

STICHTING
MATHEMATISCH CENTRUM
2e BOERHAAVESTRAAT 49
AMSTERDAM

STATISTISCHE AFDELING

LEIDING: PROF. DR D. VAN DANTZIG
ADVISEUR VOOR STATISTISCHE CONSULTATIE: PROF. DR J. HEMELRIJK

Rapport S 243

Onderzoek naar de invloed van vitamine K bij
pasgeboren kinderen, - Statistische analyse (II)

door

A.R. Bloemena

januari 1959

The Mathematical Centre at Amsterdam, founded the 11th of February 1946, is a non-profit institution aiming at the promotion of pure mathematics and its applications, and is sponsored by the Netherlands Government through the Netherlands Organization for Pure Research (Z.W.O.) and the Central National Council for Applied Scientific Research in the Netherlands (T.N.O.), by the Municipality of Amsterdam and by several industries.

1. Inleiding.

De statistische analyse van de waarnemingen van het eerste deel van het onderzoek naar de invloed van vitamine K bij pasgeboren kinderen is beschreven in rapport S 241 van de Statistische Afdeling van het Mathematisch Centrum.

In het eerste deel is de vraag onderzocht of toediening van 1 mg vitamine K_1 resp. K_3 van invloed was op de prothrombinetijd en het bilirubinegehalte. Duidelijke aanwijzingen voor het bestaan van een dergelijke invloed zijn hierbij evenwel niet gevonden.

In het tweede deel van het onderzoek is alleen vitamine K_1 onderzocht en wel in een dosis van 2 mg.

De waarnemingen zijn verricht bij 54 pasgeborenen, die verpleegd werden in de couveuse-afdeling van het Binnen-Gasthuis tussen 26 april 1958 en 6 oktober 1958. Op analoge wijze als in het eerste deel werden de pasgeboren kinderen in twee groepen ingedeeld, waarbij de kinderen van de ene groep vitamine K_1 toegediend kregen en die van de andere groep een placebo.

2. De aselectering.

In rapport S 241 is onderzocht of bij het eerste deel van het onderzoek de aselecte wijze van indeling inderdaad tot het gewenste resultaat heeft geleid. Wij zullen dit eveneens nagaan voor het tweede deel.

In Tabel I zijn de gemiddelden vermeld van de waarnemingen van

1. geboortegewicht,
2. prothrombinetijd op de eerste dag, en
3. bilirubinegehalte op de eerste dag,

hoewel aan deze gemiddelden alléén weinig betekenis kan worden toegekend.

Tabel I¹⁾: Gemiddelden van de waarnemingen van geboortegewicht, prothrombinetijd en bilirubinegehalte op de eerste dag van de geboorte.

	geen vitamine K	wel vitamine K
geboortegewicht	2181	2249
prothrombinetijd op de eerste dag	21,5	18,5
bilirubinegehalte op de eerste dag	3,3	2,8

De vraag of, bijvoorbeeld, het geboortegewicht van de kinderen die vitamine K toegediend kregen systematisch hoger dan wel lager is dan dat van de kinderen, die geen vitamine K kregen, kan worden beantwoord met behulp van een statistische toets. Een korte beschrijving van de gang van zaken bij het toetsen van hypothesen is gegeven in het memorandum S 47 (M 6) dat als bijlage is toegevoegd aan rapport S 241. De hier toegepaste toets is de toets van WILCOXON (zie memorandum S 47 (M 7), dat als bijlage aan S 241 is toegevoegd). De gevonden overschrijdingskansen zijn:

geboortegewicht: $k = 0,49$

prothrombinetijd op de eerste dag: $k = 0,67$

bilirubinegehalte op de eerste dag: $k = 0,23$.

Er is, gezien deze relatief grote overschrijdingskansen, geen reden te concluderen dat de aseletering niet voldoende is geweest.

Een andere kwestie is, dat een klein verschil tussen de gemiddelde prothrombinetijd op de eerste dag van de twee groepen pasgeborenen van veel invloed kan zijn op de uitkomst, ook al is het verschil in gemiddelde, statistisch gezien, weinig belangrijk. Indien, zoals hier, de groep van de

1) De interpretatie van de getallen in deze tabel moet met zeer grote voorzichtigheid geschieden; zie de voetnoot op pagina 3 van rapport S 241.

kinderen, die vitamine K toegediend kregen, een relatief lage prothrombinetijd op de eerste dag hadden, dan mag men verwachten, dat ook indien het vitamine K geen invloed heeft, toch de kinderen, die vitamine K kregen, iets eerder op het normale niveau waren dan de andere kinderen. Ten-einde de mogelijkheid van het optreden van een dergelijk schijneffect uit te sluiten, hebben wij in de volgende paragrafen de pasgeborenen ingedeeld in drie groepen; binnen iedere groep kan dan de invloed van vitamine K bestudeerd worden. Door het combineren van de resultaten komt men dan toch tot één resultaat, terwijl men het optreden van een schijneffect zo veel mogelijk heeft uitgesloten.

3. Vergelijking van de daling van de prothrombinetijd.

Evenals in rapport S 241 is het materiaal naar de beginwaarde van de prothrombinetijd in drie groepen gesplitst:

groep A prothrombinetijd (eerste dag) $< 17,00$

groep B prothrombinetijd (eerste dag) $\geq 17,00$ maar $\leq 19,50$

groep C prothrombinetijd (eerste dag) $\geq 19,50$.

In tabel II zijn de gemiddelden vermeld van de waargenomen dalingen van de prothrombinetijden tussen de eerste en de derde, resp. de zesde dag. De aantallen kinderen, waarop de gemiddelden zijn gebaseerd, zijn tussen haakjes aangegeven.

Tabel II¹⁾: Gemiddelde daling van de prothrombinetijd.

Behandeling:		geen vitamine K	vitamine K
Groep A	tussen eerste en derde dag	-2,0 (8)	+ 1,4 (13)
	tussen eerste en zesde dag	+1,1 (8)	+ 1,7 (13)
Groep B	tussen eerste en derde dag	+0,7 (10)	+ 3,7 (8)
	tussen eerste en zesde dag	+1,4 (10)	+ 4,5 (6)
Groep C	tussen eerste en derde dag	+9,1 (10)	+8,1 (5)
	tussen eerste en zesde dag	+10,0 (10)	+13,0 (4)

1) Zie voetnoot op pagina 2.

Voor elke groep kan nu worden getoetst of de daling van de eerste tot de derde, resp. zesde dag systematisch verschilt voor kinderen, die wel en die geen vitamine K toegediend kregen.

De toets, die hiervoor is toegepast, is de toets van WILCOXON. De bij de toetsing gevonden (éénzijdige) overschrijdingskansen zijn in tabel III vermeld, evenals de overschrijdingskansen, die worden verkregen bij het combineren van de toetsen voor de drie groepen.

Tabel III: Toetsingsresultaten, gevonden bij toepassing van de toets van WILCOXON voor de nulhypothese, dat vitamine K geen invloed heeft.

daling tussen eerste dag en	derde dag	zesde dag
groep A	0,003	0,27
groep B	0,001	0,0041
groep C	0,27	0,07
gecombineerd	0,0006	0,007

Uit tabel III blijkt, dat de conclusie getrokken kan worden, dat vitamine K inderdaad de daling van de prothrombinetijd gedurende de eerste dagen na de geboorte versterkt.

Wij moeten hierbij wel opmerken, dat deze conclusie vooral is gebaseerd op de resultaten van de groepen A en B. Het is daarom juister de conclusie te formuleren als volgt: vitamine K heeft in een dosis van 2 mg een gunstige invloed gedurende de eerste dagen na de geboorte op de daling van de prothrombinetijd, indien deze op de eerste dag na de geboorte niet al te hoog was. Voor kinderen met een bij de geboorte sterk verhoogde prothrombinetijd is er geen duidelijke aanwijzing gevonden van een invloed van de genoemde dosis vitamine K.

4. De daling van de prothrombinetijd, rekening houdend met de controlewaarnemingen.

Evenals in rapport S 241 is de daling van de prothrombinetijd ook nog onderzocht, rekening houdend met de controlewaarnemingen, die op elke dag zijn verricht. Dit is weer gedaan, door voor beide groepen kinderen te vergelijken, op welke dag de prothrombinetijd weer normaal was. Wij memoreren, dat een patiënt normaal genoemd wordt, zodra het gemiddelde van de waarnemingen van zijn prothrombinetijd \leq de gemiddelde controlewaarnemingen op die dag, vermeerderd met $1\frac{1}{2}$ is.

Voorts hebben wij ook hier een indeling aangebracht in drie groepen; de reden hiervan werd reeds in paragraaf 2 besproken. De indeling geschiedde op grond van het verschil tussen hun prothrombinetijd op de eerste dag en de controlewaarnemingen:

Groep I : verschil $> 1\frac{1}{2}$, maar ≤ 5

Groep II : verschil > 5 , maar ≤ 10

Groep III: verschil > 10 .

Groep I omvat dus alle kinderen, die bij de geboorte een slechts weinig verhoogde prothrombinetijd hadden, groep II degenen met een verhoogde prothrombinetijd en groep III die met een sterk verhoogde prothrombinetijd.

De waarnemingen zijn nu samengevat in tabel IV.

Tabel IV: Snelheid, waarmee de prothrombinetijd daalt tot het normale niveau.

aantal patiënten, dat normaal niveau van de prothrombinetijd bereikte:		vóór of op de derde dag	na de derde, doch vóór of op de zesde dag	na de zesde dag
groep I	geen vitamine K	2	3	9
	vitamine K	13	0	0
groep II	geen vitamine K	0	0	13
	vitamine K	2	3	0
groep III	geen vitamine K	0	1	5
	vitamine K	1	0	2

De hypothese H_0 , dat vitamine K geen invloed heeft op de snelheid van de daling van de prothrombinetijd kan weer getoetst worden met behulp van de toets van WILCOXON. In verband met het grote aantal gelijke waarnemingen is deze toets exact uitgevoerd. Wij verwijzen over deze kwestie naar VAN EEDEN en WABEKE (1955). De toetsingsresultaten zijn:

Groep I : $k = 5 \times 10^{-7}$

Groep II : $k = 1 \times 10^{-4}$

Groep III: $k = 0,14$.

Terwijl dus voor kinderen met een matig verhoogde prothrombinetijd vitamine K zéér duidelijk van invloed is, mag deze conclusie niet getrokken worden voor kinderen met een sterk verhoogde prothrombinetijd.

Als bezwaar tegen de gebruikte methode zou kunnen worden aangevoerd, dat bij kinderen met een sterk verhoogde prothrombinetijd het normale niveau veelal eerst na de zesde dag bereikt zal worden, en dat de toets zoals wij deze hebben uitgevoerd daarom weinig onderscheidingsvermogen zou bezitten. Wij hebben getracht dit te verbeteren, maar daar er geen waarnemingen na de zesde dag beschikbaar zijn, gaan wij nu niet na wanneer de kinderen "normaal" geworden zijn, maar wanneer de prothrombinetijd zo ver gedaald is, dat wij deze als "weinig verhoogd" zouden aanduiden.

Zoals bij de groepenindeling reeds is gedaan zullen wij een prothrombinetijd van een kind "weinig verhoogd" noemen, indien deze \leq de controlewaarneming op die dag, vermeerderd met 5 eenheden. Voor elke pasgeborene van groep C hebben wij nu nagegaan wanneer de prothrombinetijd zover gedaald is, dat deze nog maar "weinig verhoogd" is. Dit leidt tot de tabel:

	voor of op derde dag	na derde, doch voor of op zesde dag	na zesde dag
geen vitamine K	4	1	1
vitamine K	1	2	0

Toetsing van de nulhypothese geeft een overschrijdingskans $k = 0,84$, zodat er ook hier geen aanwijzingen gevonden zijn, dat vitamine K in de gegeven dosis gunstig werkt bij kinderen, die bij de geboorte een sterk verhoogde prothrombinetijd hebben.

5. Het bilirubinegehalte.

In tabel V zijn de gemiddelde stijgingen vermeld van het bilirubinegehalte, zoals deze zijn berekend uit de waarnemingen. Het aantal waarnemingen, waarop elk gemiddelde is gebaseerd is tussen haakjes opgenomen.

Tabel V¹⁾: Gemiddelde toename van het bilirubinegehalte.

toename tussen:	eerste en derde dag	eerste en zesde dag	derde en zesde dag
geen vitamine K	4,6 (25)	4,7 (23)	-0,2 (25)
vitamine K	5,1 (23)	3,9 (21)	-0,8 (21)

De nulhypothese, inhoudende dat vitamine K geen invloed heeft op het bilirubinegehalte is eenzijdig getoetst met behulp van de toets van WILCOXON. De toetsingsresultaten zijn:

eerste - derde dag $k = 0,29$

eerste - zesde dag $k = 0,78$

derde - zesde dag $k = 0,69$.

Voorts hebben wij de waarnemingen van het bilirubinegehalte op de zesde dag vergeleken voor beide groepen. Het toetsingsresultaat is $k = 0,73$. De gevonden gemiddelden zijn

geen vitamine K: 7,77 (25 waarnemingen)

vitamine K : 6,83 (21 waarnemingen).

De conclusie moet getrokken worden, dat er geen enkele aanwijzing is, dat toediening van vitamine K van invloed is op het bilirubinegehalte.

6. Conclusies.

De conclusies, die getrokken kunnen worden ten aanzien van de invloed van een dosis van 2 mg vitamine K bij de

1) Zie voetnoot op pagina 2.

categorie van kinderen, zoals deze in het onderzoek is betrokken, zijn:

1. vitamine K heeft in de genoemde dosis een duidelijk gunstige invloed op de daling van de prothrombinetijd, indien deze bij de geboorte niet te hoog is.
- 2: geen invloed kon worden geconstateerd van de genoemde dosis op de daling van de prothrombinetijd indien deze bij de geboorte zeer hoog was ("zeer hoog" wil zeggen van de orde van 30 - 60 sec.).
- 3: er is geen reden te concluderen dat vitamine K in de gegeven dosis van invloed is op het bilirubinegehalte.

Literatuur.

Constance VAN EEDEN en Ir Doraline WABEKE: Handleiding voor de toets van WILCOXON: Exacte behandeling als er gelijke waarnemingen zijn. Rapport S 176 (M 65 A) van de Statistische Afdeling van het Mathematisch Centrum.

A₁ De controle-waarnemingen van de prothrombinetijd.

Zoals in S 241 reeds werd opgemerkt, geschiedt het bepalen van de prothrombinetijd o.a. met behulp van een organische vloeistof, die elke dag opnieuw moet worden klaargeemaakt. De eigenschappen van deze vloeistof zijn van dag tot dag niet constant, hetgeen een bron van variatie is, die hinderlijk kan zijn bij het beoordelen van waarnemingen van prothrombinetijden op verschillende dagen. Men tracht een correctie toe te passen, door elke dag bloed af te nemen van een willekeurig gekozen "normaal" persoon en hiervan de prothrombinetijd te bepalen. De waarnemingen van prothrombinetijden van patiënten worden dan vergeleken met deze controlewaarnemingen.

Er spelen dus bij de controlewaarnemingen twee bronnen van variaties een rol, te weten:

- 1) de verschillen in prothrombinetijden tussen normale personen,
- 2) de verschillen in standaard van de vloeistof.

Indien de eerstgenoemde bron van variatie relatief van weinig invloed is ten opzichte van de tweede, dan moeten de controlewaarnemingen inderdaad betrokken worden in een statistische analyse van waarnemingen van prothrombinetijden. Zijn de verschillen, geïntroduceerd door de verschillen tussen normale personen evenwel vaak groter dan die tengevolge van de wisselende standaard van de vloeistof, dan zal de scherpte van een statistisch onderzoek toenemen, indien men geen gebruik maakt van de controlewaarnemingen.

Het is dus wel van belang voor het gehele onderzoek een indruk te hebben van de relatieve grootte van de fluctuaties tengevolge van de twee genoemde oorzaken.

A₂ Groep A.

Bij het onderzoek naar de invloed van vitamine K is wel gebleken, dat kinderen, die een niet al te hoge prothrombinetijd bij de geboorte hadden, op de zesde dag meestal weer "normaal" waren. A fortiori geldt dit voor kinderen, die bij de geboorte geen of slechts een geringe verhoging van de prothrombinetijd hadden. Laatstgenoemde

groep van kinderen is in de rapporten S 241 en S 243 steeds als groep A aangeduid. Wij zullen in het volgende deze kinderen dan ook als "normaal" aanduiden.

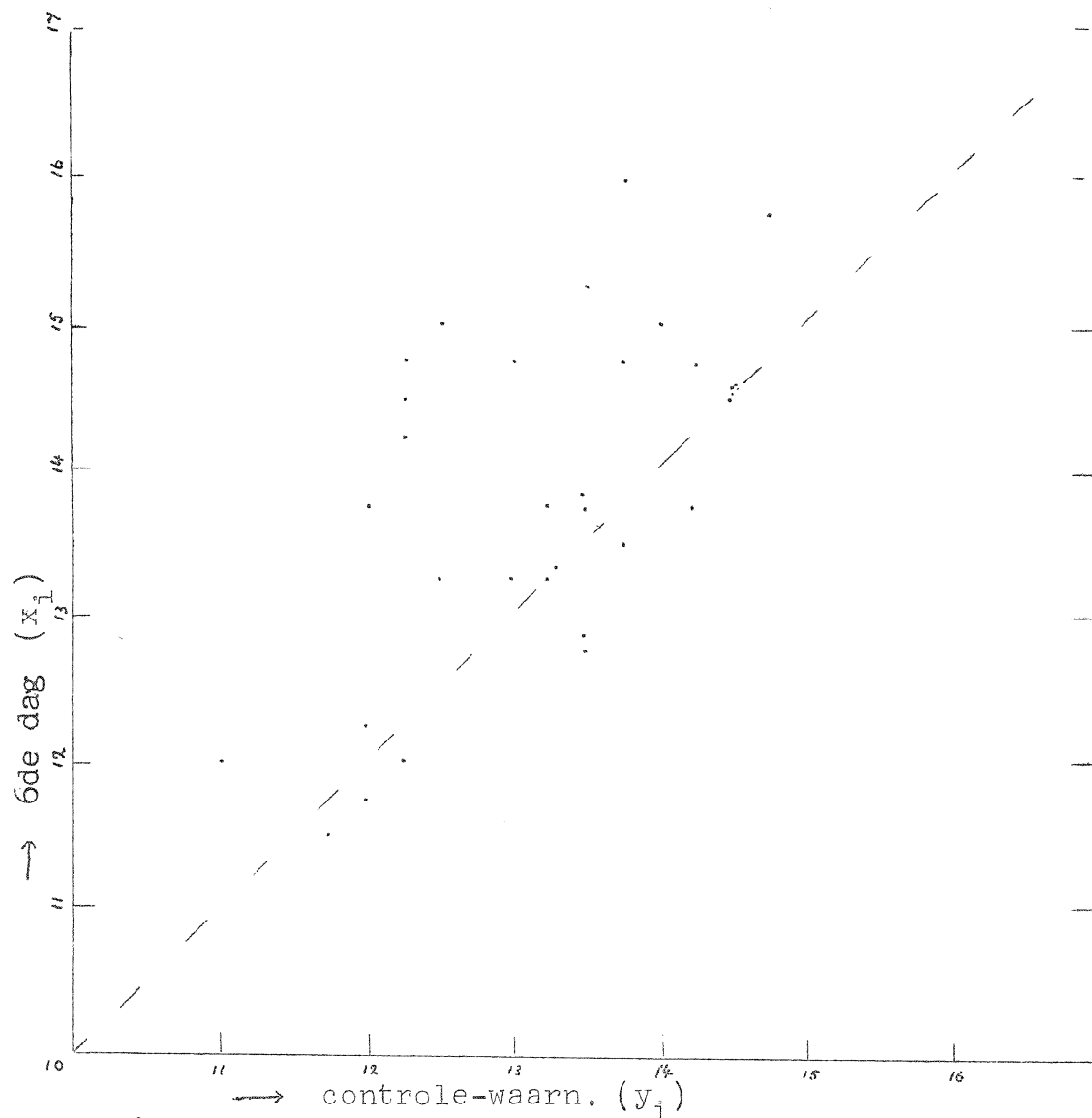
Voor het i -de kind van groep A beschikken wij dus over waarnemingen van

\underline{x}_i = prothrombinetijd op de zesde dag en

\underline{y}_i = controlewaarneming van de prothrombinetijd,

waar $i = 1, \dots, 30$. Patiënt nr. 140 is op grond van een abnormale waarde van de prothrombinetijd op de 3de dag niet meegerekend.

In figuur 1 zijn de waarnemingen van x_i en y_i uitgezet.



Figuur 1: waarnemingen van de prothrombinetijd op de zesde dag van kinderen, behorende tot groep A, uitgezet tegen de controlewaarnemingen.

Het is uit deze figuur wel duidelijk dat er een correlatie bestaat tussen \underline{x} en \underline{y} , dat wil zeggen dat bij hoge (resp. lage) waarnemingen van x de waarnemingen van y relatief hoog (resp. laag) zijn. Daar twee bij elkaar behorende waarden van \underline{x} en \underline{y} steeds op dezelfde dag zijn waargenomen, kan men deze correlatie zien als een aanwijzing, dat de controlewaarnemingen een zinvolle correctie geven voor de variabiliteit van de standaard van de vloeistof.

De mate waarin de controlewaarnemingen bijdragen tot de verhoging van de waarnemingsnauwkeurigheid kan men als volgt schatten.

De variantie van de waarneming van de prothrombinetijd van een normale persoon op een willekeurige dag is gelijk aan $\sigma^2\{\underline{x}\}$. Een schatting hiervan kan berekend worden uit de waarnemingen met behulp van de bekende formule

$$s_1^2 = \frac{1}{n-1} \left\{ \sum x_i - \frac{(\sum x_i)^2}{n} \right\},$$

waarbij $s_1^2 = 1,98$ werd gevonden, dus $s_1 = 1,4$.

De variantie van de waarneming van de prothrombinetijd van een normale persoon, verminderd met de controlewaarneming op die dag, is gelijk aan $\sigma^2\{\underline{x} - \underline{y}\}$. Uit de verschillen $x_i - y_i$ berekenen wij weer een schatting s_2^2 van $\sigma^2\{x - y\}$. Deze is $s_2^2 = 1,18$, dus $s_2 = 1,1$.

Het relatieve verschil tussen s_1 en s_2 in percenten $\frac{1,4 - 1,1}{1,4} \times 100 \sim 20\%$ is een maat voor de vergroting van de waarnemingsnauwkeurigheid door het toepassen van de correctie door middel van de controlewaarnemingen. De winst is niet groot, omdat hoewel uiteraard voor de fluctuatie tengevolge van de wisselende standaard wordt gecorrigeerd, men een nieuwe onzekerheid introduceert door de keuze van de normale persoon, bij wie de controlewaarneming wordt verricht.

Uit figuur 1 blijkt dat de puntenwolk vrij veel afwijkt van de 45° lijn. Past men de symmetrietoets van WILCOXON (zie bijvoorbeeld *Statistica Neerlandica*, 11, 1957, pag. 231-235) toe op de verschillen $x_i - y_i$, dan moet men de hypothese dat $\underline{x}_i - \underline{y}_i$ symmetrisch om 0 verdeeld is,

verwerpen ($k = 0,001$). Er is dus een systematisch verschil tussen de prothrombinetijd op de zesde dag van de kinderen van groep A en die van de normale personen, waarbij de controlewaarnemingen zijn verricht.

Men moet hieruit de conclusie trekken dat er in de bepalingstechniek nog systematische afwijkingen voorkomen. Het zal van veel belang voor de waarnemingsnauwkeurigheid zijn te onderzoeken welke dit zijn en hoe deze geëlimineerd kunnen worden.

A₃ Waarnemingen op eenzelfde dag.

Op ons verzoek is een klein onderzoek uitgevoerd ten-einde verdere gegevens te verkrijgen over de bronnen van spreidingen, die van belang zijn.

Hiertoe is op één dag bij tien normale personen bloed afgenomen en zijn op ieder monster bloed drie waarnemingen van de prothrombinetijd verricht. De waarnemingen zijn in Tabel VI weergegeven.

Tabel VI: Triplowaarnemingen van de prothrombinetijd van tien normale personen, op één dag verricht.

Persoon					
1	$13\frac{1}{2}$	-	$13\frac{1}{2}$	-	$13\frac{1}{2}$
2	$13\frac{1}{2}$	-	14	-	$13\frac{1}{2}$
3	$12\frac{1}{2}$	-	$13\frac{1}{2}$	-	$13\frac{1}{2}$
4	13	-	$13\frac{1}{2}$	-	$13\frac{1}{2}$
5	$14\frac{1}{2}$	-	$13\frac{1}{2}$	-	$13\frac{1}{2}$
6	$11\frac{1}{2}$	-	12	-	12
7	12	-	12	-	$12\frac{1}{2}$
8	$12\frac{1}{2}$	-	$13\frac{1}{2}$	-	$12\frac{1}{2}$
9	$13\frac{1}{2}$	-	$13\frac{1}{2}$	-	12
10	12	-	12	-	$12\frac{1}{2}$

Graag willen wij de aandacht vestigen op het feit, dat de waarnemingen de indruk wekken dat er een daling in het niveau optreedt, dus dat er een verloop optreedt, in die zin, dat de waarnemingen van de eerste vijf personen systematisch hoger zijn dan van de personen nummer 6 tot en met 10.

Door middel van de variantie-analyse, waarop wij hier niet in zullen gaan, kunnen wij uit de waarnemingen twee schattingen berekenen resp. van

σ_n^2 = de variantie van de werkelijke prothrombinetijden bij normale personen;

σ_w^2 = de variantie van de afwijkingen van de waarnemingen (op één dag verricht) van de prothrombinetijd van een persoon en de werkelijke prothrombinetijd van die persoon.

De gevonden schattingen zijn resp.:

$$s_n^2 = 0,61$$

$$s_w^2 = 0,23.$$

In de vorige paragraaf is als schatting van de variantie van het verschil tussen een waarneming van de prothrombine-tijd en de bijbehorende controlewaarnemingen, gevonden 1,18. Deze schatting komt redelijk goed overeen met de hier ver-kregen resultaten. Uit de wijze waarop de waarnemingen wor-den gedaan volgt dat deze variantie gelijk is aan

$$2 \left(\sigma_n^2 + \frac{\sigma_w^2}{2} \right),$$

en wij vinden dus hier als schatting = 1,45.

A₄ Conclusie.

Als conclusies kunnen wij hier formuleren, dat:

- 1) de controlewaarnemingen de waarnemingsnauwkeurigheid enigszins verhogen;
- 2) de variantie van het verschil van een waarneming van een prothrombinetijd en de controlewaarneming van de orde van grootte van 1,3 is;
- 3) hieruit volgt ook dat indien bij een patiënt de waarge-nomen waarde van de prothrombinetijd twee eenheden of minder verschilt van de controlewaarneming, men niet kan spreken van een verhoogde prothrombinetijd;
- 4) de gegevens ons niet in staat stelden een onderzoek in te stellen naar het verloop in de tijd van de standaard van de organische vloeistof;

- 5) het overweging verdient de mogelijkheden van bronnen van systematische afwijkingen in de waarnemingen te onderzoeken, waarbij speciaal de aandacht geschonken zou moeten worden aan de controlewaarnemingen.