

Afslutningsrapport

Relationer mellem allergiforebyggende effekt og kemisk sammensætning for nogle hypoallergene modernmælkserstatninger

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 1999-23

Marts 1999



mejeriforeningen

danish dairy board

Afslutningsrapport til Mejeribrugets ForskningsFond for projektet

Relationer mellem allergiforebyggende effekt og kemisk sammensætning for nogle hypoallergene modernmælkserstatninger

FØTEK I-samarbejdsprojekt mellem Mejeribrugets ForskningsFond og Undervisningsministeriet

Rapporten består af to overordnede dele, der repræsenterer de to delprojekter, der er blevet udført i forbindelse med det samlede projekts gennemførelse:

1. Fysisk.kemisk karakterisering og udvikling af nye metoder til analyse af hypoallergene mælkeprodukter (Vibeke Barkholt, DTU)
2. En sammenlignende undersøgelse af den allergiforebyggende effekt af en partiel hydrolyseret hypoallergen modernmælkserstatning med to ekstensiv hydrolyserede hypoallergene modernmælkserstatninger. En prospektiv, randomiseret undersøgelse (Arne Høst, Odense Universitetshospital)

Februar 1999

Afslutningsrapport til Mejeribrugets ForskningsFond for delprojektet

**FYSISK-KEMISK KARAKTERISERING OG UDVIKLING AF NYE
METODER TIL ANALYSE AF HYPOALLERGENE MÆLKEPRODUKTER**

Delprojekt af

**Relationer mellem allergiforebyggende effekt og kemisk
sammensætning for nogle hypoallergene modernælkserstatninger**

FØTEK I-samarbejdsprojekt mellem Mejeribrugets ForskningsFond og
Undervisningsministeriet

Annette Rosendal (ph.d.-studerende, DTU-stipendiat)

Lektor, Ph.D. Vibeke Barkholt (projektleder)

Institut for Biokemi & Ernæring
Bygning 224
Danmarks Tekniske Universitet
2800 Lyngby
Tlf.: 45252751
E-mail: vb@mimer.be.dtu.dk

Øvrige projektdeltagere:
Lektor, Ph.D. Hanne Frøkiær

Projektperiode:
15.02.1994 – 31.12.1997

September 1998

RESUMÉ

Formålet med projektet var at udvikle metoder til karakterisering af hypoallergene mælkeprodukter med henblik på at identificere parametre, der kan tænkes at være kritiske for udvikling af allergi (komælsallergi). 6 delvist og 6 meget hydrolyserede modernælkserstatninger, 5 hydrolysater og et produkt under udvikling blev inkluderet i studiet. Tre af modernælkserstatningerne blev sideløbende med projektet undersøgt klinisk for en eventuel allergiforebyggende effekt (Nan HA, Profylac og Nutramigen).

Resultater: Mælkeprodukterne er blevet karakteriseret ved fysisk-kemiske, immunkemiske og immunologiske metoder.

Blandt *fysisk-kemiske metoder* er SDS-PAGE, nativ PAGE, gelfiltrering og kapillarelektroforese anvendt. Produkterne er desuden blevet analyseret for lipid- og aminosyresammensætning. SDS-PAGE har vist sig som den mest anvendelige metode til påvisning af højmolekylært proteinmateriale, som man mener har mulighed for at kunne fremkalde et allergisk respons. Således er komponenter med en molekylvægt > 5 kDa blevet påvist i selv meget hydrolyserede produkter ved påsætning af 200 μg protein (10 mg/ml) og ved påsætning af bundfald fra modernælkserstatninger efter centrifugering. For nogle af produkterne er det endvidere blevet konstateret, at proteinmaterialet farver dårligt efter sølvfarvning, hvorfor flere farvningsmetoder bør anvendes til visualisering af proteinmateriale efter SDS-PAGE (Coomassie- og sølvfarvning). Gelfiltrering under ikke-dissocierende betingelser er ligeledes blevet fundet egnet til påvisning af højmolekylært materiale (evt. aggregeret) i produkterne. SDS-PAGE efter ovenstående retningslinier er dog en væsentligt hurtigere og mere følsom metode, som er anvendelig blandt andet til produktkontrol.

Immunkemiske metoder har indbefattet ELISA, immunblotting og dot-immunbinding. Følsomheden ved disse metoder er stærkt afhængig af, hvilke antistoffer der bruges til detektion. Valleproteinet β -lactoglobulin (β -lg) er blevet påvist i alle produkter ved hjælp af et sandwich-ELISA med en detektionsgrænse på 0.3 $\mu\text{g/l}$. Da flere af produkterne er baseret på andre proteiner end valleproteiner, tyder indholdet af β -lg på, at der forekommer kontaminering under fremstillingen af mælkeprodukterne.

De tre modernælkserstatninger, der indgår i den kliniske undersøgelse, er blevet karakteriseret ved *immunologiske metoder* (oral immunisering og traditionel intraperitoneal immunisering). Immunisering af mus over lang tid har vist sig som en meget følsom metode til direkte påvisning af immunogent materiale. Efter 7 måneders immunisering udviste mus immuniseret med Nan HA således et næsten lige så højt antistofsvare som en almindelig modernælkserstatning, og anti- β -lg antistoffer var dannet i mus immuniseret med Profylac på trods af, at det ved ELISA kun var muligt at detektere en ringe mængde β -lg i produktet (14 ng/ml). Nutramigen gav ikke anledning til påviselige mængder af antistoffer rettet mod hverken β -lg, α -lactalbumin, α - eller β -kasein.

Konklusion: To laboratoriemetoder egner sig til vurdering af indholdet af potentielt allergent materiale i hydrolyserede modernælkserstatninger: 1) SDS-PAGE med påsætning af størst mulig mængde produkt (svarende til en drikkeklar opl.) og 2) langtidsimmunisering af mus. Der er god overensstemmelse mellem de to metoder, idet Nan HA efter SDS-PAGE viser mest detekterbart materiale, Profylac langt mindre og Nutramigen intet, svarende til de antistofsvare, der blev fundet i immuniseringsforsøget. Metoderne supplerer hinanden, idet SDS-PAGE giver en idé om, *hvilke* proteiner der er til stede i produkterne i mængder over 1-10 ng (ca. 0,05-0,50 $\mu\text{g/ml}$), mens eksistensen af immunogent materiale i mængder herunder kan afsløres ved immuniseringsforsøg.

SUMMARY

Physicochemical characterisation and development of new methods for analysis of hypoallergenic milk products

Objective: The aim of the study is to develop methods for the characterisation of hypoallergenic formulas in order to identify parameters critical for the development of cow's milk allergy. For this purpose, 6 extensively and 6 partially hydrolysed formulas, 5 hydrolysates and one product in the developing phase have been investigated. Three of the formulas have been included in a clinical study as well (Nan HA, Profylac and Nutramigen).

Results: Products were characterised by physicochemical, immunochemical and immunological methods.

Physicochemical methods included SDS-PAGE, native PAGE, gel filtration, capillary electrophoresis, amino acid analysis and lipid analysis. SDS-PAGE was found to be a very useful method for the detection of high-molecular weight components, which may be capable of eliciting allergic responses. Thus, protein material with a molecular weight > 5 kD was demonstrated in even extensively hydrolysed formulas by application of 200 µg protein (10 mg/ml) and by analysis of precipitates from the formulas after centrifugation. Following SDS-PAGE, separated protein material should be visualised by silver- as well as Coomassie-staining as some of the products included in the study did not stain well with silver. Gel filtration run at non-dissociating conditions was also shown to be a useful method for the detection of high-molecular weight material, possibly aggregated. However, SDS-PAGE, as described, is a faster and more sensitive method, appropriate for product control.

Immunochemical methods included ELISA, immunoblotting and dot-immunobinding. Whether proteins will be detected or not by these methods depends on the specificity of the antibodies taken into use. The whey protein, β -lactoglobulin (β -lg), was detected in all products by the application of a sandwich-ELISA (detection limit: 0.3 ng/ml). As some of the milk formulas are based on proteins other than whey proteins, the presence of β -lg in these products indicates that contamination takes place during processing.

Three of the hypoallergenic formulas were investigated by *immunological methods* (oral immunisation and intraperitoneal immunisation). Long-term immunisation of mice was found to be a very sensitive method, suitable for the detection of immunogenic material. Thus, seven months of immunisation of mice with Nan HA revealed antibody responses corresponding to that of a conventional formula and anti- β -lg antibodies were easily demonstrated in mice immunised with Profylac although β -lg is only present in this formula in minute amounts (14 ng/ml as determined by ELISA). Mice immunised with Nutramigen did not develop antibodies against either β -lg, α -lactalbumin, α - or β -casein.

Conclusion: Two methods for the detection of potentially allergenic material have been developed: 1) SDS-PAGE of products in concentrations corresponding to "ready-to-use formula" or higher, 2) long-term immunisation of mice. There is a good correlation between the results from the two methods as Nan HA subjected to SDS-PAGE shows intensive staining, Profylac less staining and Nutramigen no staining in keeping with the degree of immune response raised in mice. The two methods complement each other as SDS-PAGE aid in the identification of proteins in concentrations above 1-10 ng (0.05-0.50 µg/ml), whereas the existence of immunogenic material not detectable by SDS-PAGE can be revealed by immunisation.

DEFINITIONER OG FORKORTELSER

Allergen	Komponent, der kan fremkalde allergi
Allergenicitet	Et mål for komponenters evne til at fremkalde allergi (kræver at komponenten er både antigen og immunogen)
Allergi	Allergi opstår på grund af fremmede proteiners indtrængen i organismen. I forbindelse med levnedsmiddelallergi vil det sige indtrængen af levnedsmiddelproteiner over tarmvæggen. En allergisk reaktion kræver, at det indtrængende stof er stort nok, og at individet møder det mindst to gange. Et af de første levnedsmiddelproteiner, der indtages, er proteiner fra komælk i modermælks-erstatninger.
Antigen	Komponent, der kan binde antistoffer
Antigenicitet	Et mål for komponenters evne til at binde antistoffer, der i forvejen er dannet; angiver potentialet for at udløse en reaktion i en person, der allerede har udviklet allergi
eHF	Meget hydrolyseret modermælks-erstatning (extensively hydrolyzed formula)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Hypoallergen	Mindre allergifremkaldende
Immunisering	Indsprøjtning af komponenter i f.eks. mus med henblik på at få dannet antistoffer
Immunogen	Komponent, der giver anledning til dannelsen af antistoffer ved immunisering
Immunogenicitet	Et mål for komponenters kapacitet til at inducere et immunrespons (antistofsvær) i et individ, der aldrig har været udsat for komponenten før (kræver at komponenten er antigen). Generelt vil højmolekylære fremmedkomponenter, f.eks. intakte proteiner, føre til et immunrespons.
α -la	α -Lactalbumin
β -lg	β -Lactoglobulin
pHF	Delvist hydrolyseret modermælks-erstatning (partially hydrolyzed formula)
Rest-antigenicitet	Et mål for den antigenicitet, der måtte være tilbage efter en given behandling
SDS-PAGE	Sodium dodecyl polyacrylamide gel electrophoresis
STI	Kunitz' sojabønnetrypsin-inhibitor

FORMÅL

Formålet med hovedprojektet er:

at få konstateret, om der er en sammenhæng mellem allergiforebyggende effekt og den kemiske sammensætning for 3 hypoallergene modermælkerstatninger:

1) Nutramigen, 2) Profylac og 3) Nan HA.

Nutramigen og Profylac er baseret på protein, der er meget hydrolyseret (eHF), mens Nan HA er baseret på delvist hydrolyseret protein (pHF). En eventuel allergiforebyggende effekt af de 3 produkter er blevet undersøgt klinisk under ledelse af Arne Høst, Odense Universitetshospital, mens modermælkerstatningerne er blevet karakteriseret fysisk-kemisk, immunkemisk og immunologisk i dette projekt med henblik på at identificere parametre, der kan tænkes at være kritiske for udvikling af allergi.

Karakteriseringen har foruden de tre ovenfor nævnte modermælkerstatninger omfattet (tabel 1):

- en ordinær modermælkerstatning
- 9 modermælkerstatninger baseret på hydrolyseret protein
- 5 proteinhydrolysater
- et produkt under udvikling (Adapta HA)

Tabel 1: Produkter inkluderet i projektet.

Produkt	Forkortelse	Proteinbasis	Type*	Firma [†]
Nan 1	N1	Kaseiner og valleproteiner	Ordinær	A
Nan HA	NHA	Valleproteiner	pHF	A
Beba HA	BHA	Valleproteiner	pHF	A
Alfaré	ALF	Valleproteiner	eHF	A
Aptamil HA	AHA	Sojaproteiner og bovint kollagen	pHF	B
Aptamil Hypoantigen	AHY	Kaseiner og valleproteiner	pHF	B
Pregomin	PRN	Sojaproteiner og bovint kollagen	eHF	B
Nutrilon Pepti	NP	Valleproteiner	pHF	C
Nutrilon Pepti Plus	NPP	Valleproteiner	pHF	C
Pepti Junior	PEJ	Valleproteiner	eHF	C
Nutramigen	NUT	Kaseiner	eHF	D
Pregestimil	PRL	Kaseiner	eHF	D
Profylac	PRO	Valleproteiner	eHF	E
Lacprodan CH-500	CH	Kaseiner	hydrolysat	F
Lacprodan WPH-500	WPH	Valleproteiner	hydrolysat	F
Peptigen PH-200	PH	Ærteproteiner	hydrolysat	F
Peptigen SH-100	SH	Sojaproteiner	hydrolysat	F
Adapta HA	ADA	Kaseiner og valleproteiner	eHF	F
Profylac	PROH	Valleproteiner	hydrolysat	E

**Ordinær*: Modermælkerstatning baseret på intakte komælksproteiner; *eHF*: extensively hydrolyzed formula; *pHF*: partially hydrolyzed formula; *hydrolysat*: proteiner, der er blevet hydrolyseret svarende til eHF.

[†] A:Nestlé; B:Milupa; C:Nutricia; D:Mead Johnson; E:ALK; F:Prøver udleveret af MD Foods.

I alt 12 hypoallergene modermælkerstatninger er således inkluderet i studiet, hvilket har gjort det muligt at få dannet et holdbart grundlag for sammenligninger af produkterne imellem. Da betydningen af processeringen af modermælkerstatninger på den allergifremkaldende effekt ønskedes belyst, er rene hydrolysater ligeledes inkluderet, således at en sammenligning med færdige produkter kan foretages.

BAGGRUND

En undersøgelse foretaget i Danmark har vist, at ca. 2 % udvikler komælksallergi indenfor det første leveår. Langt de fleste børn er vokset fra allergien inden 3-årsalderen, men udvikler ofte andre former for allergier, f.eks. allergi overfor pollen. Derfor er det af stor interesse at forebygge komælksallergi. Til dette formål forhandles hypoallergene modernælkserstatninger indeholdende komælksproteiner, der ved varmebehandling og enzymatisk hydrolyse er blevet nedbrudt til peptider med en mindsket allergifremkaldende effekt. Alternativt kunne man give børn mælkeerstatninger baseret på proteiner fra en anden kilde, f.eks. soja, men det har vist sig, at op til halvdelen af komælksallergikere reagerer på soja efter indtagelse.

Den første modernælkserstatning, Nutramigen, der er baseret på ekstensivt hydrolyseret kasein, kom på markedet allerede i 1942 og er tilegnet børn med konstateret komælksallergi. Produktet har kun i få tilfælde givet anledning til allergiske reaktioner. Imidlertid har produktet en meget bitter smag og kan give problemer med diarré p.g.a. et højt indhold af korte peptider og frie aminosyrer, bl.a. i form af tryptophan, tyrosin og cystein, der ekstra tilsættes produktet. På grund af disse ulemper og for bedre at udnytte den store restmængde af valle fra osteproduktion er der indenfor de sidste 10 år blevet fremstillet en ny generation af hydrolyserede modernælkserstatninger, primært baseret på valleproteiner. I disse proteiner er der endvidere en ernæringsmæssig bedre sammensætning af aminosyrer end i kasein, men valleproteiner kan være mere vanskelige at hydrolysere. Derfor er produkter baseret på kun delvist nedbrudt valleprotein (pHF) blevet udviklet. Disse produkter kan ikke bruges til behandling af komælksallergi, men påstås at kunne forebygge udviklingen af allergi hos børn i risikogruppen (f.eks. børn hvis forældre har allergi). Desuden er sådanne produkter billigere at fremstille, og de smager bedre end eHF på grund af et lavere indhold af frie aminosyrer / små peptider. pHF baseret på sojaproteiner, bovint kollagen eller en blanding af valleproteiner og kaseiner findes også på markedet. Endelig er et dansk produkt baseret på ekstensivt hydrolyserede valleproteiner blevet introduceret i 1990 (Profylac, eHF). Dette produkt er blevet ultrafiltreret med henblik på at få fjernet proteiner eller store peptidrester, der ikke er blevet tilstrækkeligt hydrolyseret.

I forbindelse med introduktionen af pHF blev der hos børn med komælksallergi observeret flere tilfælde af allergiske reaktioner efter indtagelse af sådanne produkter. Dette har skabt mistillid til, om produkterne kan anvendes til forebyggelse af allergi. Imidlertid er der også rapporteret om tilfælde, hvor spædbørn har reageret på eHF. Da kliniske undersøgelser af den allergiforebyggende effekt af hypoallergene modernælkserstatninger er meget omfattende, tidskrævende, dyre og kræver mange forudgående etiske overvejelser, er der behov for mere følsomme metoder end de eksisterende til karakterisering af hypoallergene modernælkserstatninger og identifikation af, hvilke parametre der kan have betydning for, om allergiske reaktioner opstår. Sådanne metoder vil kunne anvendes i udviklingsfasen af hypoallergene modernælkserstatninger og endvidere til produktkontrol. En endelig godkendelse af nye produkter og test af individets tolerance overfor specifikke produkter skal dog altid testes klinisk.

METODER

I projektet er der blevet fokuseret på detektion af materiale med en molekylvægt > 5 kDa, der ville kunne forklare, hvorfor nogle spædbørn reagerer på hypoallergene modermælksstatninger. Der er blevet lagt vægt på detektion af:

- Proteiner, som ikke er blevet spaltet under hydrolysen
- Store peptidfragmenter
- Aggregeret materiale dannet under forarbejdning af produkterne (processering)

Alle produkter er blevet karakteriseret ved fysisk-kemiske, immunkemiske og immunologiske metoder.

- ◆ Fysisk-kemiske metoder giver oplysninger om produkternes molekylvægtsfordeling, hydrolysegrad og sammensætning.
- ◆ Immunkemiske metoder omfatter bestemmelse af rest-antigeniciteten.
- ◆ Immunologiske metoder giver oplysninger om immunogeniciteten.

Fysisk-kemiske metoder kan, ligesom immunkemiske metoder, i et vist omfang afsløre, om antigene komponenter er til stede i produkterne, da antigenicitet i høj grad afhænger af størrelsen af proteinmaterialet. Antigenicitet er en forudsætning for immunogenicitet, som igen er en forudsætning for allergenicitet. Ingen af metoderne giver dog direkte oplysninger om produkternes *allergenicitet*. Dette kan kun testes ved kliniske undersøgelser.

I projektet er flg. metoder blevet anvendt:

Fysisk-kemiske metoder:

a) *Aminosyreanalyse*

Proteinindholdet i produkter, hydrolysater og diverse fraktioner er blevet bestemt .

b) *Lipidanalyse*

Indholdet af phospholipider og triglycerider er blevet kvantificeret, da lipidsammensætning må antages at have betydning for eventuelle aggregeringer.

c) *SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)*

Proteinmateriale i produkter og hydrolysater er adskilt efter molekylvægt i et gelnetværk under dissocierende betingelser og visualiseret ved Coomassie- eller sølvfarvning.

Tilstedeværelsen af aggregater kan ikke undersøges ved denne metode.

d) *Nativ PAGE*

Proteinmateriale er adskilt efter molekylvægt og ladningsfordeling i et gelnetværk under ikke-dissocierende betingelser og visualiseret ved farvning.

e) *Gelfiltrering*

Proteinmateriale i produkter og hydrolysater er adskilt efter molekylvægt under ikke-dissocierende betingelser. Proteiner og peptider såvel som aggregater kan påvises ved metoden.

f) *Kapillarelektroforese*

Elektroforese af produkter er foretaget i kapillarer, der gør metoden hurtig og ikke særlig ressourcekrævende. Der er blevet lagt vægt på udvikling af en metode til batch-kontrol.

Immunkemiske metoder:

g) *ELISA*

Antigene komponenter i produkterne er påvist ved hjælp af antistoffer, der i forvejen er blevet fremstillet i dyr ved immunisering. ELISA giver således et mål for rest-antigeniciteten.

h) *Dot-immunbinding*

Mål for restantigenicitet. Produkter og hydrolysater er direkte påsat blots uden forudgående adskillelse og antigen materiale påvist ved hjælp af antistoffer.

i) *Immunblotting*

Mål for restantigenicitet: Proteiner/peptider i produkter og hydrolysater er blevet adskilt ved gelelektroforese, overført til blots og påvist ved hjælp af antistoffer.

Immunologiske metoder:

j) *Orale forsøg*

Mus er blevet fodret med produkter for at få konstateret, om det via mavetarmkanalen er muligt enten at sensibilisere musene eller at inducere tolerance. Begge dele kan tænkes også at forekomme hos spædbørn, der indtager produkterne. Metoden giver et indirekte mål for immunogeniciteten af produkterne.

k) *Immuniseringsforsøg*

Mål for immunogenicitet. Mus og kaniner er blevet immuniseret intraperitonealt med proteiner eller produkter for direkte at få konstateret, om produkterne indeholder immunogene komponenter. Antistofsvar er blevet evalueret ved ELISA.

l) *T-celleproliferationsforsøg*

Mål for antigenicitet/immunogenicitet. T-celler fra milten i mus er efter immuniseringsforsøget blevet stimuleret *in vitro* med forskellige komælkspoteiner og modermælkserstatninger.

RESULTATER

I 1994 blev modermælkserstatninger indkøbt fra apoteker og supermarkeder, eller produkter blev doneret fra producenter. Batchnr. blev nedskrevet for alle produkter og er løbende blevet noteret ved køb af nye batches.

Fysisk-kemiske metoder

A) *Aminosyreanalyse*

Proteinindholdet er blevet bestemt i alle produkter og svarer til proteinmængden iflg. deklARATIONERNE \pm 13%. I forbindelse med flere af de anvendte metoder (f.eks. gelfiltrering) har en filtrering eller centrifugering af prøven været påkrævet. Da det ikke på forhånd kan udelukkes, at produkterne indeholder højmolekylært materiale, der sedimenterer ved centrifugering, er både bundfald og supernatant blevet analyseret for aminosyresammensætning. Aminosyreanalyse viste, at der ingen påviselig forskel er på de to fraktioner, på nær et større indhold af aminosyrerne Trp, Cys og Tyr i bundfaldet af Nutramigen og Pregestimil, der under produktionen tilsættes frie aminosyrer.

B) *Lipidanalyser*

I overensstemmelse med deklARATIONER viser lipidanalyser, at produkterne indeholder vegetabiliske olier. Fedtsyreprofilerne er meget forskellige produkterne imellem, men det har ikke været muligt at relatere bestemte profiler til egenskaber, som kan forventes at være af betydning for hypoallergenicitet af modermælkserstatninger.

C+D) *Gelelektroforese (SDS-PAGE og nativ PAGE)*

- Alle produkter er blevet analyseret ved SDS-PAGE. Da selv meget små mængder af intakte proteiner kan udløse et allergisk respons, er den størst mulige mængde produkt blevet påsat (200 μ g protein/peptid svarende til 10 mg protein/ml). Det har været muligt at detektere peptider med en molekylvægt ned til ca. 2500. Detektionsgrænsen er for β -lactoglobulin bestemt til ca. 100 og 10 ng ved hhv. Coomassie- og sølvfarvning (svarer ved sølvfarvning til ca. 0.5 μ g protein/ml drikkeklar opløsning). Følsomheden ved farvemethoderne afhænger dog meget af det enkelte protein. Et eksempel på en Coomassie-farvet gel af færdige produkter er vist i fig. 1, hvoraf ses, at farveintensiteten afhænger ikke blot af hydrolysegraden men også af producenten (sammenlign f.eks. AHA, AHY og PRN fra Milupa). Det er bemærkelsesværdigt, at der selv blandt eHF ses proteinmateriale med en tilsyneladende molekylvægt op til 12 kDa. Ved scanning af 14 geler er den relative farveintensitet endvidere blevet bestemt og på grundlag af 95%-konfidensintervaller har en opdeling i fire grupper været mulig, jfr. tabel 2. Tabellen viser samme billede som gelen i fig. 1 med den undtagelse, at Profylac farver relativt meget i forhold til produkter fra Milupa (skyldes, at farvning over 60 kDa ikke konsekvent har forekommet for disse produkter).
- Sølvfarvning er generelt mere følsom end Coomassiefarvning og afslører tilstedeværelsen af proteinmateriale i alle produkter ved påsætning af 200 μ g protein. Dog bør begge farvnings metoder anvendes, da nogle produkter farver mindre ved sølvfarvning end ved Coomassiefarvning (f.eks. Profylac).

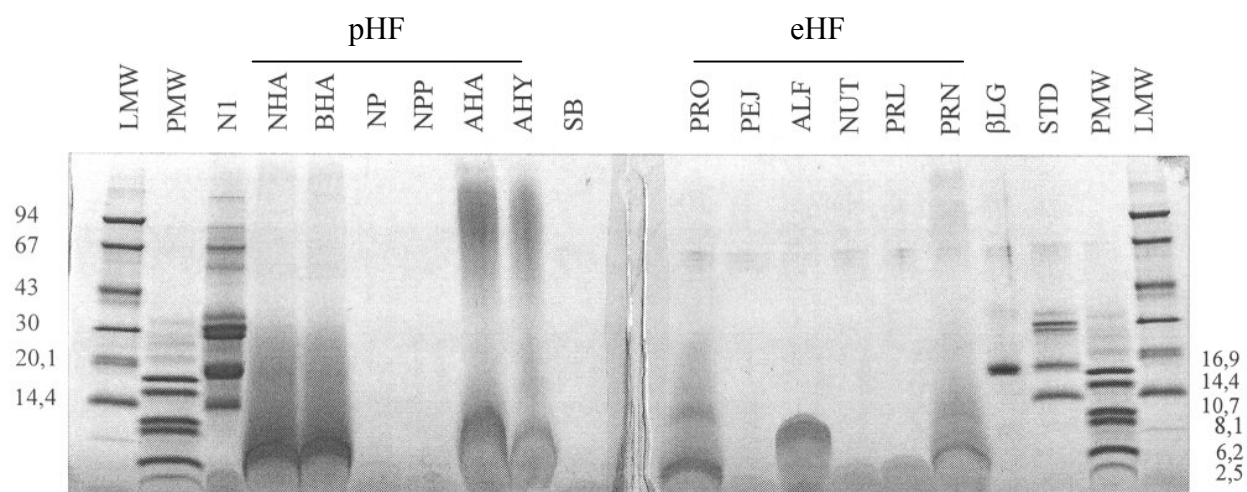


Fig.1: SDS-PAGE af hydrolyserede modernmælkeserstatninger efter tilsætning af reduktionsmidlet DTT (dithiothreitol). LMW og PMW: Molekylvægtsstandarder (molekylvægten i kDa er angivet på venstre og højre side af figuren for hhv. LMW og PMW) SB: Prøvebuffer; STD: α -lactalbumin, β -lactoglobulin, α - og β -kasein. For Nan 1 (N1) er kun 20 μ g protein påsat.

Tabel 2: Opdeling af produkter efter farveintensitet af Coomassie-farvede geler efter SDS-PAGE. Farveintensiteten er målt ved scanning af 14 geler.

Høj	Middel	Lav	Ingen
Nan HA	Profylac	Aptamil HA	Nutrilon Pepti
Beba HA		Aptamil Hypoantigen	Nutrilon Pepti Plus
		Pregomin	Pepti Junior
		Alfaré	Nutramigen
			Pregestimil

- Det er muligt ved en simpel centrifugering af drikkeklare produkter at opnå en berigelse af protein, hvorved komponenter, der ellers let undslipper detektion, tydeligt kan påvises ved SDS-PAGE. F.eks. ses ved Coomassie-farvning to skarpe bånd med en molekylvægt på ca. 20 kDa for Nutramigen efter SDS-PAGE af bundfald (ikke vist). En identifikation af disse bånd er foretaget i projektet "Fortsat karakterisering af hypoallergene mælkeprodukter".
- Nativ PAGE giver ikke nye oplysninger om produkterne, hvorfor vi efter indledende forsøg valgte SDS-PAGE til separation af proteinmateriale i alle produkter.

E) Gelfiltrering

Alle produkter er blevet gelfiltreret efter centrifugering og filtrering gennem et 0.22 µm filter og proteiner/peptider adskilt i molekylvægtsoområdet 3-80 kDa (Sephadex G-75 kolonne).

Tabel 3: Gelfiltrering af produkter på en Sephadex G-75 kolonne.

Produkt	Gelfiltrering	
	Størst mulig M_r , der kan detekteres	% Protein i fronttop*
Nan 1	> 30000	ND
Nan HA	> 30000	3,72
Beba HA	> 30000	ND
Alfaré	14000	ND
Aptamil Hypoantigen	14000	ND
Aptamil HA	> 30000	ND
Pregomin	> 30000	ND
Nutrilon Pepti	18000	ND
Nutrilon Pepti Plus	12000	ND
Pepti-Junior	13000	ND
Nutramigen	7000	0,07
Pregestimil	9000	ND
Profylac	12000	0,18

* Fronttoppen inkluderer materiale med $M_r > 30$ kDa. Proteinindholdet er bestemt ved aminosyreanalyse, ND: not determined.

Den største molekylvægt, der kan påvises ved detektion af elueret materiale ved 280 nm (tabel 3), indikerer, at der i produkterne muligvis eksisterer aggregeret materiale, idet molekylvægten bestemt ved SDS-PAGE for nogle produkters vedkommende er mindre. For Profylac er dette nærmere undersøgt i projektet ”Fortsat karakterisering af hypoallergene mælkeprodukter”. Endvidere ses for alle produkter en top med en molekylvægt over 30 kDa i kromatogrammer fra gelfiltrering (ikke vist). Denne top består primært af non-protein materiale, men indeholder selv for eHF en ringe mængde protein, påvist ved aminosyreanalyse, jfr. tabel 3. En nærmere analyse af molekylvægtsfordelingen af evt. proteinmateriale i området fra 30 til >80 kDa ville kræve en yderligere centrifugering og filtrering af produkterne. Dette ville dog samtidig betyde risiko for at få fjernet høj molekylært proteinmateriale, som netop ønskes påvist.

F) Kapillarelektroforese

Produkterne Nan 1, Nan HA, Profylac og Nutramigen er blevet undersøgt ved kapillarelektroforese (HPCE). Separation er blevet optimeret ved afprøvning af 20 buffersystemer. De to buffersystemer, der giver bedst ”fingerprint” af mælkepeptider, er fosfat med taurin/cholat og borat med Na_2SO_4 . Analyse af tre forskellige batchnr. af Profylac indikerer, at kapillarelektroforese er velegnet til batchkarakterisering. En nærmere fortolkning af resultater ved statistisk behandling kræver dog adgang til kromatogrammer for væsentligt mere end 3 forskellige batches, bl.a. også til batches, der er blevet kasseret.

Immunkemiske metoder

G) ELISA

I projektet er det blevet valgt at analysere for restmængden af β -lg (relevant for produkter baseret på komælksproteiner) og Kunitz sojabønnetrypsininhibitor (STI – relevant for produkter baseret på sojaproteiner), jfr. tabel 4. β -Lactoglobulin kan i et sandwich-ELISA påvises i *alle* produkter, dog i mindst mængde i eHF. Til sammenligning er det ved samme sandwich-ELISA blevet fundet, at β -lg-indholdet i brystmælk fra 11 mødre er på $< 0.3 - 19.8 \mu\text{g/l}$ med en medianværdi på $1.6 \mu\text{g/l}$. β -Lactoglobulin i f.eks. Nutramigen findes sandsynligvis som en forurening i kaseinerne, der under oprensningen fra mælk er vanskelig at få helt fri for valleproteiner. En forklaring på indholdet i de sojabaserede produkter må findes andetsteds - måske forekommer kontaminering fra produktionsudstyr eller fra tilsatte ingredienser.

H+I) Dot-immunbinding og immunblotting

Dot-immunbinding af 13 mælkeprodukter fremgår af tabel 4. Produkter som har vist farvning ved SDS-PAGE giver alle, på nær Profylac og Alfaré, positivt svar ved dot-immunbinding (Nan 1, Nan HA, Beba HA, Aptamil hypoantigen, Aptamil HA og Pregomin). De positive svar for produkter fra Nutricia (Nutralon Pepti Plus, Nutralon Pepti og Pepti Junior) ved inkubation med anti-kasein korrelerer derimod ikke med SDS-PAGE og kan vække undren, da produkterne er baseret på valle. Immunblotting efter SDS-PAGE og inkubation med anti-valle viser resultater svarende til ELISA af β -lg, se fig. 2. Metoden har dog ikke vist sig så følsom som ELISA, idet

Tabel 4: Rest-antigenicitet vurderet ved ELISA og dot-immunbinding.

Produkt	ELISA [†]		Dot-immunbinding [*]		
	$\mu\text{g } \beta\text{-lg} / \text{l tilberedt modernælkserst.}$	$\mu\text{g STI} / \text{l tilberedt modernælkserst.}$	Anti-valle	Anti-kasein	Anti-STI
Nan 1	1716000	170	***	***	-
Nan HA	41580	< 3	***	**	-
Beba HA	61490	< 3	***	**	-
Alfaré	271	< 3	-	-	-
Aptamil Hypoantig.	229	< 3	*	-	-
Aptamil HA	59	12	-	-	*
Pregomin	5	< 3	-	-	*
Nutralon Pepti	88	< 3	-	**	-
Nutralon Pepti Plus	19	< 3	-	**	-
Pepti-Junior	14	< 3	-	***	-
Nutramigen	6	< 3	-	-	-
Pregestimil	7	< 3	-	-	-
Profylac	14	< 3	-	-	-

[†] β -lg bestemt ved sandwich-ELISA, STI ved kompetitivt ELISA.

* For hvert produkt er $1 \mu\text{l}$ i koncentrationen 20 mg protein/ml blevet påsat (dog $0,1 \text{ mg/ml}$ Nan 1). (*) angiver den relative farveintensitet bestemt ved densitometri (farveintensiteten angivet i "arealenheder", bestemt ved anvendelse af programmet: Cream, Kem-En-Tec Software Systems). (-) angiver farvning på blindværdiniveau ($3 \times$ farveintensiteten for ovalbumin, $1 \mu\text{l}$ påsat i koncentrationen 1 mg/ml).

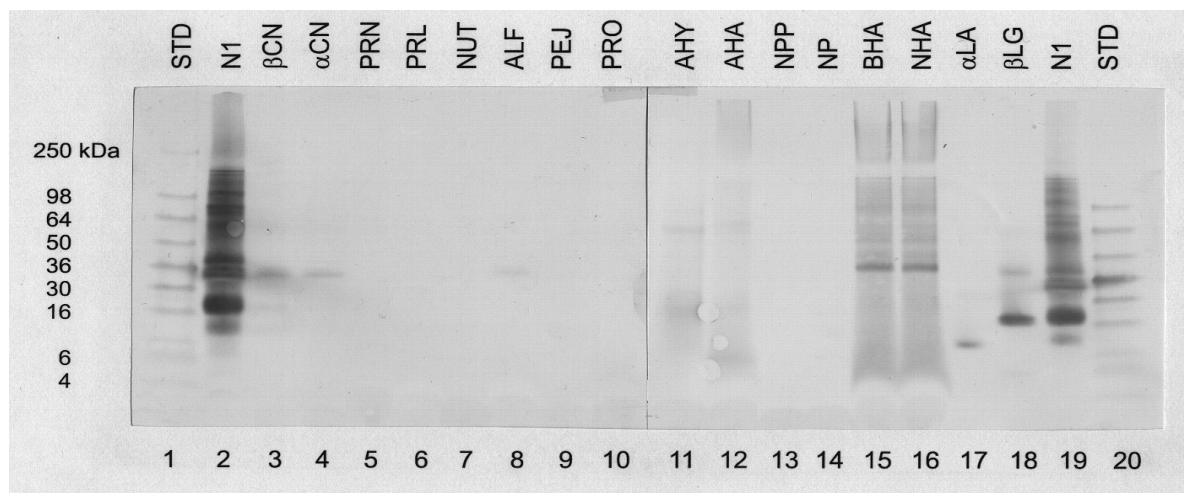


Fig. 2: Immunoblot af hydrolyserede modernmælkserstatninger. Inkubation med anti-valle. STD: standarder (molekylvægt angivet til venstre i figuren), β CN: β -kasein, α CN: α -kasein, α LA: α -lactalbumin, β LG: β -lactoglobulin.

kun pHF giver tydelige svar. Modsat ELISA bidrager immunblotting med viden om molekylvægtsfordelingen af de påviste residuelle proteiner, f.eks. er der for nogle produkters vedkommende problemer med at få nedbrudt dimeren af β -lg (Nan HA og Beba HA, begge pHF).

Immunologiske metoder

De immunologiske metoder er i projektet blevet tillagt størst vægt, da allergenicitet forudsætter immunogenicitet. En vurdering af de fysisk-kemiske og immunkemiske metoders prædiktive værdi skal således sammenholdes med resultaterne fra immuniseringsforsøgene.

J) Orale immuniseringsforsøg

Mus er blevet fodret med de tre hydrolyserede mælkeprodukter Nan HA, Profylac og Nutramigen, der alle indgår i den kliniske undersøgelse. β -laktoglobulin og Nan 1, som består af intakte immunogene mælkeproteiner og derfor burde inducere et immunrespons, blev medtaget til sammenligning. Ved den efterfølgende test for induktion af et oralt immunrespons har resultater vist, at der kun er blevet induceret tolerance over for β -lg. Det har ved brug af den opsatte model således ikke været muligt at påvise, om hypoallergene modernmælkserstatninger indeholder immunogent materiale. Derimod afslørede resultaterne, at et immunrespons rettet mod produkterne evt. kunne fremkaldes ved traditionel immunisering (indsprøjtning), se punkt K).

K) Immuniseringsforsøg

Efter et indledende pilotforsøg (12 måneder) er 6 mus i hver gruppe blevet immuniseret med β -lg, Nan1, Nan HA, Profylac og Nutramigen. Ikke-indavlede mus er anvendt for at give biologisk variation. Ca. 14 dage efter hver immunisering er musene blevet tappet for blod og et evt. immunrespons (antistofsvær) undersøgt ved ELISA. Forsøget har haft en varighed af 7 måneder.

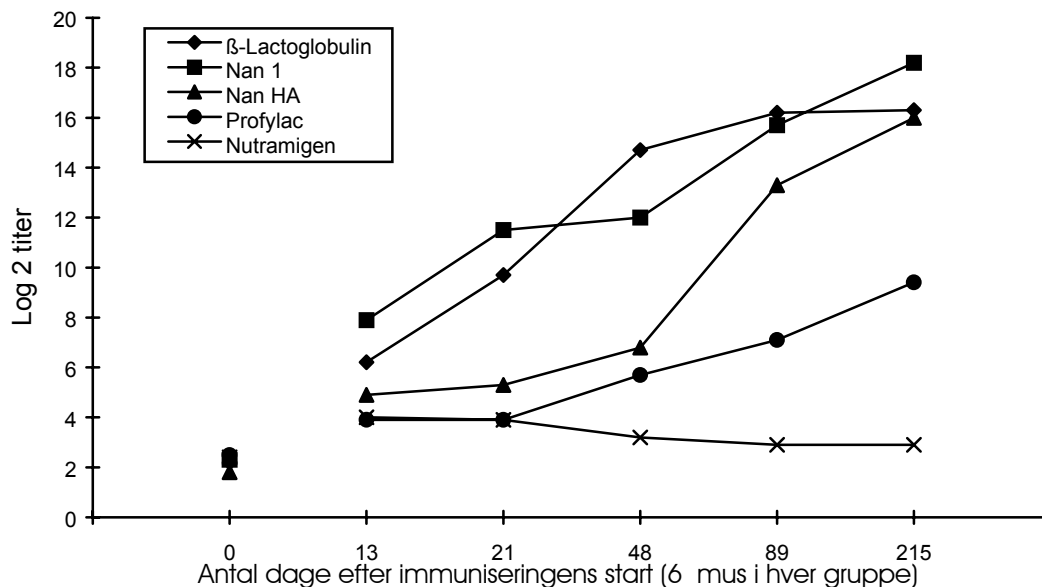


Fig. 3: Stigning i antistofsvær mod β -lactoglobulin og α -lactalbumin efter immunisering af mus med hhv. β -lactoglobulin, Nan 1, Nan HA og Profylac. Antistoffer i mus immuniseret med Nutramigen er testet mod α - og β -kasein, da Nutramigen er baseret på kaseiner.

Resultaterne af langtidsimmuniseringen fremgår af fig. 3. I løbet af den periode, som er almindelig ved immuniseringsforsøg (30-40 dage), giver mus immuniseret med β -lactoglobulin og Nan 1 klart svar, som forventet ved immunisering med intakte proteiner. De hydrolyserede mælkeprodukter giver derimod intet eller meget lavt svar. Efter 215 dage, hvor der er blevet immuniseret 8 gange, er antistofsværet for Nan HA derimod kommet op på samme niveau som β -lactoglobulin og Nan 1, og selv imod Profylac (eHF) er der dannet specifikke antistoffer. I de hydrolyserede mælkeprodukter Nan HA og Profylac er tilstedeværelsen af immunogene komponenter således blevet afsløret, *men først efter lang tids immunisering*. For Nutramigen er ingen immunogene komponenter blevet påvist, selv efter immunisering i 7 måneder. Sera fra mus immuniseret med Nutramigen er foruden anti-kasein antistoffer også testet for antistoffer rettet mod β -lg og α -la, men heller ikke i denne forbindelse kunne der påvises en stigning i antistofsvær.

L) T-celleproliferationsforsøg

Præliminære resultater har vist, at T-celler fra mus immuniseret med Nan 1 stimuleres af både Nan HA, Profylac og Nutramigen, dog i forskelligt omfang. Dette viser, at alle de tre nævnte hydrolyserede modermælkserstatninger er antigene. Ydermere har resultater vist, at T-celler fra mus immuniseret med hhv. β -lg, Nan 1, Nan HA, Profylac og Nutramigen stimuleres i varierende grad af mælkeproteinerne α -la, β -lg, lactoferrin, α -, β - og κ -kasein. Når en aktivering af T-celler fra mus immuniseret med et hydrolyseret produkt overhovedet er mulig, indikerer dette imidlertid, at produktet er immunogent. Undersøgelse af T-celleaktivering kan således være et nyttigt supplement til både immunkemiske metoder (mål for antigenicitet) og til immuniseringsforsøg (mål for immunogenicitet).

Sammenligning af resultater opnået ved fysisk-kemiske, immunkemiske og immunologiske metoder

Resultater fra fysisk-kemiske og immunkemiske metoder er forsøgt sammenholdt i tabel 5. For Nan HA, Profylac og Nutramigen korrelerer resultater fra SDS-PAGE og gelfiltrering med immuniseringsforsøget, hvor svaret er faldende i rækkefølgen Nan HA, Profylac og Nutramigen. Korrelationen til de immunkemiske metoder er mindre god, specielt for dot- og immunblotting. Det bør dog bemærkes, at udfaldet af resultaterne for de immunkemiske metoder er stærkt afhængig af hvilke antistoffer, der anvendes til detektion.

Det kunne være interessant at undersøge, om der er en korrelation mellem metoderne for de resterende produkter. Immuniseringsforsøg for flere produkter er således planlagt i projektet ”Fortsat karakterisering af hypoallergene mælkeprodukter”. På grundlag af ”samlet score” i tabel 5 er det imidlertid muligt at foretage en foreløbig opdeling af produkterne. I rækkefølge efter faldende antigenicitet fås således:

- 1) Nan HA (pHF) og Beba HA (pHF)
- 2) Aptamil HA (pHF), Aptamil Hypoantigen (pHF) og Pregomin (eHF)
- 3) Alfaré (eHF), Profylac (eHF), Nutrilon Pepti (pHF), Nutrilon Pepti Plus (eHF) og Pepti Junior (eHF)
- 4) Nutramigen (eHF) og Pregestimil (eHF).

Tabel 5: Relativ score for 12 hydrolyserede modernælkserstatninger, analyseret ved forskellige laboratoriemetoder.

Produkt	SDS-PAGE*	Gelfiltrering	ELISA*	Dot-immun-binding†	Immunblotting	Samlet score
Nan HA	4	4	4	4	4	20
Beba HA	4	4	4	4	4	20
Alfaré	1	2	3	0	1	7
Aptamil Hypoantig.	2	2	3	2	2	11
Aptamil HA	2	4	2+1	2	2	13
Pregomin	2	4	0	2	2	10
Nutrilon Pepti	0	2	2	2	0	6
Nutrilon Pepti Plus	0	2	1	2	0	5
Pepti-Junior	0	2	1	2	0	5
Nutramigen	0	0	0	0	0	0
Pregestimil	0	0	0	0	0	0
Profylac	3	2	1	0	0	6

* Det bemærkes, at høj molekylært proteinmateriale (ca. 20 kDa) kan påvises i Nutramigen og Pregestimil ved analyse af bundfald efter centrifugering.

* Relativ score for indhold af hhv. β -Ig og STI.

† Værdier er angivet i forhold til, hvor mange forskellige antistoffer, der blev bundet.

Hydrolysater

En fysisk-kemisk karakterisering af rene hydrolysater ved brug af samme metoder som beskrevet ovenfor har givet resultater som for eHF. Dog farvede hydrolysaterne mindre intensivt med sølv end Coomassie efter SDS-PAGE (ligesom for Profylac).

Adgang til hydrolysater har givet mulighed for at sammenligne produkt og hydrolysat. Resultater fra de fysisk-kemiske metoder viser, at der ikke er betydelig forskel på proteinmaterialet i hhv. Profylac-hydrolysat og -produkt. Også kapillarelektroforese af hhv. Adapta HA og hydrolysaterne, hvorpå produktet er baseret (Lacprodan CH-500 / WPH-800), viser, at der ikke er væsentlig forskel på analyse af hhv. produkt og hydrolysat. Prøveforberedelsen til HPCE kan dog for produktets vedkommende fjerne komponenter af betydning. Endvidere ses, modsat de færdige produkter, ingen fronttop for hydrolysater efter gelfiltrering. Det er muligt, at den ringe mængde protein, der kan påvises i denne top for færdige produkter, er tilstrækkelig til at inducere et immunrespons. En immunisering af hhv. Profylac og Profylac hydrolysat foretages derfor i projektet "Fortsat karakterisering af hypoallergene mælkeprodukter". Når resultater foreligger fra dette projekt vil der være mulighed for at vurdere, om karakterisering af hydrolysat fremfor det færdige produkt er forsvarlig, f.eks. i forbindelse med produktkontrol.

De immunkemiske metoder har for hydrolysaternes vedkommende afsløret tilstedeværelsen af β -lg, specielt i Lacprodan WPH-800, jfr. tabel 6. Til sammenligning er indholdet af β -lg angivet for tre udvalgte færdige produkter (bemærk at der kun er 12-13 % protein i disse produkter). Immunblotting har ved inkubation med anti-valle kun givet svar for Adapta HA (et bånd ved ca. 25000 Da).

Tabel 6: Indhold af β -lg i hydrolysater og mælkeprodukter.

Produkt	Batchnr.	mg β -lg/g pulver*
Lacprodan CH-500	46271 / 940627 (951000)	0,12
Lacprodan WPH-800	C27191 (95500)	14,00
Peptigen PH-200	60811 / 940923 (951000)	0,19
Peptigen SH-100	55031 / 940923 (3251-55031)	0,08
Adapta HA	0395 (holdbarhedsdato)	13,10
Nan HA (pHF)		315,00
Profylac (eHF)		0,11
Nutramigen (eHF)		0,04

* Pulver består primært af protein for hydrolysaternes vedkommende, mens der kun er ca. 13 % protein i de færdige produkter.

KONKLUSION

Der findes flere forskellige modermælkserstatninger produceret med henblik på behandling eller forebyggelse af komælksallergi på markedet. Mange af produkterne har imidlertid fremkaldt allergiske reaktioner hos spædbørn, hvorfor en nærmere karakterisering af produkterne er påkrævet med henblik på at identificere parametre kritiske for udvikling af allergi. I projektet er 6 ekstensivt og 6 partielt hydrolyserede modermælkserstatninger blevet karakteriseret ved fysisk-kemiske, immunkemiske og immunologiske metoder. Dette gør det muligt at vurdere antigeniciteten og immunogeniciteten af produkterne, der er en forudsætning for allergenicitet. Sidstnævnte kan kun testes ved kliniske forsøg.

Immunogenicitet er blevet påvist ved langtidssimmunisering af mus for både pHF og eHF (Nan HA og Profylac), hvorfor disse modermælkserstatninger er potentielt allergene. Analyse af produkterne i en koncentration svarende til drikkeklare opløsninger afslører ved SDS-PAGE og gelfiltrering tilstedeværelsen af proteinmateriale med en tilsyneladende molekylvægt på op til ca. 30 kDa for pHF og 12-14 kDa for eHF. Ved berigelse af proteinmateriale ved gelfiltrering eller centrifugering er det muligt at påvise højmolekylært materiale for endog meget hydrolyserede modermælkserstatninger (proteinmateriale med en molekylvægt på ca. 20 kDa påvist i Nutramigen). Det har ved ELISA været muligt at påvise β -lactoglobulin eller rester herfra i samtlige produkter, hvorimod immunblotting ikke viste sig så følsom.

Der er fundet en god korrelation mellem resultater fra hhv. immuniseringsforsøg og SDS-PAGE/gelfiltrering af hydrolyserede modermælkserstatninger. Således viser Nan HA efter SDS-PAGE mest detekterbart materiale, Profylac langt mindre og Nutramigen intet, svarende til de antistofsvare, der blev fundet i immuniseringsforsøget. Til karakterisering af nye produkter og til kvalitetskontrol kan SDS-PAGE af prøver i høj koncentration således anbefales. Metoden er, modsat gelfiltrering, hurtig og følsom, og ved berigelse af materiale ved en simpel centrifugering og ved at anvende forskellige farvningsmetoder er det muligt at påvise proteinmateriale, der ellers let undslipper detektion. Dog vides det endnu ikke, om en karakterisering af hydrolysat fremfor det færdige produkt kan forsvares. Immuniseringsforsøgene er kostbare, men betydeligt mere følsomme end SDS-PAGE og giver et direkte svar på, om produkter er immunogene eller ej. Således er der fundet klart svar mod β -lg ved immunisering med Profylac på trods af, at β -lg ikke kunne ses efter SDS-PAGE af Profylac og kun en ringe mængde β -lg blev påvist ved ELISA.

To laboratoriemetoder, der egner sig til vurdering af indholdet af potentielt allergent materiale i hydrolyserede modermælkserstatninger er således blevet udviklet. Der er en god overensstemmelse mellem resultaterne fra metoderne, som supplerer hinanden: SDS-PAGE giver en idé om, *hvilke* proteiner der er til stede i produkterne i mængder over 1-10 ng (ca. 0,05-0,50 μ g/ml), mens eksistensen af immunogent materiale i mængder herunder kan afsløres ved immuniseringsforsøg.

Data fra den kliniske undersøgelse afventes. Når disse foreligger, vil resultater opnået ved laboratoriemetoder blive korreleret hertil. Det skal da vise sig, om en given laboratoriemetode svarer bedst til de kliniske udfald, f.eks. immunisering af mus eller SDS-PAGE. I så fald er der her blevet udviklet nyttige metoder til forudsigelse af *allergenicitet*.

PUBLIKATIONER

Rosendal, A., Frøkiær, H., Barkholt, V. (1997): *Relationer mellem allergiforebyggende effekt og kemisk sammensætning for nogle hypoallergene modermælkerstatninger (II). Fysisk-kemisk karakterisering og udvikling af nye metoder til analyse af hypoallergene mælkeprodukter*. Mælkeritidende **24**, 659-662.

Frøkiær, H., Jørgensen, T.M.R., Rosendal, A., Tonsgaard, M.C., Barkholt, V. (1997): *Antinutritional and Allergenic Proteins*, in Antinutrients and Phytochemicals in Food (ed. Shahidi, F.), ACS Symposium Series **662**, American Chemical Society, Washington DC, pp. 44-60.

Foredrag (med abstracts)

Rosendal, A., Barkholt, V.: *Physical-chemical and Immunochemical Characterisation of 12 Hypoallergenic Milk Formulae*. International Conference of Food Safety and Quality Assurance, 7.-9. november 1995, Canberra, Australien.

Rosendal, A., Frøkiær, H., Barkholt, H.: *Determination of Immunogenicity of Hypoallergenic Milk Formulae*, Abstr. FP II-7, Joint Meeting of ESPACI and ERSPA, 22.-25. maj 1996, Odense.

Rosendal, A.: *Methods for Evaluation of High Molecular Weight Material and Antigenic Potential of Hydrolysed Milk Formulae*. Meeting on Functional and Physiological Properties of Milk Protein Hydrolysates, 26.-27. september 1996, Kiel, Tyskland.

Posters (med abstracts)

Barkholt, V., Frøkiær, H., Rosendal, A., Sørensen, S.: *Determination of Peptides and Proteins in Hypoallergenic Formulas by HPCE*, Seventh International Symposium on High Performance Capillary Electrophoresis, Würzburg, 29. januar – 2. februar 1995, Tyskland.

Rosendal, A., Frøkiær, H., Sørensen, S., Barkholt, V., Høst, A.: *Allergiforebyggende effekt og kemisk sammensætning af modermælkerstatninger*, Mejeriforskningsdag, 5. oktober 1995, KVL.

Frøkiær, H., Hrolfsdottir, H., Frisner, H., Rosendal, A., Jørgensen, T., Barkholt, V.: *T-cell Activation used for Investigation of the Antigenicity of Milk Formulas and Immunostimulating Properties of Milk Proteins*. Antibodies in Agrifood Science: From Research to Application, 22.-26. september 1997, New Hampshire, USA.

Rosendal, A., Frøkiær, H., Barkholt, V.: *Evaluering af metoder til karakterisering af hydrolyserede modermælkerstatninger*, Mejeriforskningsdagen, 7. november 1997, Århus.

Frøkiær, H., Hrolfsdottir, H., Jørgensen, T., Rosendal, A., Barkholt, V.: *In vitro T-celleaktivering til undersøgelse af modermælkerstatningers antigenicitet*, Mejeriforskningsdagen, 7. november 1997, Århus.

Rosendal, A., Frøkiær, H., Barkholt, V.: *Fysisk-kemisk karakterisering og udvikling af nye metoder til analyse af hypoallergene mælkeprodukter*, Levnedsmiddelkongres, 29.-30. januar 1998, DTU.

Frøkiær, H., Hrolfsdottir, H., Jørgensen, T., Rosendal, A., Barkholt, V.: *In vitro T-celleaktivering til undersøgelse af modermælksstatningers antigenicitet*, Levnedsmiddelkongres, 29.-30. januar 1998, DTU.

Foredrag uden (abstracts)

Rosendal, A.: *Hvorfor produceres hypoallergene modermælksstatninger?* Seminar afholdt for levnedsmiddelstuderende fra Bergen, Norge, 12. december 1994, Institut for Biokemi & Ernæring, DTU.

Rosendal, A.: *Allergenicity of Denatured and Hydrolyzed Proteins in Processed Food*, FEBS Course, 30. april – 5. maj 1995, Halkidiki, Grækenland.

Rosendal, A.: *Metoder til evaluering af hydrolyserede mælkeprodukter*, LMC – Fælles Faglig Dag, 30. oktober 1997, KVL.

Afslutningsrapport til Mejeribrugets ForskningsFond for delprojektet

En sammenlignende undersøgelse af den allergiforebyggende effekt af en partiel hydrolyseret hypoallergen modermælkserstatning med to ekstensiv hydrolyserede hypoallergene modermælkserstatninger. En prospektiv, randomiseret undersøgelse.

Delprojekt af

Relationer mellem allergiforebyggende effekt og kemisk sammensætning for nogle hypoallergene modermælkserstatninger

FØTEK I-samarbejdsprojekt mellem Mejeribrugets ForskningsFond og Undervisningsministeriet

Adm. overlæge, klinisk lektor, dr.med. Arne Høst (projektleder) Børneafdelingen, Odense
Universitetshospital,
DK 5000 Odense C
Tlf.: 6541 2080
E-mail: Arne.Hoest@OUH.dk

Øvrige projektdeltagere:

Overlæge Susanne Halken¹, reservelæge Kirsten Skamstrup Hansen², 1. reservelæge Hans Peter Jacobsen³, 1. reservelæge Anne Estmann³, reservelæge Anni Engberg¹, overlæge Lars Gudmund Hansen⁴, reservelæge Svend Reginald Kier⁴, 1. reservelæge Karin Lassen³, reservelæge Mette Lintrup¹, overlæge Sven Mortensen³, overlæge, dr.med. Karsten Kaas Ibsen², overlæge, dr.med. Ole Østerballe⁴.

Børneafdelingerne Sønderborg Sygehus¹, Glostrup Universitetshospital², Odense Universitetshospital³, Viborg Sygehus⁴

Projektperiode: 01.06.1994-31.12.1998

RESUMÉ

Formålet med undersøgelsen var at sammenligne den allergiforebyggende effekt af en partiel hydrolyseret hypoallergen modernælkserstatning med to ekstensiv hydrolyserede hypoallergene modernælkserstatninger i en 1-års fødselskohorte af nyfødte med høj risiko for udvikling af allergisk sygdom fra fødslen til 18 måneders alderen.

Metoder: Højrisikobørn fra danske centre blev inkluderet i perioden juni 1994 til juli 1995. Fra denne fødselskohorte bestående af 11.632 børn blev 595 (5,1 %) højrisikobørn identificeret. Højrisikobørn blev defineret som havende dobbelt forældredisposition eller enkelt disposition (forældre eller søskende) til allergisk sygdom. I tilfælde af enkelt disposition krævedes også navlesnors-IgE på mindst 0,3 kU/l. Ved fødslen blev alle børn randomiseret (fordelt ved lodtrækning) til en af tre forskellige blindede hypoallergene modernælkserstatninger ved hjælp af fødselsdatoen. Alle mødre fik normal kost under graviditeten og i laktationsperioden, og alle blev opfordret til ren brysternæring. Hvis brysternæringen var utilstrækkelig blev en af de tre hypoallergene modernælkserstatninger, i henhold til randomisering, givet i de første 4 måneder. Det blev anbefalet ikke at introducere komælk, komælksprodukter og fast føde (tilskudskost) før 4 måneders alderen. Efter 4 måneders alderen blev der givet normal spædbarnskost og normal komælksbaseret modernælkserstatning ved behov. Alle børn blev fulgt prospektivt med omhyggelig registrering af barnets kost, miljøfaktorer og udvikling af allergiske symptomer. Ved 6, 12 og 18 måneders alderen og i tilfælde af mistanke om allergiske symptomer blev børnene undersøgt af en læge, og i tilfælde af mistanke om fødevareallergi blev der udført kontrolleret eliminations- og provokationsundersøgelse på den pågældende børneafdeling.

Resultater: 550 børn blev inkluderet efter skriftlig informeret samtykke fra forældrene. 36 børn blev senere ekskluderet af undersøgelsen, fordi inklusionskriterierne ikke blev overholdt. 478 børn blev set ved alle besøg. 332 blev ren brysternærede, 79 fik en ekstensiv hydrolyseret hypoallergen modernælkserstatning baseret på kasein (Nutramigen), 82 fik en ekstensiv hydrolyseret hypoallergen modernælkserstatning baseret på valleprotein (Profylac), og 85 fik en delvis hydrolyseret hypoallergen modernælkserstatning baseret på valleprotein (Nan HA) gennem de 4 første levemåneder. De 4 grupper var identiske med hensyn til disposition til allergisk sygdom, navlesnors-IgE, fødested og køn. Rent brysternærede børn blev udsat mindre for tobaksrøg og pelsdyr i hjemmet, og de tilhørte højere socialklasser, mens børnene i de 3 grupper som fik hypoallergen modernælkserstatning var identiske med hensyn til miljøfaktorer. Forekomsten af brysternæring var høj, kun 8 (2%) af børnene fik slet ikke brysternæring. De 3 grupper som fik hypoallergen modernælkserstatning var identiske med hensyn til varigheden af brysternæring og alder ved introduktion af hypoallergen modernælkserstatning samt tilskudskost. Børn som fik ren brysternæring havde en signifikant lavere kumulativ incidens af astmatisk bronchitis (21,6%) sammenlignet med børn, som fik hypoallergen modernælkserstatning (35%). Ingen signifikante forskelle blev fundet i de 3 grupper, som fik hypoallergen modernælkserstatning med hensyn til kumulativ incidens af atopisk dermatitis (børneeksem) eller luftvejssymptomer. Den kumulative incidens af forælderapporateret komælksallergi var signifikant højere blandt børn som fik partiel hydrolyseret hypoallergen modernælkserstatning (Nan HA) sammenlignet med børn som fik ekstensiv hydrolyseret hypoallergen modernælkserstatning (Nutramigen eller Profylac) ved 12 og 18 måneders alderen (Nan HA: 7,1%, Nutramigen: 2,5%, Profylac: 0%, p 0,033). Den kumulative incidens af eliminations- og provokationsverificeret komælksallergi var 1,3 % (3/232) i den ren brysternærede gruppe, 0,6% (1/161) blandt børn, som fik en ekstensivt hydrolyseret hypoallergen modernælkserstatning (Nutramigen eller Profylac) og 4,7% (4/85) blandt børn som fik en partiel hydrolyseret modernælkserstatning (Nan HA)

Konklusion: Partiel hydrolyseret hypoallergen modernælkserstatning synes at være mindre effektiv end ekstensiv hydrolyseret modernælkserstatning med hensyn til forebyggelse af komælksallergi, 0,6% versus 4,7% (p 0.05). På grund af det lille antal af børn med komælksallergi, bør resultaterne fortolkes med forsigtighed. Sammenlignet med andre sammenlignelige studier var forekomsten af allergiske symptomer i denne undersøgelse lav, selvom den diætiske intervention hverken omfattede diæt til mødre i laktationsperioden eller diætiske restriktioner for børnene efter 4 måneders alderen.

ENGLISH SUMMARY

Comparison of a partially hydrolysed infants formula with two extensively hydrolysed formulas for allergy prevention. A prospective, randomised study.

The aim of this study was to compare the allergy preventive effect of a partially hydrolysed formula with two extensively hydrolysed formulas in a one-year birth cohort of infants with a high risk for development of allergic disease.

Methods. High-risk infants from 4 Danish centres were included in the period from June 1994 to July 1995. From this birth cohort consisting of 11.632 infants, 595 (5.1 %) high-risk infants were identified. High-risk infants were defined as having biparental or single atopic predisposition (parent or sibling), the latter combined with cord blood IgE 2: 0.3 kU/l. At birth all infants were randomised to one of 3 different blinded formulas by means of date of birth. All mothers had unrestricted diets during pregnancy and lactation and were encouraged to breastfeed exclusively. If breastfeeding was insufficient one of the 3 formulas, according to randomisation, was given during the first 4 months. It was recommended not to introduce cow's milk, cow's milk products and solid foods until the age of 4 months. After the age of 4 months a normal unrestricted diet and conventional cow's milk based formula was given when needed.

All infants were followed prospectively with careful registration of the diet, environmental factors and any atopic symptoms. At the age of 6, 12 and 18 months and in case of any possible atopic symptom the infants underwent physical examination. In case of suspicion of food allergy controlled elimination/challenge procedures were performed in a hospital setting.

Results. 550 infants were included after parental consent. 36 were excluded due to non-compliance. 478 were seen at all visits. 232 were exclusively breastfed, 79 received an extensively hydrolysed casein formula (Nutramigen), 82 an extensively hydrolysed whey formula (Profylac) and 85 a partially hydrolysed (Nan HA) during the first 4 months of life. The 4 groups were identical as regards atopic predisposition, cord blood IgE, birthplace and gender. Exclusively breastfed children were less exposed to tobacco smoke and pets at home and belonged to higher social classes, whereas the 3 formula groups were identical as regards environmental factors. The frequency of breastfeeding was high, only 8 (2%) children were not breastfed at all. The 3 formula groups were identical as regards duration of breastfeeding and age at introduction of formula and solid foods.

Children, who were exclusively breastfed, had a significantly lower cumulative incidence of recurrent wheezing (21,6%) compared with formula fed children (35%). No significant differences were found in the 3 formula groups as regards the cumulative incidence of atopic dermatitis or respiratory symptoms. The cumulative incidence of atopic dermatitis or respiratory symptoms. The cumulative incidence of parental reported cow's milk allergy was significantly higher in children fed partially hydrolysed formula (Nan H.A.) compared with extensively hydrolysed (Nutramigen or Profylac) at 12 and 18 months (Nan HA: 7.1 %, Nutramigen: 2.5%, Profylac: 0, p 0.033). The cumulative incidence of confirmed cow's milk allergy was 1.3% (3/232) in exclusively breastfed, 0.6% (1/161) in infants fed an extensively hydrolysed formula (Nutramigen or Profylac) and 4.7% (4/85) in infants fed the partially hydrolysed formula (Nan HA).

Conclusion. Partially hydrolysed formula seems to be less effective than extensively hydrolysed formula in preventing cow's milk allergy, 0.6% vs. 4.7% (p 0.05). Due to the small number of cases the results should be interpreted with caution. Compared with other comparable studies the frequency of atopic symptoms was low, even if the dietetic intervention did not include neither maternal diet during lactation nor dietary restrictions to the children after the age of 4 months.

DEFINITIONER OG FORKORTELSER

Højrisikobørn:	Børn med dobbelt forældredisposition til allergisk sygdom (astma, høfeber, atopisk dermatitis (børneeksem), allergisk nældefeber eller fødevareallergi) eller svær enkelt disposition til allergisk sygdom kombineret med navlesnors-IgE på mindst 0,3 kU/l. Svær atopisk sygdom var til stede, når en af forældrene eller en eller flere af barnets søskende havde eller havde haft allergisk sygdom med helårssymptomer eller symptomer fra mere end et organsystem.
Atopiske symptomer:	Astma, astmatisk bronchitis (mindst 2 perioder), atopisk dermatitis (børneeksem), allergisk nældefeber (mere end 2 gange), allergisk høfeber eller reproducerbare allergiske reaktioner mod fødevarer.
Astma:	Mindst 3 perioder med behandling skrævende hvæsende vejrtrækning diagnosticeret af en læge.
Astmatisk bronchitis:	Mindst 2 perioder med lægediagnosticeret, behandlingskrævende hvæsende vejrtrækning i forbindelse med øvre luftvejsinfektioner.
Atopisk dermatitis:	Objektivt påviselige områder med skællende, rødt og kløende eksematøst udslæt, lokaliseret til ansigt, hoved eller bøjefureområder. Kun eksem med mindst 2 lokalisationer på de typiske områder og kronisk/tilbagevendende eksem med en varighed på mindst 3 måneder blev registreret.
Allergisk nældefeber:	Mindst 2 tilfælde forårsaget af samme allergen - diagnosticeret af en læge.
Høfeber:	Typiske symptomer af mindst 1 måneds varighed eller tilbagevendende tilfælde forårsaget af samme allergen - diagnosticeret af læge.
Fødevareallergi (FA):	Reproducerbare allergiske reaktioner diagnosticeret ved kontrollerede eliminations- og provokationsundersøgelser.
Komælksallergi (CMA):	Diagnosticeredes ved: a) ophør af symptomer efter hver af 2 eliminationer af komælk og komælksprodukter - eliminationsperioder a 1-2 ugers varighed. b) tilbagevendende identiske symptomer efter provokation. c) udelukkelse af laktoseintolerans og infektion som årsag til symptomerne. Alle provokationerne blev i første omgang udført i åbent regi, men i tilfælde af uklare eller usikre resultater blev provokationen gentaget dobbelt blindet og placebokontrolleret.
A	Nutramigen (Mead Johnson, U.S.A.) en ekstensiv hydrolyseret hypoallergen modermælkserstatning baseret på kasein.
B	Profylac (ALK, Danmark). En ekstensiv hydrolyseret hypoallergen modermælkserstatning, som også er ultrafiltreret.
C	Nan HA, (Nestle, Schweiz). En partiel hydrolyseret hypoallergen modermælkserstatning baseret på valleprotein.
BF	Brysternæret.
HAF	Hypoallergen modermælkserstatning.
eHF	Ekstensiv hydrolyseret hypoallergen modermælkserstatning.
pHF	Partiel hydrolyseret hypoallergen modermælkserstatning.
DBPCFC	Dobbelt blindet placebo kontrolleret fødevareprovokation.
Hypoallergen	Mindre allergifremkaldende.

FORMÅL

Formålet med hovedprojektet er at undersøge, om der er en sammenhæng mellem den allergiforebyggende effekt og den kemiske sammensætning af 3 hypoallergene modernælkserstatninger: 1) Nutramigen, 2) Profylac og 3) Nan HA. Nutramigen og Profylac er baseret på protein, der er ekstensiv hydrolyseret (eHF), mens Nan HA er baseret på delvis hydrolyseret protein (pHF). I denne delundersøgelse var formålet at undersøge og sammenligne den mulige allergiforebyggende effekt af pHF (Nan HA) med effekten af eHF (Nutramigen og Profylac) i en fødselskohorte af danske børn med høj risiko for udvikling af allergisk sygdom. Sideløbende med denne undersøgelse er der under ledelse af Vibeke Barkholt, Institut for Biokemi og Ernæring, Danmarks Tekniske Universitet, Lyngby, foretaget en undersøgelse vedrørende den fysiske - kemiske karakterisering og udvikling af nye metoder til analyse af hypoallergene mælkeprodukter, herunder Nutramigen, Profylac og Nan HA. Efterfølgende skal resultater opnået ved laboriemetoderne sammenholdes med den kliniske allergiforebyggende effekt af de 3 hypoallergene modernælkserstatninger med henblik på vurdering af en mulig korrelation mellem et produkts påviste allergenicitet (allergifremkaldende egenskaber) påvist ved laboriemetoder og den allergiforebyggende effekt af det pågældende produkt i en klinisk human undersøgelse.

BAGGRUND

Forekomsten af allergiske sygdomme hos børn har været stigende i de seneste årtier. I de første leveår drejer det sig især om atopisk dermatitis (børneeksem), fødevareallergi og astmatisk bronchitis, hvorimod astma og høfeber er de hyppigst forekommende allergiske lidelser senere i barndommen. Fødevareallergi forekommer hos 7-8% af børn i alderen 0-3 år. Komælksallergi alene opstår hos 2-3% i første leveår. 80-90% af børn med komælksallergi er vokset fra allergien inden 3 års alderen, men størsteparten udvikler ofte andre allergier - f.eks. overfor inhalationsallergener som husstøvmider eller pelsdyr eller pollen i løbet af barnealderen. Det har derfor været af stor interesse at forebygge fødevareallergi - og specielt komælksallergi - for om muligt ikke blot at forebygge den tidlige opståen af fødevareallergi, men eventuelt også senere allergi overfor inhalationsallergener. Adskillige prospektive studier har vist en allergiforebyggende effekt af ren brysternæring eller en ekstensiv hydrolyseret hypoallergen modernælkserstatning blandt børn med høj risiko for allergiudvikling, når diætperioden omfattede mindst 4-6 måneder og tilskudskost (fast føde) ikke blev introduceret før 4 måneders alderen. Ved et sådant forebyggelsesregime er der fundet en reduceret forekomst af atopisk dermatitis (børneeksem) og fødevareallergi op til 5 års alderen. På grund af forskellige studiedesigns, definitioner og diagnostiske kriterier i tidligere undersøgelser har det ikke været muligt at drage holdbare konklusioner vedrørende effekten af forskellige diætetiske regimer og hypoallergene modernælkserstatninger. I en tidligere undersøgelse fandtes den allergiforebyggende effekt af en eHF baseret på kasein at være på samme niveau som effekten af en eHF baseret på valleprotein og som samtidig var ultrafiltreret. Andre undersøgelser har tydet på en vis forebyggende effekt af en pHF i forhold til almindelig komælksbaseret modernælkserstatning og sojaproteinbaseret modernælkserstatning. Tidligere undersøgelser har påvist langt højere indhold af f.eks. komælksproteinbetalactoglobulin i pHF (f.eks. 12400 nanogram/ml) sammenlignet med værdier på 0,91 - 8,9 nanogram/ml i eHF (f.eks. Nutramigen og Profylac) og 0,9-150 nanogram/ml i brystmælk. Andre undersøgelser har vist en positiv korrelation mellem sensibilisering/IgE-medierede reaktioner mod eHF og pHF hos børn med komælksallergi og graden af hydrolyse i disse produkter samt omfanget af restantigenicitet/allergenicitet målt ved f.eks. hudprøvetest og specifik IgE. Imidlertid er der tidligere kun foretaget en enkelt sammenlignende undersøgelse af den allergiforebyggende effekt af et pHF-produkt med et eHF-produkt, hvorfor den aktuelle undersøgelse af en kommerciel pHF (Nan HA) sammenlignet med to ligeledes kommercielle eHF (Nutramigen, Profylac) er interessant.

METODER

Undersøgelsespopulationen er en fødselskohorte fra 4 forskellige geografiske områder i Danmark. Levendefødte højrisikobørn fra Odense Universitetshospital, Viborg Sygehus, Glostrup Universitets hospital og Sønderborg Sygehus fra perioden 1. juni 1994 til 30. juni 1995 blev inviteret til at deltage i undersøgelsen. Alle disse nyfødte havde dobbelt forældredisposition eller svær enkelt disposition til allergisk sygdom og i tilfælde af enkelt disposition krævedes samtidig forhøjet navlesnors-IgE på mindst 0,3 kU/l. Det totale antal af levende nyfødte på de 4 sygehuse i studieperioden var 11.632. I alt 595 højrisikobørn (5,1 %) blev identificeret, og forældrene informeret om studiet. I alt 199 fra Odense, 135 fra Viborg, 103 fra Glostrup og 158 fra Sønderborg. I henhold til resultatet af tidligere undersøgelser forventedes det, at ca. 20% af disse højrisikobørn ville udvikle komælksallergi i løbet af første leveår, hvis de fik almindelig komælksbaseret modernælkserstatning, når ren brysternæring ikke var mulig i løbet af de første 6 måneder. Idet vi antog, på baggrund af et tidligere udenlandsk studie, at pHF ville blive halvt så effektivt med hensyn til forebyggelse af komælksallergi som eHF estimeredes det, at der krævedes mindst 200 nyfødte til randomisering til de 3 grupper (pHF, eHF, eHF) for at finde en forskel med 80% sandsynlighed, og at der krævedes mindst 300 for at påvise en forskel med 100% sandsynlighed. Da det forventedes, at omkring 50% af fødselskohorten ville få ren brysternæring, og da der ikke kunne forventes en 100% follow-up rate, blev det planlagt at inkludere mindst 500 og optimalt 600 højrisiko spædbørn i undersøgelsen.

Undersøgelsen er en dobbelt-blindet placebokontrolleret, randomiseret, interventionsundersøgelse. Under graviditeten blev spørgeskema med information vedrørende allergisk disposition besvaret af alle forældrene, som også blev informeret omkring studiet - såvel mundtligt som skriftligt. Alle mødre fik normal kost uden diætrestrictioner - såvel i graviditeten som i laktationsperioden og alle blev opfordret til ren brysternæring. Hvis brysternæring ikke var mulig eller utilstrækkelig, blev der i de første 4 levemåneder, i henhold til randomiseringen på baggrund af fødselsdatoen, tilrådt en af de 3 hypoallergene modernælkserstatninger; således tilhørte 1/3 af høj risiko børnene hver af de 3 grupper A, B eller C. De 3 forskellige hypoallergene modernælkserstatninger var blindet i identiske dåser med benævnelsen A, B eller C. Det blev anbefalet ikke at introducere komælk eller komælksprodukter og herunder almindelig komælksbaseret modernælkserstatning samt tilskudskost før 4 måneders alderen. Hvis der var behov for supplerende kost i de første levedøgn, indtil diegivningen var etableret, blev der anbefalet vand og kun hvis der var medicinsk indikation for supplerende kost, blev der tilbudt hypoallergen modernælkserstatning A, B eller C i henhold til randomiseringen. Efter 4 måneders alderen anbefalede en normal spædbarnskost og konventionel komælksbaseret modernælkserstatning, når der var behov for modernælkserstatning. Udover ovennævnte diætetiske anbefalinger tilrådede s det at undgå eksposition for tobaksrøg, pelsdyr og fugtige boligforhold. Forældrene til højrisikobørnene blev informeret såvel mundtligt som skriftligt under graviditeten og på sygehuset umiddelbart efter fødslen. Børnene blev fulgt prospektivt med omhyggelig registrering af kosten, forskellige miljøfaktorer og eventuelle symptomer på allergisygdom. Ved 6, 12 og 18 måneders alderen samt ved mulige allergiske symptomer, blev børnene undersøgt af læge (en af forfatterne), og barnets sygehistorie og data blev registreret. Ved symptomer på fødevareallergi blev der udført kontrolleret eliminations- og provokationsundersøgelse. Ved 18 måneders alderen, og hvis barnet havde allergiske symptomer, blev der udført hudprøvetest og undersøgelse for specifikt IgE (allergiantistof) mod mælk, æg, jordnød, birk, græs, gråbynke, hund, kat, hest, husstøvmider og skimmel. Den blindede kodning af produkterne blev først brudt, da dataregistreringen var fuldført og kontrolleret. Produkt A var Nutramigen, B = Profylac og C = Nan HA.

RESULTATER

Studie, population og data vedrørende ernæring.

I alt 595 nyfødte blev identificeret som højrisikobørn med hensyn til allergiudvikling. I 19 tilfælde ønskede forældrene ikke at deltage, 3 var født præmatur, og 23 nyfødte havde i løbet af de første levedøgn fået en ukorrekt modermælkserstatning. Således blev i alt 550 højrisikobørn inkluderet i undersøgelsen, 151 fra Sønderborg, 199 fra Odense, 91 fra Glostrup og 109 fra Viborg. 536 (97%) blev undersøgt ved 6 måneders alderen, 515 (94%) og 514 (93%) ved 18 måneders alderen. Kun børn som blev efterundersøgt ved 18 måneders alderen er inkluderet i analyserne. I alt 36 børn blev ekskluderet på grund af mangelfuld opfyldelse af inklusionskriterier eller manglende overholdelse af de diætiske forskrifter. De ekskluderede børn adskilte sig ikke fra den resterende del af undersøgelsesmaterialet med hensyn til køn, allergisk disposition, fødested eller nogen af de andre miljøfaktorer; således gennemførte i alt 478 højrisikobørn undersøgelsen ifølge forskrifterne. 232 børn blev ren brysternærede, 79 fik produkt A (Nutramigen), 82 produkt B (Profylac) og 85 produkt C (Nan HA) i varierende mængde i løbet af de første 4 levemåneder i henhold til den oprindelige randomisering. De 4 grupper er identiske med hensyn til allergisk disposition, navlesnors-IgE og køn (tabel 1)

Tabel 1.

	Total n 478(%)	MM n 232(%)	A n 79 (%)	B n 82 (%)	C n 85(%)
Dobbelt disp.	161 (34)	80 (34)	30 (38)	18 (22)	33 (39)
Enkelt disp+ NS IgE 0.3 kU/l	317 (66)	152 (66)	49 (62)	64 (78)	52 (61)
NS IgE median	0.50	0.50	0.41	0.50	0.50
Dreng	269 (56)	125 (54)	45 (57)	49 (60)	50 (59)
Piger	209 (44)	107 (46)	34 (43)	33 (40)	35 (41)

MM = udelukkende modermælksernærede

Tabel 2. Miljøfaktorer hos høj risiko-børn ernæret med modermælk (MM) sammenlignet med høj risiko-børn ernæret med modermælkserstatning (ME)

	Total n 478(%)	MM n 232(%)	ME n 246 (%)
Tobaksrøg			
ingen	301 (63)	168 (72)**	133 (54)
hjemme	177 (37)	64 (28)**	113 (46)
mor	102 (21)	30 (13)**	72 (29)
Pelsdyr			
ingen	298 (62)	154 (66)	142 (58)
hjemme	180 (38)	76 (33)*	104 (42)
dagpleje/inst.	87 (18)	34 (15)	53/230 (23)
Dagpleje/inst.	340 (71)	161 (69)	179 (75)
før 6 mdr.	29	15	14
ej oplyst	10	3	7
Bolig			
lejlighed	102 (22)	49 (21)	53 (22)
hus	370 (78)	179 (77)	191 (78)
ej oplyst	6	4	2
Social klasse **			
I	54 (11)	41 (18)	13 (5)
II	45 (9)	23 (10)	16 (7)
III	99 (21)	56 (24)	43 (18)
IV	176(37)	79 (34)	97 (40)
V	100 (21)	31(13)	69 (28)
ej oplyst	4	2	2

** MM sammenlignet med ME (A/B/C) p 0.000 Chi-square test

* MM sammenlignet med ME (A/B/C) p 0.040 Chi-square test

Miljøfaktorer fremgår af tabel 2. Rent brysternærede blev eksponeret mindre for tobaksrøg, pelsdyr i hjemmet og tilhørte en højere social klasse end de HFA ernærede, hvorimod de 3 HFA grupper var identiske med hensyn til miljøfaktorer.

Frekvensen af brysternæring var høj, kun 8 (2%) blev slet ikke brysternæret, 35 (7%) blev brysternæret for en kort periode - mindre end 1 måned - og 370 (77%) blev brysternæret mindst 3 måneder, (se tabel 3).

Tabel 3. Varighed af amning

Varighed mdr.	Alle n 478(%)	Nutramigen n 79 (%)	Profylac n 82 (%)	Nan HA n 85 (%)
0	8 (2)	2 (2)	2 (2)	4 (5)
>0	470 (98)	77 (97)	80 (98)	81 (95)
≥1	435 (91)	65 (79)	67 (82)	72 (85)
≥2	396 (83)	52 (66)	59 (72)	54 (64)
≥3	370 (77)	44 (56)	48 (59)	47 (55)
≥4	319 (67)	30 (38)	35 (43)	39 (46)
≥5	182 (38)	16 (20)	21 (26)	20 (24)
≥6	85(18)	9(11)	10 (12)	10 (12)
median	4.5	3.5	3.5	3.8

De 3 HFA grupper A, B og C var identiske med hensyn til varighed af brysternæring (tabel 3). Kun 8 børn blev ren HFA ernæret fra fødslen, og kun 11 (2%) af børnene havde fået tilskudskost før 4 måneders alderen. I alt fik 246 af børnene HFA i løbet af de første 4 måneder og i 73 tilfælde (30%) blev HFA introduceret i løbet af den første leveuge og yderligere 52 (21 %) fik HFA indenfor den første måned. Median alderen for introduktion af HFA var 1,0 måned i de 3-HFA-grupper. 62 børn fik HFA nogle få gange, 72 fik HFA som daglig supplement til brysternæring og 104 fik HFA som eneste ernæring i en længere periode. De 3 HFA grupper, A, B og C var identiske med hensyn til tidspunkt for introduktion af HFA og den givne mængde af hypoallergen modermælkserstatning. Fast føde (tilskudskost) blev introduceret senere i gruppen af ren brysternærede børn sammenlignet med HFA grupperne (median alder 5,0 måneder versus 4,0 måneder, $p < 0,01$). Der var ingen forskel mellem grupperne A, B og C.

Udvikling af allergiske symptomer

Hovedresultaterne fremgår af tabel 4 og 5.

Tabel 4. Symptomer. Kumuleret incidens 0-18 mdr. hos børn ernæret med Nutramigen, Profylac, Nan HA eller udelukkende modermælk (MM) i perioden fra 0 til 16 ugers alderen.

	MM n 232(%)	Nutramigen n 79 (%)	Profylac n 82(%)	Nan HA n 85(%)
Astma	21 (9.1)	11 (13.9)	5 (6.1)	5 (5.9)
Astmatisk bronkitis	50 (21.6)□	27 (34.2)	29 (35.4)	30 (35.3)
Rhinoconjunctivitis	8 (3.4)	4 (5.1)	2 (2.4)	3 (3.5)
Atopisk dermatitis	67 (28.9)	20 (25.3)	16 (19.5)	24 (28.2)
Urticaria	4 (1.7)	4 (5.1)	1 (1.2)	2 (2.4)
Fødevare allergi a)				
mælk	19 (8.2)	7 (8.9)	5 (6.1)	13 (15.3)
æg	6 (2.6)	2 (2.5)	0	6 (7.1)*
fisk	4 (1.7)	4 (5.1)	1 (1.2)	1 (1.2)
citrus	2 (0.9)	0	0	1 (1.2)
peanut	6 (2.6)	1 (1.3)	0	0
andet	0	0	0	0
	11 (4.7)	4 (5.1)	4 (4.9)	7 (8.2)
Atopi symptomer 1)	103 (44.4)	41 (51.9)	40 (48.8)	43 (50.6)
Atopi symptomer 2)	86 (37.1)	31 (39.2)	23 (28.0)	33 (38.8)
Atopi symptomer 3)	81 (34.9)	30 (38.0)	20 (24.4)	29 (34.1)

a) forældre rapporterede fødevarereaktioner

Atopi symptomer 1): Astma, recidiverende astmatisk bronkitis, rhinoconjunctivitis, atopisk dermatitis, urticaria og fødeveareallergi

Atopi symptomer 2): Astma, rhinoconjunctivitis, atopisk dermatitis, urticaria, fødeveareallergi

Atopi symptomer 3): Astma, rhinoconjunctivitis, atopisk dermatitis, urticaria

* Nan HA vs. Nutramigen vs. Profylac: p 0.033 Fisher's Exact test

Nan HA vs. Nutramigen + Profylac: p 0.022 Fisher's Exact test

□ MM vs. 1\1E (Nan HA+ Nutramigen+Profylac): p 0.001 Chi-Square test

Rent brysternærede børn havde signifikant lavere kumulativ incidens af astmatisk bronchitis både ved 6, 12 og 18 måneders alderen (p 0,001). Der blev ikke fundet nogen signifikante forskelle mellem grupperne med hensyn til forekomsten af astma, rhinoconjunctivitis og eller atopisk dermatitis. Den kumulerede incidens af forælderreporteret komælksallergi var signifikant højere i gruppe C sammenlignet med gruppe A og B både ved 12 og ved 18 måneders alderen (A: 2,5%, B: 0%, C: 7,1%, p 0,033). Ved 12 måneders alderen var den kumulative incidens af forælderreporteret fødeveareallergi signifikant højere i gruppe C end i gruppe A og B (A: 3,8%, B: 1,2%, C: 11,8%, p 0,009). Blandt de 125 børn som fik inkluderet HFA i kosten indenfor de første 4 uger, var den kumulative incidens af forælderreporteret fødeveareallergi signifikant højere i gruppe C end i gruppe A og B ved 12 måneders alderen, A + B: 4% (3/78) versus C: 15% (7/47); p 0,040 og ved 18 måneders alderen A + B : 4% (3/78) versus C: 17%

(8/47); p 0,020. Gruppe A og B var identiske med hensyn til kumulative incidens af atopiske symptomer og rapporterede fødevareallergier. Både med hensyn til den kumulative incidens og punktprævalensen af summen af atopiske symptomer var der en ikke signifikant tendens til en højere forekomst i gruppe C (Nan HA), men forskellene var kun signifikante med hensyn til fødevareallergi.

Tabel 5. Fødevare allergi. Reaktioner bekræftet ved kontrollerede eliminations / provokations procedurer. Kumuleret incidens 0-18 mdr.

	Total n 478(%)	MM n 232(%)	Nutramigen n 79 (%)	Profylac n 82(%)	Nan HA n 85(%)
mælk	8 (1.7)	3 (1.3)	1 (1.3)	0	4 (4.7)*
æg	6 (1.3)	3 (1.3)	2 (2.5)	0	0
hvede	1 (2.1)	1 (0.4)	0	0	0

* Nan HA sammenlignet med Nutramigen + Profylac: p 0.05 (Fisher's Exact Test)

Baseret på kontrollerede eliminations- og provokationsundersøgelser verificeredes komælksallergi (tabel 5) hos 8/478 (1,7%); 3/232 (1,3%) hos rent brysternærede, 1/161 (0,6%) i eHF grupperne og 4/85 (4,7%) i C gruppen (Nan HA), p 0,05. Alle børnene med komælksallergi tolererede Nutramigen og/eller Profylac, men ikke Nan HA.

Konklusion

I denne prospektive dobbelt blindede, randomiserede undersøgelse fandt vi, at rent brysternærede højrisikobørn havde en signifikant lavere kumulativ incidens af astmatisk bronchitis sammenlignet med højrisikobørn ernæret med hypoallergen modermælkserstatning. Imidlertid blev højrisikobørn i den brysternærede gruppe også mindre eksponeret for tobaksrygning og pelsdyr, og fast føde (tilskudskost) blev også introduceret senere i den brysternærede gruppe, ligesom børnene i denne gruppe tilhørte en højere social klasse. Disse faktorer er utvivlsomt medvirkende, i det mindste delvis, til den bedre forebyggende effekt i den brysternærede gruppe. Kun få børn udviklede verificeret komælksallergi og andre fødevareallergier. Delvis hydrolyserede hypoallergene modermælkserstatninger synes at være mindre effektive end ekstensiv hydrolyserede hypoallergene modermælkserstatninger med hensyn til forebyggelse af fødevareallergi. Imidlertid bør resultaterne af denne undersøgelse fortolkes med forsigtighed på grund af de det lille antal tilfælde med komælksallergi. Generelt fandtes en lav forekomst af komælksallergi, såvel i den brysternærede som i grupperne ernæret med hypoallergen modermælkserstatning. Årsagen hertil er sandsynligvis en meget høj frekvens af ren brysternæring i undersøgelsespopulationen, formentlig på grund af ønsket om optimal allergiforebyggende effekt af langvarig brysternæring. Der var ingen forskelle med hensyn til udvikling af luftvejsallergiske sygdomme mellem de undersøgte grupper. Sammenlignet med andre sammenlignelige studier var frekvensen af forekomsten af allergiske symptomer lav, selvom den diætetiske forebyggelse ikke omfattede hverken maternel diæt i laktationsperioden eller restriktioner for børnene efter 4 måneders alderen. Et diætetisk forebyggelsesprogram omfattende de 4 første levemåneder synes sufficient.

