

# Afslutningsrapport

Humanfysiologiske effekter af mælkesyrebakterier

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 2001-38

Januar 2001



**mejeri**foreningen

danish dairy board

## AFSLUTNINGSRAPPORT TIL MFF FOR PROJEKTET

# Humanfysiologiske effekter af mælkesyrebakterier

Vibeke Rosenfeldt Nielsen<sup>1,3</sup>, Charlotte Nexmann Larsen<sup>2</sup> (tidligere Jacobsen), Mikael Tvede<sup>4</sup>, Brittmarie Sandström<sup>1</sup>, Peter Lange Møller<sup>2</sup>, Anders Pærregaard<sup>3</sup> og Mogens Jakobsen<sup>2</sup>, Kim Fleischer Michaelsen<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Forskningsinstitut for Human Ernæring og <sup>2</sup>Mejeri- og Levnedsmiddelinstituttet  
Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole  
Frederiksberg*

<sup>3</sup>*Børneafdelingen  
H:S Hvidovre Hospital*

<sup>4</sup>*Klinisk mikrobiologisk afdeling  
H:S Rigshospitalet*

## Resumé

### HUMANFYSIOLOGISKE EFFEKTER AF MÆLKESYREBAKTERIER

Vibeke Rosenfeldt Nielsen<sup>1,3</sup>, Charlotte Nexmann Larsen<sup>2</sup> (tidligere Jacobsen), Mikael Tvede<sup>4</sup>, Brittmarie Sandström<sup>1</sup>, Peter Lange Møller<sup>2</sup>, Anders Pærregaard<sup>3</sup>, Mogens Jakobsen<sup>2</sup> og Kim Fleischer Michaelsen<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Forskningsinstitut for Human Ernæring og <sup>2</sup>Mejeri- og Levnedsmiddelinstituttet, Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole, Frederiksberg, <sup>3</sup>Børneafdelingen, H:S Hvidovre Hospital, <sup>4</sup>Klinisk mikrobiologisk afdeling, H:S Rigshospitalet

For at få et bedre kendskab til de virksomme probiotiske mekanismer *in vivo*, er det vigtigt at koble resultater fra *in vitro* undersøgelser af specifikke stammer til resultaterne fra kliniske forsøg, hvor de samme stammer er brugt. Det var intentionen at etablere et tværfagligt samarbejde mellem forskere der arbejdede med laboratoriemetoder og klinikere. Resultaterne fra *in vitro* undersøgelserne blev brugt til at udvælge og evaluere stammer med potentielle probiotiske effekter. De udvalgte stammer blev senere brugt i undersøgelser af infektionerssygdomme og immunmedierede sygdomme hos børn.

## Metoder

1. Baseret på *in vitro* screening af 48 stammer blev mælkesyrebakterier med god adhæsion til mavetarmepithel og/eller stærk anti-mikrobiel aktivitet mod patogene bakterier udvalgt til yderligere evaluering.
2. I et dobbeltblindt placebokontrolleret overkrydsningsforsøg blev to bakteriepræparationer, der indeholdt en blanding af hhv. 3 og 2 af de udvalgte stammer givet til raske forsøgspersoner. Tilstedeværelse af de indtagne stammer i afføringsprøver blev undersøgt med PCR og restriktionsenzymanalyser kombineret med "Pulsed Field Gel Elektrophoresis". Evnen til at kolonisere sikkerheden og mulige bivirkninger hos de udvalgte stammer blev undersøgt.
3. To dobbeltblindede placebokontrollerede undersøgelser blev gennemført for at undersøge effekten overfor akut diarre hos børn. Det ene studie inkluderede børn rekrutteret fra vuggestuer og børnehaver og det andet børn henvist til hospital.
4. Dobbeltblindet overkrydsningsforsøg for at undersøge den kliniske effekt og den potentielle immunmodulerende effekt hos børn med atopisk dermatit. Stammernes evne til at beskytte tarmmukosa barrierens integritet blev undersøgt ved hjælp af en undersøgelse af tarmens permeabilitet.

## Resultater

1. *In vitro studier.* Baseret på *in vitro* studier af adhæsionsevnen og den antimikrobielle effekt blev to blandinger med i alt fem stammer udvalgt til de kliniske studier: Blanding A) *Lactobacillus rhamnosus* 19070-2, *L. reuteri* DSM 12246, *L. rhamnosus* L. GG, blanding B) *L. casei* subsp. *alactus* CHCC 3137 og *L. delbrueckii* subsp. *lactis*.
2. *Afprøvning hos raske voksne.* I et efterfølgende studie blev resultaterne fra *in vitro* undersøgelserne vurderet i forhold til stammernes evne til at overleve tarmpassagen og til et at etablere sig i tarmfloraen, undersøgt hos raske voksne. Der var ingen effekt på tarmfunktionsparametrene og ingen bivirkninger. Indgiften af mælkesyrebakterier påvirkede ikke den gastrointestinale transitid. Der var ingen større påvirkning af sammensætningen af mavetarmkanalens mikroflora i de 18 dage forsøgspersonerne indtog teststammerne. Blodlipiderne blev ikke påvirket. Fra de to testblandinger blev

blandingen med *L. paracasei* subsp. *paracasei* 19070 og *L. reuteri* 12002 valgt til brug i de pædiatriske studier.

3. *Akut diarre hos vuggestuebørn.* I 63% af de 43 patienter som gennemførte studiet fandt man rotavirus i afføringsprøverne. Hos patienter behandlet med de udvalgte mælkesyrebakterie stammer blev varigheden af diarre nedsat (76 timer hos patienter behandlet med probiotika vs 116 timer i kontrolgruppen ( $p=0,048$ )). Hos patienter med diarre i mindre end 60 timer før behandlingen blev startet (tidlig intervention) var der en klarere effekt af probiotika. Varigheden af diarre efter tidlig behandling var 79 timer mod 139 timer i placebogruppen ( $p=0,020$ ).
4. *Akut diarre hos hospitalsindlagte børn.* Rotavirus antigen blev identificeret hos 66% af patienterne. Der var ingen signifikant afkortning af diarrevarigheden, og alle patienterne blev inkluderet. Der var dog i den behandlede gruppe signifikant færre patienter med diarre fem dage efter behandlingens start (3/30 patienter fra behandlingsgruppen mod 13/39 fra kontrolgruppen ( $p=0,023$ )). Ydermere var indlæggelsestiden kortere hos patienter behandlet med mælkesyrebakterier (1,6 dage i behandlingsgruppen mod 2,6 dage i kontrolgruppen,  $p= 0,024$ ). Fem dage efter behandlingens start fandt man rotavirus antigener hos 46% af patienterne i kontrolgruppen mod 12% i behandlingsgruppen ( $p=0,025$ ).
5. *Undersøgelse af børn med atopisk dermatit.* Foreløbige resultater viser ikke nogen bedring i klinisk sygdomsaktivitet. Foreløbige resultater af effekten af mælkesyrebakterierne på cytokin produktionen er dog lovende.

## Summary

### PHYSIOLOGICAL EFFECTS IN THE HUMAN LACTIC ACID BACTERIA

Vibeke Rosenfeldt Nielsen<sup>1,3</sup>, Charlotte Nexmann Larsen<sup>2</sup> (tidligere Jacobsen), Mikael Tvede<sup>4</sup>, Brittmarie Sandström<sup>1</sup>, Peter Lange Møller<sup>2</sup>, Anders Pærregaard<sup>3</sup> og Mogens Jakobsen<sup>2</sup>, Kim Fleischer Michaelsen<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Research Department of Human Nutrition and <sup>2</sup>Department of Dairy and Food Sciences, The Royal Veterinary and Agricultural University, Frederiksberg, <sup>3</sup>Paediatric Department, H:S Hvidovre Hospital, <sup>4</sup> Clinical microbiology Department, H:S Rigshospitalet

To achieve knowledge of the exact probiotic mechanism *in vivo*, it is important to link results from *in vitro* testing of specific strains to evaluation of the same strains in clinical trials. In the current project a systematic management approach in the selection and evaluation of candidate probiotics was intended. A collaboration between laboratory and clinical specialists was established. Results from *in vitro* investigations formed the basis of selecting and evaluating strains as therapeutic agents. Subsequently the best strains were selected for clinical trials. An evaluation of selected strains as therapeutic agents in specific paediatric infectious and immunemediated disorders was performed.

## Methods

1. From *in vitro* screening of 48 strains, lactobacilli with good adhesion to intestinal epithelium and /or strong antimicrobial activity against pathogenic bacteria were chosen for further evaluation.
2. In a double blind placebo controlled cross-over trial, two bacterial preparations, containing a mixture of respectively 3 and 2 of the selected strains were given to healthy adult volunteers. Recovery of the ingested strains in faecal samples was assessed by PCR and Restriction Enzyme Analysis combined with Pulsed Field Gel Electrophoresis. Colonisation capacity of ingested strains, and safety and tolerability of the bacterial preparations were established.
3. Two double blind placebo controlled trial to examine the effect of selected strains in acute childhood diarrhoea were performed. One including children recruited from day-care centres and one with children admitted to the hospital.
4. Double blind placebo controlled cross-over study to examine the clinical and potential immunomodulating effects of the same lactobacilli strains was performed among children with atopic dermatitis in childhood. The role of lactic acid bacteria in protecting the integrity of the gut mucosal barrier was investigated through examination of the small intestinal permeability.

## Results

1. *In vitro studies* based on the *in vitro* evaluation of adherence properties and antimicrobial activity, two mixtures with a total of five strains were selected for the *in vivo* studies: Mixture A) *Lactobacillus rhamnosus* 19070-2, *L. reuteri* DSM 12246, *L. rhamnosus* L.GG, and mixture B) *L. casei* subsp. *alectus* CHCC 3137 and *L. delbrueckii* subsp. *lactis*.
2. *Evaluation in healthy adults.* In a subsequent study, results from the *in vitro* evaluation were judged against the ability of the selected strains to survive passage through the gastrointestinal tract and to maintain colonization in a study of healthy volunteers. No influence on overall bowel function and no adverse effects were demonstrated. Administration of lactic acid bacteria did not interfere with the gastrointestinal transit

time. No major impact on the indigenous gastrointestinal microflora during 18 days ingestion of test strains was observed. Serum lipids were not affected. From the 2 preparations, the mixture *L. paracasei* subsp. *paracasei* 19070 and *L. reuteri* 12002 were chosen for the paediatric studies.

3. *Acute diarrhoea in daycare centres.* In 63% of the 43 patients who completed the study, rotavirus was identified in stool specimens. In patients treated with the selected *Lactobacillus* strains, the mean duration of diarrhoea was reduced (76 h in patients treated with probiotics vs. 116 h in the control group (p=0.048)). In patients with diarrhoea for less than 60 h before start of treatment (early intervention), a more pronounced effect of probiotics was found: The duration of diarrhoea after "early" treatment was 78.8 h, vs. 138.9 h in the placebo group (p=0.020).
4. *Acute diarrhoea in hospitalised children.* Rotavirus antigen was identified in 66% of the patients. Overall, no significant reduction in duration of diarrhoea after intervention was found. However, in the treatment group, the number of patients with diarrhoea persisting more than 5 days after enrolment was significantly reduced (3/30 patients from the treatment group vs. 13/39 from the control group still had loose stools 120 h (5 days) after enrolment (p=0.023)). Moreover, the length of hospitalisation was shorter in patients treated with lactobacilli (1.6 days in the treatment group vs. 2.6 days in the control group, p= 0.024). Five days after initiation of therapy, rotavirus antigen was found in 46% of patients from the control group vs. 12% from the treatment group (p=0.025).
5. *Study on atopic dermatitis.* Preliminary results: no overall improvement in clinical severity was observed. Results of the impact of test strains on cytokine production are promising.

## AFSLUTNINGSRAPPORT TIL MFF FOR PROJEKTET

### HUMANFYSIOLOGISKE EFFEKTER AF MÆLKESYREBAKTERIER

*Projektleder:* Professor, dr. med. Kim Fleischer Michaelsen, FHE

*Øvrige deltagere:* Professor Mogens Jakobsen, MLI  
Overlæge, dr. med. Anders Pærregaard, H:S Hvidovre Hospital  
Professor Brittmarie Sandström, FHE  
Overlæge Mikael Tvede, Klinisk mikrobiologisk afdeling, H:S Righospitalet  
Læge, forskningsadjunkt Vibeke Rosenfeldt, FHE og H:S Hvidovre Hospital  
Forskningsadjunkt Charlotte Nexmann Larsen, MLI  
Forskningsadjunkt Peter Lange Møller, MLI

*Projektperiode:* 1. januar 1996 til 30. juni 2000

Projektet er et FØTEK II samarbejdsprojekt mellem Mejeribrugets ForskningsFond og Undervisningsministeriet, Jordbrugsministeriet og Industri- og Handelsstyrelsen.

#### *Overordnet formål*

Etablering af et samarbejde mellem ernæringsforskere, mikrobiologer og læger med speciale i ernæring og pædiatriske mavetarmsygdomme med henblik på udvikling af metoder og evaluering af mælkesyrebakteriekulturer med probiotiske egenskaber.

Projektet og denne rapport består af to dele: Laboratorieundersøgelser og kliniske undersøgelser.

### LABORATORIEUNDERSØGELSER

#### Screening af 47 lactobaciller

Ved *in vitro* undersøgelser udført på Mejeri- og Levnedsmiddelinstituttet, Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole, blev mikrobiel fysiologi og karakteristika ved 47 udvalgte mælkesyrebakterie stammer bedømt. Resultaterne dannede baggrund for udvælgelsen af de blandingskulturer af bakteriestammer, som blev anvendt i projektets forsøg.

#### *Formål*

1. at udvælge kulturer med evne til at overleve passage af mave og øvre tarm, etablere sig i tarmen og virke probiotisk.
2. at etablere metoder til genfinding af lactobaciller i fæces

#### *Metoder*

Ad 1. a) Indsamling af stammer.

Kulturerne blev udvalgt dels fra mejeriprodukter, kulturer med en probiotisk forhistorie, kulturer fra naturligt fermenterede ghanesiske majsprodukter samt human kliniske isolater fra tarm (se tabel 1).

Tabel 1. Oprindelse af testede laktobaciller

Kode	Stamme	Oprindelse	Ejer
<i>Isolater fra Ghanesisk fermenteret majs</i>			
Lb 1	<i>L. plantarum</i>	Cassava, Ghana	M. Halm <sup>1</sup>
Lb 6	<i>L. fermentum</i>	Majs dej, Ghana	M. Halm <sup>1</sup>
Lb 11	<i>L. fermentum</i>	Majs dej, Ghana	M. Halm <sup>1</sup>
Lb 12	<i>L. fermentum</i>	Majs dej, Ghana	M. Halm <sup>1</sup>
Lb 18	<i>L. fermentum</i>	Majs dej, Ghana	M. Halm <sup>1</sup>
Lb 20	<i>L. fermentum</i>	Majs dej, Ghana	M. Halm <sup>1</sup>
Lb 41	<i>L. fermentum</i>	Majs dej, Ghana	M. Halm <sup>1</sup>
Lb 43	<i>L. fermentum</i>	Majs dej, Ghana	M. Halm <sup>1</sup>
Lb 48	<i>L. fermentum</i>	Majs dej, Ghana	M. Halm <sup>1</sup>
Lb 50	<i>L. plantarum</i>	Gari, Ghana	M. Halm <sup>1</sup>
<i>Stammer med dokumenterede probiotiske egenskaber</i>			
La 1	<i>L. johnsonii (acidophilus)</i>	Human oprindelse (5)	Nestle <sup>2</sup>
BG2FO4	<i>L. crispatus</i>	Fæces fra voksent menneske (10)	Klaenhammer <sup>3</sup>
NCFM#2	<i>L. acidophilus</i>	Human oprindelse (22)	Klaenhammer <sup>3</sup>
DSM 20312	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	Human oprindelse (43)	DSMZ <sup>4</sup>
271	<i>L. rhamnosus</i>	Human colon (26)	Molin <sup>5</sup>
299	<i>L. plantarum</i>	Human colon (26)	Molin <sup>5</sup>
299v	<i>L. plantarum</i>	Sur dej (26)	Molin <sup>5</sup>
R2LC	<i>L. reuteri</i>	Rotte colon (26)	Molin <sup>5</sup>
DSM 12246	<i>L. reuteri</i>	Fæces fra svin (16)	El-Ziney <sup>6</sup>
LGG	<i>L. rhamnosus</i>	Fæces fra voksent menneske (21)	Valio <sup>7</sup>
<i>Humane isolater</i>			
22319-21	<i>L. plantarum</i>	Fæces fra en rask ghaneser	MT <sup>8</sup>
18911-2	<i>L. acidophilus</i>	Fæces fra dansk barn < 1 year	MT <sup>8</sup>
19015-6	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	Fæces fra dansk barn < 1 year	MT <sup>8</sup>
19020-8	<i>L. rhamnosus</i>	Fæces fra dansk barn < 1 year	MT <sup>8</sup>
19020-10	<i>Lactobacillus</i> sp.	Fæces fra dansk barn < 1 year	MT <sup>8</sup>
19058-4	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	Fæces fra dansk barn < 1 year	MT <sup>8</sup>
19070-2	<i>L. rhamnosus</i>	Fæces fra dansk barn < 1 year	MT <sup>8</sup>
22571-8	<i>L. acidophilus</i>	Fæces fra en rask ghaneser	MT <sup>8</sup>
<i>Mejeristammer</i>			
CHCC 2169	<i>L. acidophilus</i>	Ukendt	CHCC <sup>9</sup>
CHCC 2168	<i>L. acidophilus</i>	Ukendt	CHCC <sup>9</sup>
CHCC 3692	<i>L. crispatus</i>	Ukendt	CHCC <sup>9</sup>
CHCC 3577	<i>L. crispatus</i>	Ukendt	CHCC <sup>9</sup>
CHCC 2100	<i>L. rhamnosus</i>	Ukendt	CHCC <sup>9</sup>
CHCC 2099	<i>L. rhamnosus</i>	Ukendt	CHCC <sup>9</sup>
CHCC 759	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Ukendt	CHCC <sup>9</sup>
CHCC 2164	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Ukendt	CHCC <sup>9</sup>
CHCC 2329	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	Ukendt	CHCC <sup>9</sup>
CHCC 627	<i>L. helveticus</i>	Ukendt	CHCC <sup>9</sup>
CHCC 2166	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	Ukendt	CHCC <sup>9</sup>
CHCC 3981	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	Ukendt	CHCC <sup>9</sup>
CHCC 3982	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	Ukendt	CHCC <sup>9</sup>
CHCC 3740	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	Ukendt	CHCC <sup>9</sup>
CHCC 3136	<i>L. casei</i>	Ukendt	CHCC <sup>9</sup>
CHCC 3264	<i>L. acidophilus</i>	Ukendt	CHCC <sup>9</sup>
CHCC 3137	<i>L. casei</i> subsp. <i>alactus</i>	Ukendt	CHCC <sup>9</sup>
Lb 145	<i>L. acidophilus</i>	Ukendt	Wiesbye <sup>10</sup>
Lc 705	<i>L. rhamnosus</i>	Ukendt	Wiesbye <sup>10</sup>

*L. : Lactobacillus*

<sup>1</sup>M. Halm, Food Research Institute, Accra, Ghana

<sup>2</sup>Nestlé Research Center, Lausanne, Switzerland

<sup>3</sup>Prof. T.R. Klaenhammer, North Carolina University, USA

<sup>5</sup>Dr. Göran Molin, Lund University, Sweden

<sup>6</sup>M.G. El-Ziney, Alexandria University, Egypt

<sup>7</sup>Valio Ltd., Research and Development Centre, Finland

<sup>8</sup>M. Tvede, University Hospital of Copenhagen, Denmark.

<sup>9</sup>Chr. Hansen Culture Collection.

<sup>10</sup>Wiesbye, Germany



b) Overlevelse og vækst ved 0.3% galde.

Kulturerne blev testet i mikrotiterplader. Lactobaciller (konc.  $10^6$  celler/ml) blev inkuberet i MRS samt MRS indeholdende 0.3 % galde, og optisk densitet aflæst ( $OD_{620}$ ) efter 0, ½, 1, 1½, 2, 3, 4, 5, 6, 7 og 24 timers inkubation ved 37 °C. Overlevelse blev testet efter 4 timers inkubation ved udpladning på MRS agar.

c) Overlevelse ved pH 2.5. Kulturerne blev testet i mikrotiterplader. Lactobaciller (konc.  $10^6$  celler/ml) blev inkuberet i MRS samt MRS pH 2.5, og optisk densitet aflæst ( $OD_{620}$ ) efter 0, ½, 1, 1½, 2, 3, 4, 5, 6, 7 og 24 timers inkubation ved 37 °C. Overlevelse blev testet efter 4 timers inkubation ved udpladning på MRS agar.

d) Adhæsion til tarmepitellignende Caco-2 celler.

Konfluerende monolag af Caco-2 celler blev inficeret med lactobacillerne og inkuberet 1 time ved 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Efter inkubation blev cellerne vasket, fikseret og farvet med Giemsa. Bakterierne blev grupperet i 3 grupper, non-adhæsive, adhæsive og stærkt adhæsive, alt efter hvor mange bakterier der bandt sig til cellerne. Som eksempel vises isolat 271 og 299v.

Fig. a.

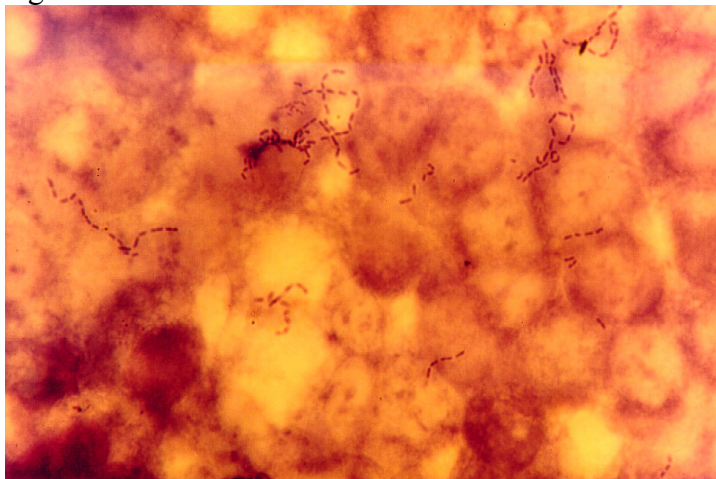


Fig. b.

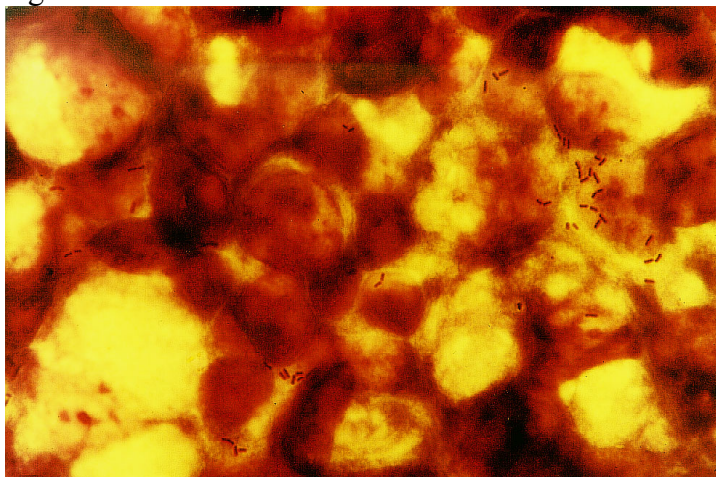


Fig. 1 a og b: Adhæsion af (a) *Lactobacillus rhamnosus* 271 samt (b) *Lactobacillus plantarum* 299v til Caco-2 celler.

e) Antimikrobiel aktivitet.

Testkulturene blev spottet på MRS-plader indeholdende 0,2 % glucose og inkuberet anaerobt ved 30 °C til 24 timer. Blød agar indeholdende indikatororganismen blev efterfølgende hældt over pladen og inkuberet til næste dag. Hæmningszoner større end 1 mm blev aflæst som positiv.

Resultaterne (Tabel 2 og 3) fra disse undersøgelser dannede baggrund for udvælgelsen af 5 kulturer til interventionsforsøg. Ved udvælgelsen blev der specielt lagt vægt på adhæsive egenskaber og antimikrobiel aktivitet. Det blev besluttet, at kombinere *Lactobacillus rhamnosus* 19070-2 og *L. reuteri* DSM 12246 i blanding A og *L. rhamnosus* L. GG med *L. casei* subsp. *alactus* CHCC 3137 og *L. delbrueckii* subsp. *lactis* i blanding B.

- Ad 2.
- a. Ved interventionsforsøget blev der isoleret lactobaciller fra fæces. For at genfinde og identificere de isolerede lactobaciller blev isolaterne først typet med ITS-PCR, hvorved isolaterne blev identificeret på artsniveau.
  - b. De fra fæces isolerede lactobaciller der var af samme art som de indgivne lactobaciller og dermed havde den samme ITS fragment profil blev derefter analyseret med REA-PFGE for derved at identificere isolaterne på stamme niveau.

Tabel 2. Adhæsionsegenskaber samt pH- og galdetolerance for 47 lactobaciller

Isolater	Adhæsion <sup>b</sup> ± S.D.	Vækst/overlevelse	Vækst/overlevelse
	(n=3)	at pH 2.5	at 0.3 % galde
Lb 1	21 ± 14	-/+	**/+
Lb 6	50 ± 41	-/+	**/+
Lb 11	52 ± 23	-/+	**/+
Lb 12	2 ± 2	-/+	**/+
Lb 18	0 ± 0	-/+	***/+
Lb 20	39 ± 28	-/+	***/+
Lb 41	19 ± 12	-/-	***/+
Lb 43	8 ± 3	-/+	**/+
Lb 48	3 ± 4	-/+	*/+
Lb 50	5 ± 5	-/+	*/+
La1	17 ± 9	-/-	-/+
BG2FO4	272 ± 88	-/-	-/+
NCFM#2	26 ± 13	-/+	**/+
DSM 20312	2 ± 1	-/+	ND
271	120 ± 19	-/+	**/+
299	268 ± 101	-/+	**/+
299v	355 ± 77	-/+	**/+
R2Lc	46 ± 39	-/+	ND
DSM 12246	218 ± 116	-/+	**/+
LGG	630 ± 275	-/+	-/+
22319-21	2 ± 1	-/+	-/+
18911-2	220 <sup>a</sup>	-/+	-/+
19015-6	82 ± 26	-/+	-/+
19020-8	84 ± 26	-/+	-/+
19020-10	214 ± 87	-/-	-/+
19058-4	41 ± 11	-/-	-/+
19070-2	713 ± 188	-/+	-/+
22571-8	1 ± 1	-/-	-/-
CHCC 2169	5 ± 0	-/ND	-/ND
CHCC 2168	73 ± 7	-/+	-/+
CHCC 3692	17 ± 1	-/+	-/+
CHCC 3577	78 ± 3	-/-	-/+
CHCC 2100	72 ± 21	-/+	-/+
CHCC 2099	90 ± 16	-/+	-/+
CHCC 759	0 ± 0	-/ND	-/ND
CHCC 2164	16 ± 6	-/ND	**/ND
CHCC 2329	164 ± 14	-/-	-/+
CHCC 627	73 ± 7	-/-	-/+
CHCC 2166	22 ± 0	-/-	**/+
CHCC 3981	4 ± 4	-/-	-/+
CHCC 3982	1 ± 1	-/-	-/+
CHCC 3740	64 ± 5	-/-	-/+
CHCC 3136	65 ± 12	-/-	-/+
CHCC 3264	2 ± 2	-/-	-/+
CHCC 3137	551 ± 223	-/-	-/+
Lb 145	20 ± 3	-/+	*/+
Lc 705	16 ± 15	-/+	**/+

<sup>a</sup>n=1

<sup>b</sup>i 20 talte felter

\*\*\* Uforsinket vækst

\*\* Forsinket vækst <4 t.

\* Forsinket vækst > 4 t.

- Ingen vækst

Tabel 3. Antimikrobiel aktivitet af 47 lactobaciller overfor patogene bakterier

Isolater	Patogene bakterier						
	<i>L. monoc.</i>	<i>Staph. a.</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salm. typh.</i>	<i>Sh. flex.</i>	<i>Y. ent.</i>
<i>Lb 1</i>	*	*	*	*	*	*	**
<i>Lb 6</i>	-	-	*	-	-	-	*
<i>Lb 11</i>	-	-	-	-	-	-	*
<i>Lb 12</i>	-	-	-	-	-	-	*
<i>Lb 18</i>	*	*	*	-	-	*	*
<i>Lb 20</i>	-	-	-	-	-	-	*
<i>Lb 41</i>	*	*	*	-	-	*	*
<i>Lb 43</i>	*	-	-	-	-	-	*
<i>Lb 48</i>	*	*	-	-	-	-	*
<i>Lb 50</i>	-	-	*	*	-	-	*
<i>La1</i>	*	*	*	*	*	*	**
<i>BG2FO4</i>	*	*	-	-	*	*	**
<i>NCFM#2</i>	*	-	-	-	-	*	**
<i>DSM 20312</i>	*	-	*	*	-	-	*
<i>271</i>	*	-	**	*	-	-	*
<i>299</i>	*	-	*	*	-	*	**
<i>299v</i>	*	-	*	*	-	-	*
<i>R2Lc</i>	*	-	*	-	-	-	*
<i>DSM 12246</i>	**	**	**	**	**	**	*
<i>LGG</i>	*	-	**	*	-	*	*
<i>22319-21</i>	*	*	*	*	*	*	*
<i>18911-2</i>	*	-	*	-	-	*	**
<i>19015-6</i>	*	-	**	*	*	*	*
<i>19020-8</i>	*	-	**	*	-	-	*
<i>19020-10</i>	-	-	*	*	-	-	*
<i>19058-4</i>	*	-	*	*	-	-	*
<i>19070-2</i>	*	-	**	*	-	-	**
<i>22571-8</i>	*	*	*	*	*	*	**
<i>CHCC 2169</i>	*	-	**	*	-	-	*
<i>CHCC 2168</i>	*	-	*	*	-	-	*
<i>CHCC 3692</i>	*	-	*	-	-	*	*
<i>CHCC 3577</i>	*	-	**	*	*	*	-
<i>CHCC 2100</i>	*	-	**	*	-	*	**
<i>CHCC 2099</i>	*	-	**	*	-	*	**
<i>CHCC 759</i>	**	-	*	-	-	*	**
<i>CHCC 2164</i>	-	-	-	-	-	-	*
<i>CHCC 2329</i>	*	*	*	*	*	**	**
<i>CHCC 627</i>	*	-	*	*	-	-	*
<i>CHCC 2166</i>	*	-	*	*	-	*	*
<i>CHCC 3981</i>	*	-	**	*	-	-	**
<i>CHCC 3982</i>	*	-	*	*	-	-	*
<i>CHCC 3740</i>	*	-	**	*	*	-	**
<i>CHCC 3136</i>	*	-	*	-	-	*	*
<i>CHCC 3264</i>	*	-	*	*	-	*	**
<i>CHCC 3137</i>	*	-	**	*	*	*	*
<i>Lb 145</i>	*	*	*	-	*	*	**
<i>Lc 705</i>	*	*	*	*	-	*	**

\* Hæmningszone 2-5 mm

\*\* Over 5 mm hæmningszone

Forkortelser: *L. monoc.*: *Listeria monocytogenes*; *Staph. A.*: *Staphylococcus aureus*; *B. cereus.*: *Bacillus cereus*; *E. coli.*: *Escherichia coli*; *Salm. typh.*: *Salmonella typhimurium*; *Shigella flexneri*; *Y. ent.*: *Yersinia enterocolitica*.

## KLINISKE UNDERSØGELSER

Under denne del af projektet blev der gennemført 4 projekter:

1. Fysiologisk effekt af mælkesyre bakterier hos raske voksne
2. Undersøgelse af udvalgte lactobacillers evne til adhæsion til tyktarmens slimhinde *in vivo*
3. Mælkesyre bakterier til behandling af akut diarre hos småbørn
4. Mælkesyre bakterier i behandling af atopisk dermatitis i barnealderen

### 1. Fysiologisk effekt af mælkesyre bakterier hos raske voksne

Undersøgelsen blev udført ved Forskningsinstitut for Human Ernæring fra 1.4.98-30.6.98.

#### Formål

- 1) at undersøge udvalgte mælkesyre bakteriekulturers evne til kolonisation *in vivo*, at bedømme effekten på den gastrointestinale microflora og på gastrointestinal transitid
- 2) at registrere eventuelle bivirkninger
- 3) at undersøge om indtagelse af de udvalgte stammer kunne påvirke blodets lipider (se-cholesterol, HDL-cholesterol og triglycerider)

#### Metode

Undersøgelsen var designet som et placebokontrolleret dobbeltblindt overkrydsningsforsøg, hvor 13 raske yngre mænd i 18 dage indtog enten blanding A (*L. paracasei* subsp. *paracasei* 19070-2, & *L. reuteri* DSM 12246) eller blanding B (*L. casei* subsp. *alactus*, *L. delbrüeckii* subsp. *lactis*, *L. rhamnosus* L.GG.). Hver stamme blev givet i en dosis af  $10^{10}$  CFU 2 gange dagligt. En wash-out periode på 17 dage blev indlagt mellem hver intervention.

#### Kulturernes evne til kolonisation *in vivo*

*L. reuteri* DSM 12246 og *L. rhamnosus* 19070-2 blev genfundet i fæcesprøver på dag 18 hos henholdsvis 8/12 og 10/12 forsøgspersoner. L. GG blev genfundet hos 7/12, mens de øvrige stammer indeholdt i blanding B kun blev genfundet sporadisk. I udvaskningsperioden, 6 dage efter indtagelse af kulturerne blev *L. reuteri* DSM 12246 genfundet hos 1 person, mens *L. rhamnosus* og L. GG blev genfundet hos 2. Ingen af de indgivne stammer kunne genfindes ved undersøgelse på dag 29, 11 dage efter indtagelse af mælkesyre bakterier.

#### Påvirkning af den gastrointestinale flora

Efter 18 dages indtagelse af blanding A fandtes et signifikant fald i antallet af *Staphylococcus aureus* i afføringsprøver, mens mængden af *Clostridium perfringens* faldt. Den kliniske betydning af dette er uvis. Der fandtes ingen signifikante ændringer i mængden af øvrige anaerobe eller aerobe bakterier. Indtagelse af blanding B medførte ingen signifikante ændringer i den gastrointestinale microflora.

#### Gastrointestinal transit-tid

Dette blev undersøgt ved tælling af røntgenfaste markører i afføringen. Undersøgelsen viste en vis interpersonel variation (fra 23 til 124 timer), som dog ikke var påvirkelig af indtagelse af mælkesyre bakteriekulturer (variansanalyse  $p=0,80$ ; figur 2).

Fig. 2

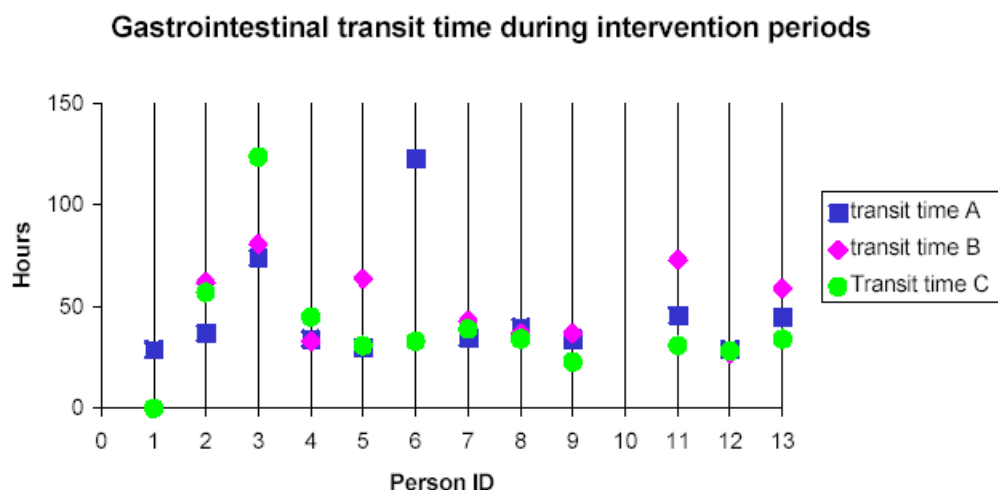


Fig. 2. Gastrointestinal transittid hos de 13 personer efter blanding A, blanding B og placebo (C).

I projektperioden rapporterede forsøgsdeltagerne dagligt gastrointestinale funktioner. Der var ingen signifikante ændringer i afføringshyppighed- eller konsistens. Bivirkninger blev ikke rapporteret.

#### Blodlipider

Der var ingen signifikante ændringer i blodlipider under intervention med mælkesyrebakterier (Tabel 4).

Test Preparation	Se- kolesterol mmol /ml Mean; median (Range)		Se- HDL- kolesterol mmol/ml Mean; median (Range)		Se- kolesterol/ Se- HDL- kolesterol (Ratio)	
	Day 0	Day 18	Day 0	Day 18	Day 0	Day 18
A	4,38; <b>4,36</b> (3,12-5,91)	4,47; <b>4,64</b> (3,01-5,55)	1,29; <b>1,25</b> (0,91-1,92)	1,35; <b>1,33</b> (0,98-2,13)	3,39	3,31
B	4,48; <b>4,26</b> (3,03-6,13)	4,67; <b>4,82</b> (2,91-5,55)	1,34; <b>1,29</b> (0,93-2,21)	<b>1,36</b> (0,94-1,80)	3,34	3,53
C	4,42; <b>4,50</b> (2,88-5,84)	4,41; <b>4,47</b> (2,88-5,10)	1,27; <b>1,31</b> (0,84-1,80)	1,30; <b>1,34</b> (0,84-1,80)	3,48	3,29

På grundlag af resultaterne fra undersøgelserne af raske voksne udvalgte man blanding B (*L. reuteri* DSM 12246 og *L. rhamnosus* 19070-2) til anvendelse i de pædiatriske studier.

## 2. Undersøgelse af udvalgte lactobacillers evne til adhæsion til tyktarmens slimhinde *in vivo*

Voksne patienter til koloskopi for tidligere godartede polypper i tyktarmen deltog i undersøgelsen. Patienterne indtog i 10 dage før koloskopi frysetørret pulver indeholdende mælkesyrebakterier (*L. rhamnosus* 19070-2 og *L. reuteri* DSM 12246,  $10^{10}$  CFU af hver stamme). Under koloskopi blev der taget biopsier fra colon ascendens, transversum og descendens. Identifikation af stammerne blev udført med molekylærbiologiske metoder (API 50CHL, ITS-PCT og REA-PFGE) af Peter Lange Møller. *L. reuteri* DSM 12246 blev genfundet hos 7/8 personer, *L. rhamnosus* 19070-2 hos 8/8.

## 3. Mælkesyrebakterier til behandling af akut diarre hos småbørn

Undersøgelsen bestod af to delundersøgelser af børn i alderen 6 måneder til 3 år:

- A. Børn i daginstitutioner
- B. Hospitalsindlagte børn

Undersøgelser blev gennemført parallelt i perioden 1.12.98-30.5.99, som dobbeltblindede placebo-kontrollerede interventionsstudier. Inklusionskriterier var i begge undersøgelser akut maveinfektion og diaré af en varighed på højst 7 dage. Patienterne blev randomiseret til behandling med frysetørret *Lactobacillus rhamnosus* 19070-2 og *L. reuteri* DSM 12246  $10^{10}$  CFU af hver stamme 2 gange dagligt i 5 dage eller placebo. Effektparametre var varighed af diaré ("time to recovery"), varighed af vandtynd diaré og temperaturforløb. I undersøgelsen af de hospitalsindlagte børn blev desuden varighed af virusudskillelse via afføringen (smitteperiode) opgjort. I begge undersøgelser deltog forældrene aktivt i registreringen af patienternes symptomer.

### A. Børn i daginstitutioner

50 børn blev inkluderet, heraf måtte 7 udgå, de fem på grund af indlæggelseskrævende symptomer. Af de 43 patienter som gennemførte undersøgelsen var 63% inficeret med rotavirus. Den gennemsnitlige diarevarighed efter påbegyndelse af behandling var 75,9 timer hos patienter behandlet med probiotika og 115,7 timer hos kontrolgruppen ( $p=0,048$ ). På dag 5 (120 timer efter inklusion i undersøgelsen) havde 2/24 patienter i behandlingsgruppen vs. 7/19 i placebogruppen stadig diaré ( $p=0,030$ , Fischer's exact test). Tredive patienter (70%) blev inkluderet tidligt i sygdomsperioden, idet intervention blev påbegyndt indenfor de første 60 timer af diareperioden. Efter tidlig behandling var varigheden af diare 78,8 timer vs. 138,9 timer i placebogruppen ( $P=0,020$ ). En ud af 17 i denne gruppe vs. 6 ud af 13 i kontrolgruppen havde stadig diare på 5. dagen ( $p=0,025$ , Fisher's exact test). På dag 6 blev en eller begge teststammer genfundet i afføringsprøver hos 65% af de behandlede patienter.

### B. Hospitalsindlagte børn, 6 måneder til 3 år

Ni og tres patienter, hvoraf 66% var inficeret med rotavirus, gennemførte undersøgelsen. For gruppen som helhed fandtes ingen signifikant ændring i diarévarigheden under behandling med mælkesyrebakterier. Imidlertid var antallet af patienter med diaré på 5. dagen signifikant lavere i den behandlede gruppe (3/30 i behandlingsgruppen vs. 13/39 i placebogruppen,  $p=0,023$ ). Herudover var indlæggelsesvarigheden kortere i den behandlede gruppe (1,6 dage i behandlingsgruppen vs. 2,6 dage i placebogruppen,  $p=0,024$ ). Blandt patienter, som blev inkluderet tidligt (indenfor 60 timer efter sygdomsstart) var varigheden af diaré 79,6 timer vs. 129,7 timer hos placebogruppen ( $p=0,003$ ). Hos patienter, som startede behandling tidligt, blev indlæggelsesvarigheden reduceret med 48%. Fem dage efter inklusionen blev rotavirus fundet hos 46% af patienterne i kontrolgruppen vs. 12% i behandlingsgruppen ( $p=0,025$ ).

#### 4. Mælkesyre bakterier i behandling af atopisk dermatitis i barnealderen

I undersøgelsen blev blanding A (*L. rhamnosus* 19070-2 og *L. reuteri* DSM 12246) testet som supplerende behandling af atopisk dermatitis (astmæksem, børneeksem) overfor placebo.

I undersøgelsen, som blev påbegyndt i oktober 1999 og afsluttet ultimo maj 2000, deltog 52 børn i alderen 9 måneder til 14 år. Otte børn måtte ekskluderes, hovedparten på grund af problemer med at indtage pulveret i en længere periode. Patienterne blev randomiseret dobbeltblindt til behandling med enten lactobaciller eller placebo. Undersøgelsen var designet som et overkrydsningsforsøg, hvor en 6 ugers interventionsperiode blev efterfulgt af 6 ugers wash-out periode. Alle patienter modtog således aktiv behandling. Lactobaciller blev givet som frysetørret granulat i doseringen  $10^{10}$  CFU af hver stamme 2 gange dagligt. Patienterne fortsatte i undersøgelsesperioden med lokalbehandling i form af glucokortikoidholdig (binyrebarkhormon) salve eller creme. Effekten blev bedømt klinisk ved hjælp af anerkendt standardiseret scoringssystem (SCORAD), måling af markører for sygdomsaktivitet i blodet (cytokiner, eosinophil-cation-protein), samt ved måling af tarmslimhindens gennemtrængelighed (permeabilitetsmåling, lactulose- mannitol-test). En samlet konklusion af undersøgelsens resultater foreligger endnu ikke.

##### Foreløbige resultater

SCORAD (klinisk bedømmelse af eksemets sværhedsgrad): I løbet af undersøgelsesperioden optrådte en beskedent bedring i eksemets sværhedsgrad, bedømt ved SCORAD (median SCORAD ved 1. undersøgelse: 35 vs. 23 ved 4. og sidste undersøgelse,  $p=0,050$ ). Faldet i SCORAD kan ikke tilskrives intervention med mælkesyrebakterier, men er formentlig forårsaget af hyppige ambulante kontrolbesøg og bedre forståelse for behandlingen af eksem sygdommen.

Markører for betændelsesreaktion: Der fandtes en sammenhæng mellem eksemets sværhedsgrad og visse cytokiner (interferon  $\gamma$ ). Patienter med svært eksem havde signifikant lavere produktion af interferon- $\gamma$  sammenlignet med patienter med moderat eksem. Patienter med svær inflammation, bedømt ved forhøjede ECP- værdier, udviste et signifikant fald i ECP under aktiv behandling sammenlignet med placebo (-14,6 mikrogram/L vs. -1,1 mikrogram/L,  $p=0,048$ ). Tilsvarende fandtes en modulering af TH2 cytokiner (IL4) under aktiv behandling.

Resultaterne af undersøgelse af tyndtarmens permeabilitet (lactulose-mannitol test) før og efter behandling med de udvalgte mælkesyrebakteriekulturer vil foreligge snarest.

#### GENEREL KONKLUSION

Anvendelige metoder til vurdering af mælkesyrebakteriers probiotiske egenskaber blev udviklet. Således kunne *in vitro* metoderne anvendes til at forudsige lactobacillernes overlevelsespotentiale i gastrointestinal kanal. Overlevelse ser ud til at være afhængig af bakteriernes adhæsionevne til Caco-2 celler samt deres tolerance overfor lavt pH. Selv stærkt adhærerende og syretolerante bakterier så dog ikke ud til at kolonisere tarmen længerevarende efter at behandlingen var afsluttet.

Daglig indtagelse af disse nye probiotika i op til 6 uger var veltolereret, og bivirkninger blev ikke rapporteret i behandlingsperioden. Stammerne viste god evne til kolonisation *in vivo*. Behandling med de udvalgte kulturer forkortede diarévarigheden hos børn med mild diare og hos børn indlagt med akut maveinfektion. Hos de sidstnævnte blev indlæggelsesvarigheden reduceret med op til 48%. Effekten syntes bedst ved tidlig behandling.

Foreløbige opgørelser af effekten af mælkesyrebakterier ved atopisk dermatitis viste ingen klinisk effekt, men stammerne viste evne til modulering af visse inflammationsmarkører (ECP og cytokiner) i blodet.

Projektets formål med at etablere et tværfagligt forskningsmiljø med samarbejde omkring mange aspekter af mælkesyrebakterier menes opfyldt. Samme gruppe har under FØTEK III programmet opnået en ny bevilling til fortsatte studier.



## Publikationer

C.N. Jacobsen, V. Rosenfeldt Nielsen, A.E. Hayford, P.L. Møller, K.F. Michaelsen, A. Pærregaard, B. Sandström, M. Tvede og M. Jakobsen. 1999. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. By *in vitro* techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. Appl. Environ. Microbiol. 65, 11, 4949-4956.

C. N. Jacobsen, K. F. Michaelsen, V. R. Nielsen, A. Pærregaard, B. M. Sandström, M. Tvede & M. Jakobsen (1998) Probiotiske effekter af mælkesyrebakterier. Mælkeritidende nr. 16, 384-386.

V. Rosenfeldt, M. Tvede, K.F. Michaelsen, P.L. Møller, P. Pedersen, H. Weyrehter, C.N. Larsen, B. Sandström, M. Jakobsen & A. Pærregaard : Effect of New Probiotic *Lactobacillus* Strains in Young Children Hospitalised with Acute Diarrhoea. Indsendt til Journal of Paediatric Gastroenterology and Nutrition november 2000.

V.Rosenfeldt, K.F. Michaelsen, P.L.Møller, M. Tvede, C.N. Larsen, B. Sandström, M. Jakobsen & A. Pærregaard: Effect of New Probiotic Lactobacillus Strains in Acute Diarrhoea among Children Attending Day Care Centres. Indsendt til Journal of Paediatric Gastroenterology and Nutrition november 2000.

### Deltagelse i internationale møder

C.N. Jacobsen, V. Rosenfeldt, A. Pærregaard, K.F. Michaelsen og M. Jakobsen. Danone "Probiotics" 12-13 feb 1997. Poster: Screening of probiotic activities of 48 strains of Lactobacilli.

C.N. Jacobsen, V. Rosenfeldt Nielsen, A. Hayford, P.L. Møller, K.F. Michaelsen, A. Pærregaard, B. Sandström, M. Tvede & M. Jakobsen. Poster: Probiotic activities of Lactobacilli studied by *in vitro* techniques. IDF's internationale kongres sept. 1998, Århus.

C.N. Jacobsen, A. Hayford, P.L. Møller, K.F. Michaelsen, V.R. Nielsen, A. Pærregaard, B. Sandström, M. Tvede og M. Jakobsen. Poster: Probiotic characteristics of *Lactobacilli* evaluated by *in vitro* techniques. Levnedsmiddeltkongres 1999, KVL, 28-29. januar 1999.

C.N. Jacobsen, K.F. Michaelsen, V.R. Nielsen, A. Pærregaard, B. Sandström, M. Tvede & M. Jakobsen. (1998) Poster: Probiotic characteristics of lactobacilli evaluated by "In vitro" techniques. Danish Biotechnology Conference IV: Frontiers in foodbiotechnology 28-29 May 1998. Munkebjerg, Vejle, Denmark.

C.N. Jacobsen, V. Rosenfeldt Nielsen, A. Hayford, P.L. Møller, K.F. Michaelsen, A. Pærregaard, B. Sandström, M. Tvede og M. Jakobsen. Poster: Probiotic activities of 47 strains of *Lactobacillus* spp. tested by model systems with selection of five strains for evaluation of the colonisation ability in humans. "Food Micro 99" 13-17 sept. 1999.

P.L. Møller, Jacobsen, C.N., V. Rosenfeldt Nielsen, A. Hayford, K.F. Michaelsen, A. Pærregaard, B. Sandström, M. Tvede og M. Jakobsen. Poster: Survival of 5 strains of lactobacillus in adult men and *in vitro* screening of probiotic activities of these strains. Sixth Symposium on Lactic Acid Bacteria, Veldhoven, The Netherlands 19-23 sept. 1999.

Vibeke Rosenfeldt, Anders Pærregaard, Kim Fleischer Michaelsen, Peter Lange Møller, Pernille Pedersen, Charlotte Nexmann Jacobsen, Brittmarie Sandström, Mogens Jakobsen & Michael Tvede :Probiotics in acute infantile gastroenteritis. 2<sup>nd</sup> World Congres of Paediatric Infectious Diseases. Manilla, nov 99.

V. Rosenfeldt, P.L. Møller, C.N. Jacobsen, A. Pærregaard, M. Tvede, B. Sandström, M. Jakobsen & K.F. Michaelsen. Physiological Effects of Lactic Acid Bacteria. Levnedsmiddeltkongres. DTU, Lyngby. Januar 2000.

### Foredrag og posters

V. Rosenfeldt, A. Pærregaard, C.N. Jacobsen, P.L. Møller, K.F. Michaelsen, M. Tvede, B. Sandström & M. Jakobsen: Physiological Effects of Lactic Acid Bacteria. Study I. A tolerance- and Efficacy Study in Healthy Volunteers. Workshop i Pædiatrisk Gastroenterologi, Hillerød 1998.

V. Rosenfeldt: Effekt af probiotika ved diaré og immunrelaterede sygdomme i barnealderen. Dansk Pædiatrisk Selskabs Vårnøde, Viborg, maj 1999

V. Rosenfeldt: Mælkesyrebakterier i behandling af akut diare hos småbørn. Et kontrolleret studie. Pædiatrisk Gastrointestinal Workshop, Middelfart, 1999.

A. Pærregaard, V.R. Nielsen, C.N. Jacobsen, P.L. Møller, M. Jacobsen, B. Sandström, M. Tvede, K.F. Michaelsen. Identification of probiotic acting lactobacilli by combined use of *in vitro* methods. World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, Boston, USA, aug. 2000. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2000;31(2):S253.

