευσή τους.

Υπάρχουν διαθέσιμα διάφορα κριτήρια και τεχνικές για την εκτίμηση της πληρότητας των συλλεγομένων ούρων. Το παρα-αμινοβενζοϊκό οξύ (PABA), μια μη τοξική βιταμίνη του συμπλέγματος Β, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αντικειμενικός εξωγενής δείκτης καθώς αποβάλλεται στα ούρα μέσα σε 24 ώρες και επηρεάζεται λιγότερο από τα χαρακτηριστικά και τη διατροφή του ατόμου. Για τη χρήση της εν λόγω τεχνικής απαιτείται η λήψη από τα άτομα δισκίου PABA μαζί με τα γεύματα προκειμένου να ανιχνευτεί το στοιχείο στα ούρα. Επομένως, η επιβάρυνση των συμμετεχόντων, η ανάγκη συμμόρφωσής τους με τις οδηγίες για την ορθή λήψη των δισκίων, το πρόσθετο κόστος, καθώς και η αλληλεπίδρασή του με άλλα φάρμακα ή συμπληρώματα διατροφής καθιστούν τη χρήση του δυσχερή. Η τεχνική όμως χορήγησης δισκίων PABA θεωρείται ως η πλέον αξιόπιστη για την αξιολόγηση της πληρότητας της συλλογής και συχνά στη βιβλιογραφία αναφέρεται ως η μέθοδος αναφοράς.

Μεταξύ άλλων μεθόδων που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της πλήρους συλλογής περιλαμβάνεται η 24ωρη έκκριση κρεατινίνης σε σχέση με την αναμενόμενη έκκριση κρεατινίνης βάσει του βάρους και του φύλου του ατόμου, υπό την προϋπόθεση ότι η ημερήσια έκκριση κρεατινίνης στα ούρα είναι σταθερή. Επίσης, τα επίπεδα κρεατινίνης 24ώρου μπορεί να συνδυαστούν και με άλλα χαρακτηριστικά της συλλογής (π.χ. συνολικός όγκος ούρων 24ώρου, διάρκεια συλλογής, αναφερόμενη απώλεια ή παράλειψη ούρων).²⁹

Σύμφωνα με τη συστηματική ανασκόπηση οκτώ μελετών που χρησιμοποιούσαν τα επίπεδα PABA στα ούρα για τον έλεγχο της πληρότητας της συλλογής ούρων 24ώρου, το ποσοστό των μη ολοκληρωμένων συλλογών κυμαινόταν μεταξύ 6% και 47%, γεγονός που αναδεικνύει το μέγεθος του πιθανού προβλήματος. Επίσης χρησιμοποιώντας την τεχνική PABA ως μέθοδο αναφοράς, οι συγγραφείς αξιολόγησαν την εγκυρότητα άλλων μεθόδων της βιβλιογραφίας.²⁹

Μέθοδοι που βασίζονται στα επίπεδα κρεατινίνης 24ώρου φαίνεται να πλεονεκτούν έναντι άλλων μεθόδων για την αναγνώριση ελλιπών συλλογών ούρων, μετά από σύγκριση με αποτελέσματα κατά τη λήψη δισκίων PABA. Συγκεκριμένα, υπολογίζεται ο λόγος κρεατινίνης (creatinine index), ο οποίος ορίζεται ως το πηλίκο των επιπέδων

κρεατινίνης στο ληφθέν δείγμα ούρων και των αναμενόμενων επιπέδων βάσει προσωπικών χαρακτηριστικών. Στη βιβλιογραφία προτείνονται κυρίως δύο εξισώσεις για τον υπολογισμό των αναμενόμενων επιπέδων κρεατινίνης 24ώρου. Η πρώτη εξαρτάται από το φύλο και αξιοποιεί στοιχεία σωματικού βάρους των ατόμων. Σύμφωνα με αυτή:³⁰ Αναμενόμενα επίπεδα κρεατινίνης (24ώρου)= $24 \times \text{σωματικό βάρος (στους άνδρες)} - \text{αναμενόμενα επίπεδα κρεατινίνης (24ώρου)} = 21 \times \text{σωματικό βάρος (στις γυναίκες)}$. Εκτός από το φύλο και το σωματικό βάρος, η δεύτερη εξίσωση χρησιμοποιεί επίσης στοιχεία για την ηλικία των ατόμων, τα επίπεδα πρόσληψης πρωτεΐνης με την τροφή και λαμβάνει υπ' όψη αλληλεπιδράσεις του σωματικού βάρους με το φύλο. Συγκεκριμένα:³¹ Αναμενόμενα επίπεδα κρεατινίνης (24ώρου)= $9,36 - 3,14 (\text{φύλο}) + 0,07 (\text{σωματικό βάρος}) + 0,09 (\text{φύλο} \times \text{βάρος}) - 0,09 (\text{ηλικία}) + 0,02 (\text{πρόσληψη πρωτεΐνης})$. Δείγμα ούρων θεωρείται πλήρες όταν ο λόγος κρεατινίνης είναι $\geq 0,7$. Βάσει των αποτελεσμάτων τριών μελετών, η ευαισθησία του κριτηρίου κρεατινίνης κυμαίνεται από 5,6–63,2% και η ειδικότητα από 81,2–99,5%. Για την επιλογή της κατάλληλης μεθόδου προτιμώνται κριτήρια με υψηλή ειδικότητα και μέτρια ευαισθησία. Σε ευαισθητοποιημένο και επαρκώς ενημερωμένο δείγμα συμμετεχόντων με χαμηλό επιπολασμό μη ολοκληρωμένων συλλογών, η υψηλή ειδικότητα εξασφαλίζει υψηλή θετική διαγνωστική αξία, δηλαδή υψηλό ποσοστό ορθά επιλεγμένων δειγμάτων ως συλλογές με ελλιπή ολοκλήρωση. Σε πληθυσμό 654 γυναικών με επαρκή ενημέρωση για την ορθή συλλογή,³² το 71% των δειγμάτων χαρακτηρίστηκαν ορθά ως μη ολοκληρωμένα βάσει του λόγου κρεατινίνης³⁰ (θετική διαγνωστική αξία=70,8%).

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η χρήση των διατροφικών βιοδεικτών επιτρέπει την εκτίμηση της πρόσληψης συγκεκριμένων μακρο- και μικροθρεπτικών συστατικών και της κατάστασης θρέψης των ατόμων, χωρίς να υπεισέρχονται τα σφάλματα μεθόδων που βασίζονται στην αναφορά από τον συμμετέχοντα (διατροφικά ερωτηματολόγια και ημερολόγια). Ωστόσο, η συλλογή, η διαχείριση και η αποθήκευση των βιολογικών δειγμάτων, οι μεταβολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών της τροφής, καθώς και τα προσωπικά χαρακτηριστικά των ατόμων (ενδεικτικά αναφέρονται: ηλικία, κάπνισμα, παχυσαρκία, επίπεδα σωματικής άσκησης) μπορεί να επηρεάσουν τα επίπεδα των δεικτών. Το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας του Παιδιού και Ανθρώπινης Ανάπτυξης των ΗΠΑ (US National Institute of Child Health and Human Development) υποστηρίζει από το 2013 το ερευνητικό πρόγραμμα BOND (Biomarkers of Nutrition for Development

program), το οποίο αποσκοπεί στην εναρμόνιση ζητημάτων που αφορούν στη χρήση διατροφικών βιοδεικτών και στην παροχή υποστήριξης στην επιστημονική κοινότητα κατά τη λήψη αποφάσεων σχετικά με τη χρήση τους.³³ Στην Ευρώπη, το 2014 άρχισε το πρόγραμμα FoodBAII (Food Biomarkers

Alliance), που στοχεύει στην ανάπτυξη στρατηγικών για την αναγνώριση και την αξιολόγηση νέων βιοδεικτών οι οποίοι θα καλύπτουν το ευρύ φάσμα τροφίμων που καταναλώνονται στην Ευρώπη.³⁴

ABSTRACT

Biomarkers for the assessment of dietary intake: Applications and methods

A. NIFOROU,¹ A. NASKA,^{1,2} P. ORFANOS,^{1,2} E. VALANOU,¹ E. PEPPA,¹ A. TRICHOPOULOU^{1,2}
¹Hellenic Health Foundation, Athens, ²WHO Collaborating Centre for Nutrition and Health, Department of Hygiene, Epidemiology and Medical Statistics, School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2019, 36(1):47–55

Dietary assessment in the context of observational and experimental epidemiological studies is required to evaluate associations between diet and health, and for developing public health interventions at both the individual and the community level. Among the methods used to collect nutritional data are 24-hour dietary recalls, food frequency questionnaires and food diaries. Sources of error are, however, inherent in all these methods and may affect their relative validity. The measurement of markers in biological samples (dietary biomarkers) is considered an objective indicator for recording and monitoring dietary intake, and is often used to assess intake and to evaluate the relative validity of dietary questionnaires. The majority of valid and reliable biomarkers are measured in blood and 24-hour urine samples. Blood samples are collected and managed by appropriately trained personnel, while 24-hour urine collection is performed entirely by the study participants. This review presents the most commonly used biomarkers for the assessment of intake, and also the preparation for and collection of 24-hour urine samples for epidemiological studies. Complete, accurate collection of biological samples is of great importance for reliable assessment, and therefore clear guidelines that will enhance the compliance of participants are essential.

Key words: Biomarkers, Diet, Epidemiology, Nutrition, 24-hour urine collection

Βιβλιογραφία

1. NASKA A, LAGIOU A, LAGIOU P. Dietary assessment methods in epidemiological research: Current state of the art and future prospects. *F1000Res* 2017, 6:926
2. ΝΑΣΚΑ Α, ΜΠΑΜΙΑ Χ, ΒΑΛΑΝΟΥ Ε, ΤΡΙΧΟΠΟΥΛΟΥ Α. Διατροφικές έρευνες: Αντικείμενο, μεθοδολογία και εφαρμογή τους στον ελληνικό πληθυσμό. *Αρχ Ελλ Ιατρ* 2003, 20:142–171
3. MACDIARMID J, BLUNDELL J. Assessing dietary intake: Who, what and why of under-reporting. *Nutr Res Rev* 1998, 11:231–253
4. POTISCHMAN N, FREUDENHEIM JL. Biomarkers of nutritional exposure and nutritional status: An overview. *J Nutr* 2003, 133(Suppl 3):873S–874S
5. JENAB M, SLIMANI N, BICTASH M, FERRARI P, BINGHAM SA. Biomarkers in nutritional epidemiology: Applications, needs and new horizons. *Hum Genet* 2009, 125:507–525
6. POTISCHMAN N. Biologic and methodologic issues for nutritional biomarkers. *J Nutr* 2003, 133(Suppl 3):875S–880S
7. SUBAR AF, KIPNIS V, TROIANO RP, MIDTHUNE D, SCHOELLER DA, BINGHAM S ET AL. Using intake biomarkers to evaluate the extent of dietary misreporting in a large sample of adults: The OPEN study. *Am J Epidemiol* 2003, 158:1–13
8. MCKEOWN NM, DAY NE, WELCH AA, RUNSWICK SA, LUBEN RN, MULLIGAN AA ET AL. Use of biological markers to validate self-reported dietary intake in a random sample of the European Prospective Investigation into Cancer United Kingdom Norfolk cohort. *Am J Clin Nutr* 2001, 74:188–196
9. HEDRICK VE, DIETRICH AM, ESTABROOKS PA, SAVLA J, SERRANO E, DAVY BM. Dietary biomarkers: Advances, limitations and future directions. *Nutr J* 2012, 11:109
10. AL-DELAIMY WK, SLIMANI N, FERRARI P, KEY T, SPENCER E, JOHANSSON I ET AL. Plasma carotenoids as biomarkers of intake of fruits and vegetables: ecological-level correlations in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Eur J Clin Nutr* 2005, 59:1397–1408
11. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY PANEL ON DIETETIC PRODUCTS, NUTRITION AND ALLERGIES (NDA). Scientific opinion on the dietary reference values for vitamin C. *EFSA Journal* 2013,

- 11:3418 [68 pp]
12. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY PANEL ON DIETETIC PRODUCTS, NUTRITION AND ALLERGIES (NDA). Scientific opinion on the dietary reference values for vitamin D. *EFSA Journal* 2016, 14:4547 [145 pp]
 13. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY PANEL ON DIETETIC PRODUCTS, NUTRITION AND ALLERGIES (NDA); TURCK D, BRESSON JL, BURLINGAME B, DEAN T, FAIRWEATHER-TAIT S ET AL. Scientific opinion on the dietary reference values for vitamin K. *EFSA Journal* 2017, 15:4780 [78 pp]
 14. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY PANEL ON DIETETIC PRODUCTS, NUTRITION AND ALLERGIES (NDA). Scientific opinion on dietary reference values for folate. *EFSA Journal* 2014, 12:3893 [59 pp]
 15. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY PANEL ON DIETETIC PRODUCTS, NUTRITION AND ALLERGIES (NDA). Scientific opinion on dietary reference values for vitamin A. *EFSA Journal* 2015, 13:4028 [84 pp]
 16. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY PANEL ON DIETETIC PRODUCTS, NUTRITION AND ALLERGIES (NDA); TURCK D, BRESSON JL, BURLINGAME B, DEAN T, FAIRWEATHER-TAIT S ET AL. Scientific opinion on dietary reference values for thiamin. *EFSA Journal* 2016, 14:4653 [53 pp]
 17. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY PANEL ON DIETETIC PRODUCTS, NUTRITION AND ALLERGIES (NDA); TURCK D, BRESSON JL, BURLINGAME B, DEAN T, FAIRWEATHER-TAIT S ET AL. Scientific opinion on dietary reference values for riboflavin. *EFSA Journal* 2017, 15:4919 [65 pp]
 18. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY PANEL ON DIETETIC PRODUCTS, NUTRITION AND ALLERGIES (NDA). Scientific opinion on dietary reference values for pantothenic acid. *EFSA Journal* 2014, 12:3581 [25 pp]
 19. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY PANEL ON DIETETIC PRODUCTS, NUTRITION AND ALLERGIES (NDA). Scientific opinion on dietary reference values for iodine. *EFSA Journal* 2014, 12:3660 [57 pp]
 20. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY PANEL ON DIETETIC PRODUCTS, NUTRITION AND ALLERGIES (NDA). Scientific opinion on dietary reference values for molybdenum. *EFSA Journal* 2013, 11:3333 [35 pp]
 21. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY PANEL ON DIETETIC PRODUCTS, NUTRITION AND ALLERGIES (NDA); TURCK D, BRESSON JL, BURLINGAME B, DEAN T, FAIRWEATHER-TAIT S ET AL. Scientific opinion on dietary reference values for potassium. *EFSA Journal* 2016, 14:4592 [56 pp]
 22. FREEDMAN LS, COMMINS JM, MOLER JE, WILLETT W, TINKER LF, SUBAR AF ET AL. Pooled results from 5 validation studies of dietary self-report instruments using recovery biomarkers for potassium and sodium intake. *Am J Epidemiol* 2015, 181:473–487
 23. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY PANEL ON DIETETIC PRODUCTS, NUTRITION AND ALLERGIES (NDA). Scientific opinion on dietary reference values for selenium. *EFSA Journal* 2014, 12:3846 [67 pp]
 24. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY PANEL ON DIETETIC PRODUCTS, NUTRITION AND ALLERGIES (NDA). Scientific opinion on dietary reference values for chromium. *EFSA Journal* 2014, 12:3845 [25 pp]
 25. SCHOELLER DA. Measurement of energy expenditure in free-living humans by using doubly labeled water. *J Nutr* 1988, 118:1278–1289
 26. TASEVSKA N, RUNSWICK SA, BINGHAM SA. Urinary potassium is as reliable as urinary nitrogen for use as a recovery biomarker in dietary studies of free living individuals. *J Nutr* 2006, 136:1334–1340
 27. CRISPIM SP, DE VRIES JH, GEELEN A, SOUVEREIN OW, HULSHOF PJ, LAFAY L ET AL. Two non-consecutive 24 h recalls using EPIC-Soft software are sufficiently valid for comparing protein and potassium intake between five European centres – results from European Food Consumption Validation (EFCOVAL) study. *Br J Nutr* 2011, 105:447–458
 28. CAPPUCCIO FP. How to obtain measures of population level sodium intake in 24-h urine samples. Protocol prepared for the WHO-EMRO region, Warwick, 2013
 29. JOHN KA, COGSWELL ME, CAMPBELL NR, NOWSON CA, LEGETIC B, HENNIS AJ ET AL. Accuracy and usefulness of select methods for assessing complete collection of 24-hour urine: A systematic review. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2016, 18:456–467
 30. JOOSSENS JV, GEBOERS J. Monitoring the salt intake of the population: Methodological considerations. EC Workshop, Ghent, 1983
 31. DE KEYSER W, HUYBRECHTS I, DEKKERS AL, GEELEN A, CRISPIM S, HULSHOF PJ ET AL. Predicting urinary creatinine excretion and its usefulness to identify incomplete 24 h urine collections. *Br J Nutr* 2012, 108:1118–1125
 32. MURAKAMI K, SASAKI S, TAKAHASHI Y, UENISHI K, WATANABE T, KOHRI T ET AL. Sensitivity and specificity of published strategies using urinary creatinine to identify incomplete 24-h urine collection. *Nutrition* 2008, 24:16–22
 33. COMBS GF Jr, TRUMBO PR, MCKINLEY MC, MILNER J, STUDENSKI S, KIMURA T ET AL. Biomarkers in nutrition: New frontiers in research and application. *Ann N Y Acad Sci* 2013, 1278:1–10
 34. FOODBALL. Food biomarkers alliance. Available at: <http://foodmetabolome.org/>

Corresponding author:

A. Trichopoulou, Hellenic Health Foundation, 13 Kaisareias and Alexandroupoleos street, 115 27 Athens, Greece
e-mail: atrichopoulou@hhf-greece.gr