

RESEARCH ARTICLE

Long Term Development of Gut Microbiota Composition in Atopic Children: Impact of Probiotics

N. B. M. M. Rutten^{1,2*}, D. M. W. Gorissen¹, A. Eck³, L. E. M. Niers^{1a}, A. M. Vlieger², I. Besseling-van der Vaart⁴, A. E. Budding³, P. H. M. Savelkoul^{3,5}, C. K. van der Ent¹, G. T. Rijkers⁶

1 Department of Pediatric Pulmonology and Allergology, Wilhelmina Children's Hospital, University Medical Centre, Utrecht, the Netherlands, **2** Department of Pediatrics, St Antonius Hospital, Nieuwegein, the Netherlands, **3** Department of Medical Microbiology and Infection Control, VU University Medical Centre, Amsterdam, the Netherlands, **4** Winclove Probiotics BV, Amsterdam, the Netherlands, **5** Department of Medical Microbiology, School of Nutrition & Translational Research in Metabolism (NUTRIM), Maastricht University Medical Centre, Maastricht, the Netherlands, **6** Department of Sciences, University College Roosevelt Academy, Middelburg and Department of Medical Microbiology and Immunology, St Antonius Hospital, Nieuwegein, the Netherlands

* Current Address: Department of Pediatrics, Maxima Medical Centre, Veldhoven, the Netherlands

* n.rutten@antoniusziekenhuis.nl



OPEN ACCESS

Citation: Rutten NBMM, Gorissen DMW, Eck A, Niers LEM, Vlieger AM, Besseling-van der Vaart I, et al. (2015) Long Term Development of Gut Microbiota Composition in Atopic Children: Impact of Probiotics. PLoS ONE 10(9): e0137681. doi:10.1371/journal.pone.0137681

Editor: Jan S Suchodolski, GI Lab, UNITED STATES

Received: April 28, 2015

Accepted: August 18, 2015

Published: September 17, 2015

Copyright: © 2015 Rutten et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: Files containing raw data including related metadata are available via Figshare: <http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.1520436>, <http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.1520435>, <http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.1520434>, <http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.1520433>.

Funding: This research was supported financially by the Netherlands Enterprise Agency (Agentschap NL), grant number FND06015, <http://english.rvo.nl/>. Employees of this agency did not play any role in study design, data collection and analysis, nor in preparation of the manuscript and decision to publish.

Abstract

Introduction

Imbalance of the human gut microbiota in early childhood is suggested as a risk factor for immune-mediated disorders such as allergies. With the objective to modulate the intestinal microbiota, probiotic supplementation during infancy has been used for prevention of allergic diseases in infants, with variable success. However, not much is known about the long-term consequences of neonatal use of probiotics on the microbiota composition. The aim of this study was to assess the composition and microbial diversity in stool samples of infants at high-risk for atopic disease, from birth onwards to six years of age, who were treated with probiotics or placebo during the first year of life.

Methods

In a double-blind, randomized, placebo-controlled trial, a probiotic mixture consisting of *B. bifidum* W23, *B. lactis* W52 and *Lc. Lactis* W58 (Ecologic® Panda) was administered to pregnant women during the last 6 weeks of pregnancy and to their offspring during the first year of life. During follow-up, faecal samples were collected from 99 children over a 6-year period with the following time points: first week, second week, first month, three months, first year, eighteen months, two years and six years. Bacterial profiling was performed by IS-pro. Differences in bacterial abundance and diversity were assessed by conventional statistics.

IB is an employee of Winclove Probiotics. Winclove Probiotics offers evidence based probiotic solutions for consumers, health professionals and business partners. This funder provided support in the form of salary for one author (IB) and did play a supportive role in the study design, as a public-private consortium of four parties (two hospitals and two companies) which together performed an innovative project entitled "Translational research to study the effect and mechanism of microbiota in paediatric immune-mediated diseases." The parties had a cooperation agreement in the context of the grant scheme Food & Nutrition Delta Phase 2 from SenterNovem (Agentschap NL, nowadays RVO). The current study was designed as part of the above mentioned innovative project, in consultation with all the participating parties. Winclove Probiotics did not have any additional role in data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The specific role of this author is articulated in the 'authors contributions' section.

Competing Interests: IB is an employee of Winclove Probiotics. This author has no direct or additional financial interest. AEB and PHS have proprietary rights on the IS-pro platform technology. The other authors have declared that no competing interests exist, as they didn't receive a honorarium, grant, or other form of payment to produce the manuscript. Involvement of this commercial affiliation does not alter the authors' adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials. The other authors have declared that no competing interests exist. They didn't receive honorariums, grants, or other forms of payment to produce the manuscript.

Results

The presence of the supplemented probiotic strains in faecal samples was confirmed, and the probiotic strains had a higher abundance and prevalence in the probiotic group during supplementation. Only minor and short term differences in composition of microbiota were found between the probiotic and placebo group and between children with or without atopy. The diversity of Bacteroidetes was significantly higher after two weeks in the placebo group, and at the age of two years atopic children had a significantly higher Proteobacteria diversity ($p < 0.05$). Gut microbiota development continued between two and six years, whereby microbiota composition at phylum level evolved more and more towards an adult-like configuration.

Conclusion

Perinatal supplementation with Ecologic[®] Panda, to children at high-risk for atopic disease, had minor effects on gut microbiota composition during the supplementation period. No long lasting differences were identified. Regardless of intervention or atopic disease status, children had a shared microbiota development over time determined by age that continued to develop between two and six years.

Introduction

The gastrointestinal tract is home to a diverse microbiota of about 10^{14} bacteria, representing up to 1500 bacterial species. The interaction between host and its microbiota contributes fundamentally to overall health.[1] Imbalance and disruptions of the human gut microbiota in infancy and early childhood have been suggested as a risk factor for a number of lifestyle-related and immune-mediated disorders such as atopic diseases, diabetes, obesity, necrotizing enterocolitis and inflammatory bowel disease.[2–6] The neonatal period is critical in terms of mucosal defence and immunologic priming and presence of aberrant gut bacteria during this time could therefore have profound effects on immune maturation.[2,3]

A reduction in overall diversity, a reduced abundance of commensal bacteria and an increased abundance of potentially pathogenic bacteria in the gut microbiota have been associated with the development of immune-mediated disorders later in life.[2,3,7] Data from observational studies are however conflicting, exemplified by a recent study showing more diverse microbiota in children with eczema [5] and with no clear allergy-promoting or allergy-protective taxa, as opposed to another study revealing that high diversity of total microbiota and high abundance of butyrate-producing bacteria are inversely associated with severity of atopic eczema.[8] Moreover, there is ongoing debate whether in allergy development an altered diversity of the gut microbiota is more important than the altered prevalence of particular bacterial species.[9]

Representative species and strains of lactobacilli and bifidobacteria have been used as probiotics, with the aim to colonize the infant's intestine and modulate the host's immune response.[10] Several studies have indeed shown benefits from treatment with probiotics in atopic children and thereby modulation of the infant's gut microbiota,[10–14] even by solely supplying mothers during late pregnancy.[15] Meta-analyses provide evidence in support of a moderate role of probiotics in the prevention of atopic dermatitis and IgE-associated atopic dermatitis in infants,[16] but more heterogeneous results are found for probiotics supplementation in the

treatment of eczema.[17] Strain-specificity and the role for timing of administering probiotics are of particular importance, since some studies did not show any beneficial effect on the prevention of eczema after supplementation with probiotics.[3,5,18–21] Therefore, it seems crucial to administer probiotic supplementation during pregnancy and at least in the first months of life to be able to reasonably evaluate the effects of this intervention on microbial colonisation of the gut and possible immunological effects.

The growing recognition of the role of gut microbiota in lifelong health and disease emphasizes the need of understanding the dynamics that lead to acquisition and colonization of intestinal microbiota. Moreover, it is important to study long-term effects of probiotic supplementation, both clinically and microbiologically. The aim of this study therefore was to assess the long-term effects of added probiotics on the composition and diversity of gut microbiota over time in infants at risk for atopic disease. Moreover, we aimed to investigate the differences in microbiota between children who did and did not develop atopic disease.

Methods

Participants and treatment

Subjects were part of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial (the Panda-study, registered at ClinicalTrials.gov, Identifier NCT00200954) addressing the effect of pre- and postnatal administration of selected probiotic bacteria in primary prevention of allergic disease. More detailed information about the participants, received treatments and (long-term) clinical results can be found in the supporting information (S1, S2 and S3 Files) and were described in our previous publications.[11,22] In short, all participating children had a positive family history of allergic disease (i.e. atopic eczema, food allergy, asthma or allergic rhinitis in either the mother plus an older sibling, or the father plus an older sibling with a history of allergic disease) and either received a probiotic mixture consisting of *Bifidobacterium bifidum* W23, *Bifidobacterium lactis* W52 and *Lactococcus lactis* W58 (Ecologic® Panda, Winclove Probiotics B. V., Amsterdam, the Netherlands) or placebo (the carrier of the probiotic mixture, containing rice starch and maltodextran) during their first year of life. Moreover, the probiotic mixture or placebo was prenatally administered to the mothers.

The intervention group received once daily $3 \cdot 10^9$ colony forming units (CFU) ($1 \cdot 10^9$ CFU of each strain) of freeze dried powder of the probiotic mixture. The control group received placebo consisting of the carrier of the probiotic product, i.e. rice starch and maltodextran. Both supplements were dispensed as a stable powder in identical individually packed sachets containing 3 g of material.

After the child's second birthday, the parents were informed about the nature of the treatment their child was exposed to. Subsequently, follow-up of the participants was continued in a single-blinded (investigator-blinded) design. When the child was approximately six years old, parents were asked to complete a follow-up visit during which clinical parameters were investigated. Parents were also asked to complete questionnaires evaluating symptoms in their child indicative of allergy.

The definition of allergy in the initial study[11] and at the age of six years[22] was made and led to the classification of 'atopic' versus 'non-atopic' in this follow-up study. Atopic children should have had at least one of the following between age 0 and 6:

- A positive doctor's diagnosis for eczema, asthma or allergic rhinitis
- Persistent sensitization to inhalant allergens and/or food allergens (>0.35 IU/ml allergen specific IgE antibodies)

Ethics statement

The study was approved by the Medical Ethics Committee of the University Medical Centre Utrecht, the Netherlands and has been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments. Written informed consent from the parents was obtained.

Stool sample collection

Parents collected stool samples of their child at different time points between birth and the child's sixth birthday. Samples of 8 time points in early life were used: one week (T1), two weeks (T2), one month (T3), three months (T4), one year (one week after the intervention was stopped) (T5), one and a half year (T6), two years (T7) and six years of age (T8).

Stool samples were collected from diapers or caught on a sheet, placed in stool collection vials and immediately frozen by the parents in their home freezers (-20°C). Frozen samples were transported on ice to the hospital at time of follow-up visits. Upon arrival, samples were immediately stored at -20°C until further analysis.

Isolation and identification of bacteria

To isolate DNA from faeces, a pea-sized faecal sample (100–400 mg) was placed in an Eppendorf container. Then, a 200 μl suspension was made in nucliSENS lysis buffer, as provided with the easyMAG, an automated system for total nucleic acid isolation (bioMérieux Clinical Diagnostics, Marcy l'Etoile, France). This suspension was vortexed for 1 minute, shaken for 5 minutes $\geq 1400\text{ rpm}$ and subsequently centrifuged at $14,000\text{ rpm}$ for 2 minutes. Supernatant (100 μl) was transferred to an 8-welled easyMAG container, as provided by the manufacturer, and 2 ml nucliSENS lysis buffer was added. After incubation at room temperature for $\geq 10\text{ min}$, 70 μl of magnetic silica beads was added, as provided with the easyMAG machine. Afterwards, the mixture was inserted in the easyMAG machine and the "specific A" protocol was chosen, selecting the off-board workflow and eluting DNA in 110 μl of buffer. Faecal DNA was diluted 10-fold before use in PCR. All DNA was stored at 4°C .

16S-23S IS profiling of gut microbiota

The technique for determination of bacterial species in faecal samples and monitoring of microbiota development over time, deviates of the description in the initial study protocol. PCR and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S ribosomal DNA genes together with Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) combined with flow cytometric analysis were performed at that time. In recent years however, the rapid development of sequencing techniques including the application of high-throughput methodology enables the analysis of hundreds of samples from different origins to conduct genetic audits of faecal material to a much greater depth than previously possible. Based on this, amplification of the interspace regions (IS-regions) was performed with the high-throughput bacterial profiling technique IS-pro (IS-diagnostics, Amsterdam, The Netherlands). This technique combines bacterial species differentiation by the length of the 16S-23S rRNA interspace region with instant taxonomic classification by phylum-specific fluorescent labeling of PCR-primers. The 16S-23S rRNA IS region is variable in size and sequence, making it well suitable for analysis of complex communities. The procedure consists of two multiplex PCRs, a combination of which provides very broad coverage for *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Fusobacteria* and *Verrucomicrobia* (AFFV), *Bacteroidetes* and *Proteobacteria*. For detailed information on the design of the used primers we refer to our previous publication.[23] Amplifications were carried out on a GeneAmp PCR

system 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Cycling conditions for PCR were 94°C for 4 min; 94°C for 30 s; 35 cycles of 56°C for 45 s; 72°C for 1 min, 72°C for 11 min and a final extension at 4°C. Each PCR mixture, with a final volume of 25 µl, contained 10 µl of buffered DNA, 1x superTaq buffer (Applied Biosystems), 200 µM deoxynucleoside triphosphate, 0.04% BSA, 1 U of superTaq (Applied Biosystems), and 0.13 µM of each of the 5 primers.

Data analysis

After pre-processing, which consisted of baseline correction and noise-filtering of data using a standardized 'rolling ball-algorithm' (IS-pro software suite, IS-diagnostics, Amsterdam, The Netherlands), each sample was represented by a microbial profile, consisting of color-labeled peaks. Each peak was characterized by a specific IS fragment (measured in number of nucleotides) and a color related to a specific phylum group. The intensity of peaks reflected the quantity of PCR product (measured in relative fluorescence units (RFU)). Each peak was designated as an operational taxonomic unit (OTU) and its corresponding intensity as abundance. Intensity values were log2 transformed in order to compact the range of variation in peak heights, to reduce the dominance of abundant peaks and to include less abundant species of the microbiota in downstream analyses. The cutoff level was set to <6 logRFU.[23] This transformation results in improved consistency of the estimated correlation coefficient, lower impact of inter-run variation, and improved detection of less prominent species. This conversion was used in all downstream analyses, such as calculating within-sample and between-sample microbial diversity. A clustered heat map was constructed by generating a correlation matrix based on cosine correlations of all log2 transformed profile data followed by clustering with the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA).[24]

Diversity analysis and discriminative features selection

Diversity was calculated using the Shannon index,[25] representing diversity per time point, and differences in this index were tested with Mann-Whitney *U* test. Dissimilarities between samples, or between-sample diversity, were calculated using the cosine distance measure between each pair of samples' profiles. Given two vectors of attributes (two profiles in our case), A and B, the cosine dissimilarity is represented using a dot product and magnitude as:

$$\text{dissimilarity} = 1 - \cos(\theta) = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n A_i \times B_i}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (A_i)^2} \times \sqrt{\sum_{i=1}^n (B_i)^2}}$$

Principal coordinate analysis (PCoA), to explore similarities between groups, was calculated based on the cosine distance matrix.

Discriminative OTUs between the groups were detected by LEfSe[26] with α parameter for pairwise tests set to 0.05 and the threshold on the logarithmic score of linear discriminant analysis (LDA) set to 2.

Diversity analysis was performed using the vegan software package in R (Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) and SPSS (SPSS for Mac release 22.0; SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Differences were considered to be significant for $p < 0.05$.

Results

From the 123 participants evaluated in the initial PandA-study, 108 fully completed the initial prenatal intervention and 98 fully completed the initial postnatal intervention (until two years of age). 102 consented to be contacted for follow-up and a total of 83 participants were willing to participate in the follow-up study at the age of six years. Reasons for not willing to

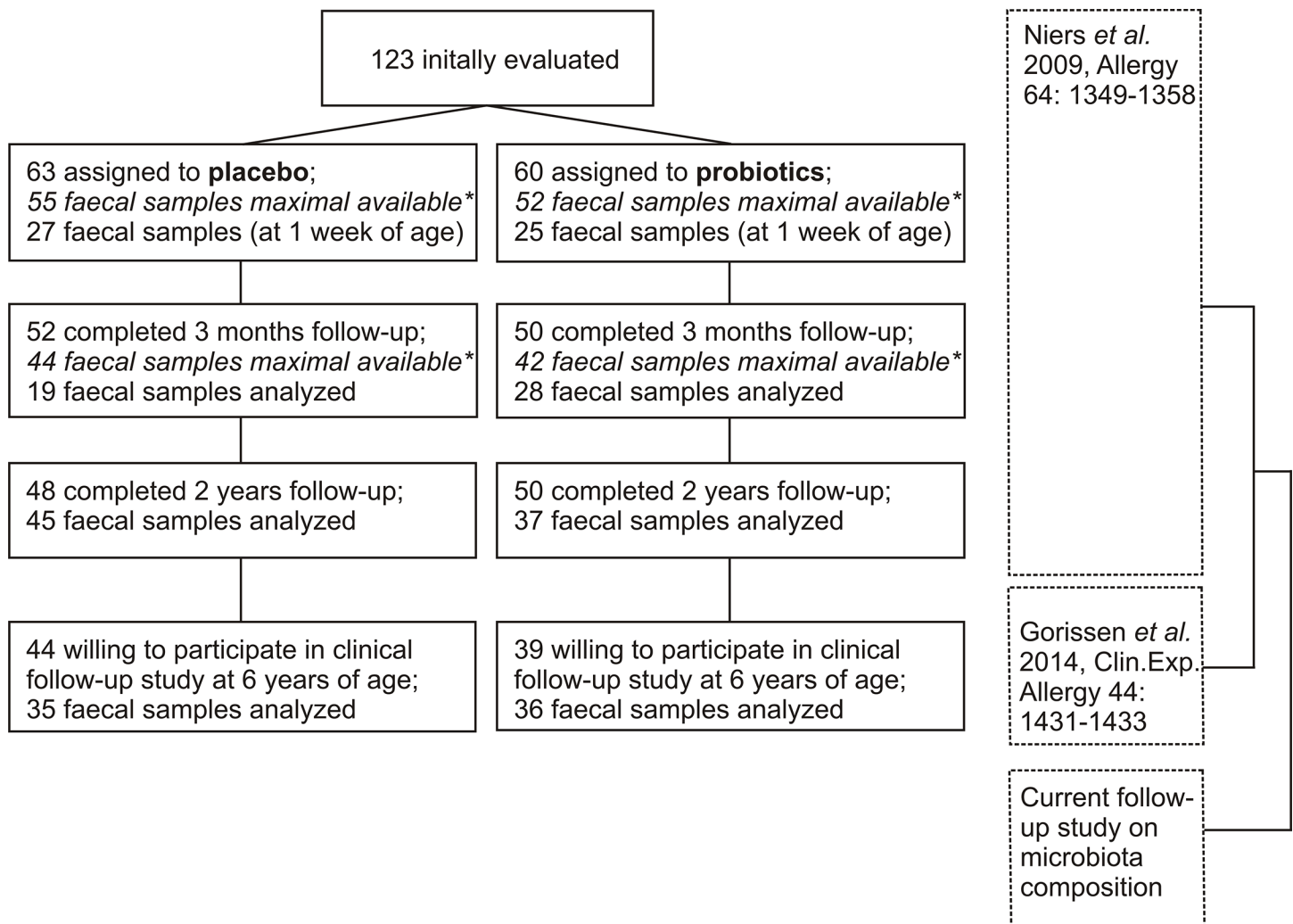


Fig 1. Overview of the inclusion of subjects in the initial PandA study and follow-up phases, including the number of faecal samples per time point. stool samples of eight randomly chosen participants from the placebo and intervention group at seven different time points, including those of one week and three months of age, were analyzed in the initial PandA study.

doi:10.1371/journal.pone.0137681.g001

participate primarily were lack of time or priority. Clinical data of this follow-up study have been published previously.[22] In short, administration of the selected combination of probiotics did demonstrate a beneficial effect on the development of eczema up to the age of two years. This preventive effect was established within the first 3 months of life (12% parental reported eczema in the probiotics group vs 29% in the placebo group).[11] No differences were observed in respiratory symptoms indicative for asthma or allergic rhinitis at the age of 2 years. The beneficial effect on development of eczema did not extend to the age of 6 years and did not lead to primary prevention of asthma.[22] Comparison of baseline characteristics of the initial group to those of this follow-up group did not indicate selection bias due to selective drop-out. In total, of 99 children a stool sample at one or more different time points during the complete study period could be collected (until six years of age). A flow diagram of the initial clinical trial and follow-up studies is represented in (Fig 1). It also shows how this follow-up study relates to the previous studies. Relatively low percentages of subjects with faecal samples at early time points are due to the hectic postpartum period (one week of age) and previous

analyses (in the original Panda study) that decreased the number of samples maximal available for the first five time points. The distribution of number of samples per time point, subdivided in probiotic/placebo and atopic/non-atopic groups, are shown in [Table 1](#).

Gut microbiota migration over time

First, we looked for general features of the development of gut microbiota composition between 0 and 6 years of age. The microbiota development was highly associated with age, as shown in [Fig 2](#). Samples are most heterogeneous at early age and from there follow a more or less conserved vector towards a fairly homogeneous cluster at the age of six. Stability of the microbial community on phylum level was investigated by calculating average cosine distances for each phylum between two subsequent time points. [Fig 3](#) gives a depiction of community stability over time and underlines that the largest variations in microbiota composition occur very early in life. Moreover, it can be seen that *Bacteroidetes* populations stabilize between one and two years of age, and variations clearly decrease from two years of age.

Effect of probiotic supplementation on gut microbiota composition

Probiotic versus placebo group. Secondly, we investigated whether the probiotic product, containing *Bifidobacterium bifidum* W23, *Bifidobacterium lactis* W52, and *Lactococcus lactis* W58 could be detected in the faecal samples. Indeed, the presence of the supplied product was confirmed. IS-pro could not discriminate between the two *Bifidobacterium* strains, since both gave a partially overlapping microbial profile.

At time of supplementation (T1-T5) the probiotic species had a higher abundance and prevalence in the probiotic group, whilst after stopping (T6-T8) prevalence was comparable between the two groups. [Fig 4](#) shows the relative abundances per time point for the *Bifidobacterium* strains and *Lactococcus* strain. Bifidobacteria were significantly higher in the probiotic group at one month of age (T3, $p = 0.003$) and *Lactococcus lactis* was significantly higher at two weeks of age (T2, $p = 0.001$), and one month of age (T3, $p = 0.03$). Moreover, *Lactococcus lactis* was substantially absent in the placebo group during the intervention period and had a significantly higher abundance at the age of two years in this group (T7, $p = 0.01$).

Subsequently, we searched for potential effects of the intervention on microbiota composition at the species or genus level. By using LEfSe, [26] a method designed to explain differences between microbial communities, no bacterial species or genus that were significantly different between the treatment groups could be identified.

Table 1. Number of samples per time point per group (n, %).

Time point	Placebo		Probiotic	
	Atopic	Non-atopic	Atopic	Non-atopic
(T1) One week, $n = 52$	16 (30.8%)	11 (21.2%)	15 (28.8%)	10 (19.2%)
(T2) Two weeks, $n = 39$	9 (23.2%)	10 (25.6%)	10 (25.6%)	10 (25.6%)
(T3) One month, $n = 42$	9 (21.4%)	8 (19.1%)	14 (33.3%)	11 (26.2%)
(T4) Three months, $n = 47$	11 (23.4%)	8 (17.0%)	19 (40.5%)	9 (19.1%)
(T5) One year, $n = 63$	17 (27.0%)	13 (20.6%)	21 (33.4%)	12 (19.0%)
(T6) One and a half year, $n = 69$	23 (33.3%)	13 (18.9%)	22 (31.9%)	11 (15.9%)
(T7) Two years, $n = 82$	30 (36.6%)	15 (18.3%)	26 (31.7%)	11 (13.4%)
(T8) Six years, $n = 71$	24 (33.8%)	11 (15.5%)	24 (33.8%)	12 (16.9%)

T = time point

doi:10.1371/journal.pone.0137681.t001

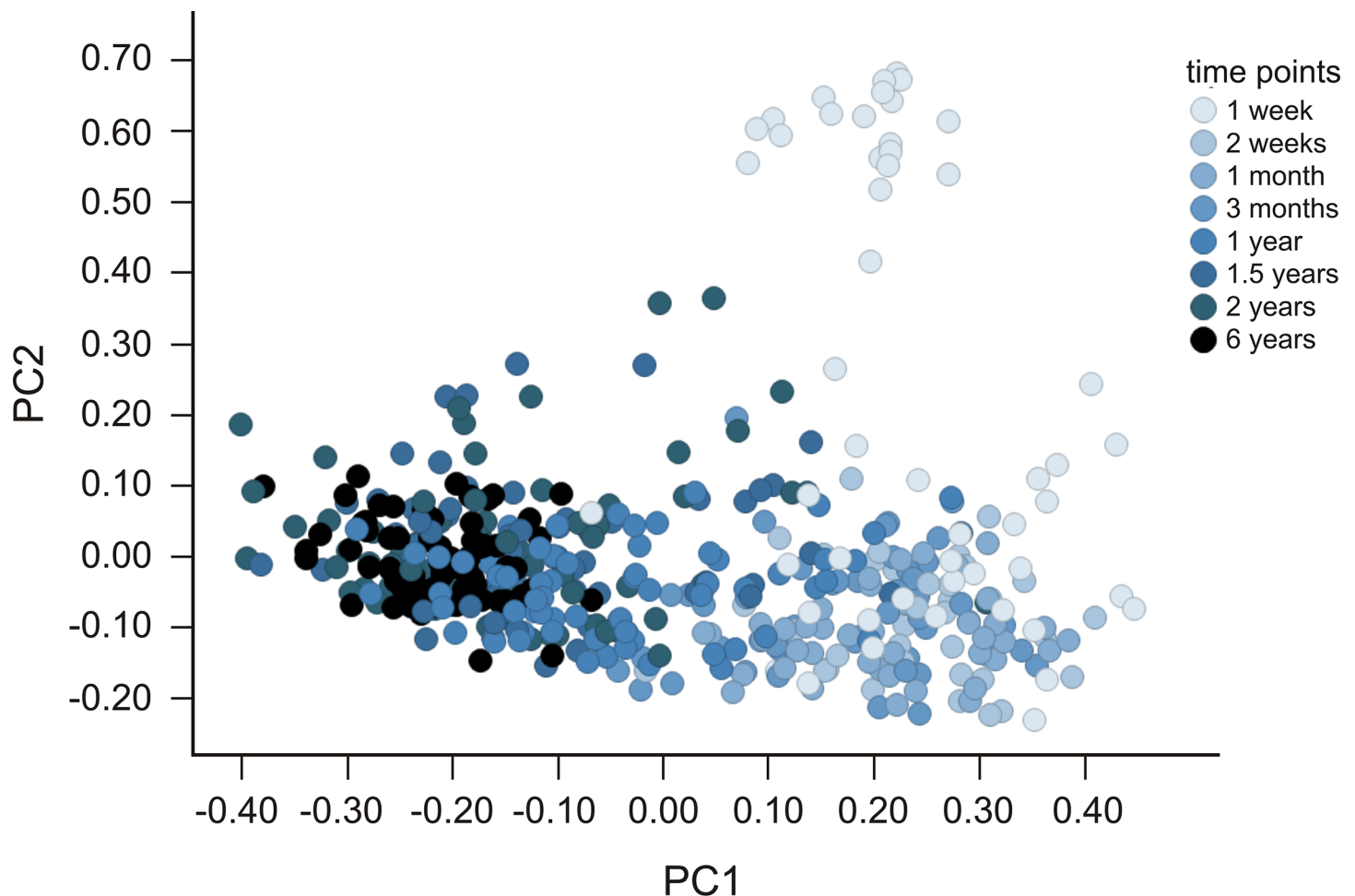


Fig 2. Principle coordinate analysis (PCoA) scatterplot to express gut microbiota development over time (T1-T8), all phyla combined, in the study population. Smaller inter-individual distances indicate more similar microbiota composition. Colour intensity (light to dark) reflects the age of a child at which the sample was taken.

doi:10.1371/journal.pone.0137681.g002

At phylum level, there were no major differences between the probiotic and placebo group according to microbiota diversity (of *Bacteroidetes*, *Firmicutes* and *Proteobacteria*), except at the age of two weeks where the diversity of *Bacteroidetes* and *Proteobacteria* in the placebo group was higher (T2, $p < 0.05$) compared to the probiotic group (Fig 5A). Relative abundances per phylum in the probiotic group and placebo group, that show the similar pattern compared with diversity, are shown in S1 Fig.

Atopic versus non-atopic group. As described above, no major differences between the probiotic and placebo group could be identified according to microbiota diversity. The design of the study also allowed us to study potential differences in gut microbiota development in children who did and did not develop atopy in early life. Fig 5B shows diversity per phylum in the atopic and non-atopic groups. Diversity of all three phyla increased over time and no significant differences were found between the atopic and non-atopic group, except at the age of two years when atopic children had a significantly higher *Proteobacteria* diversity (T7, $p < 0.001$, Mann-Whitney U-test).

The relative abundance of the phyla *Firmicutes* and *Bacteroidetes* generally increased over time and followed a similar trend at all time points in the atopic and non-atopic group; no

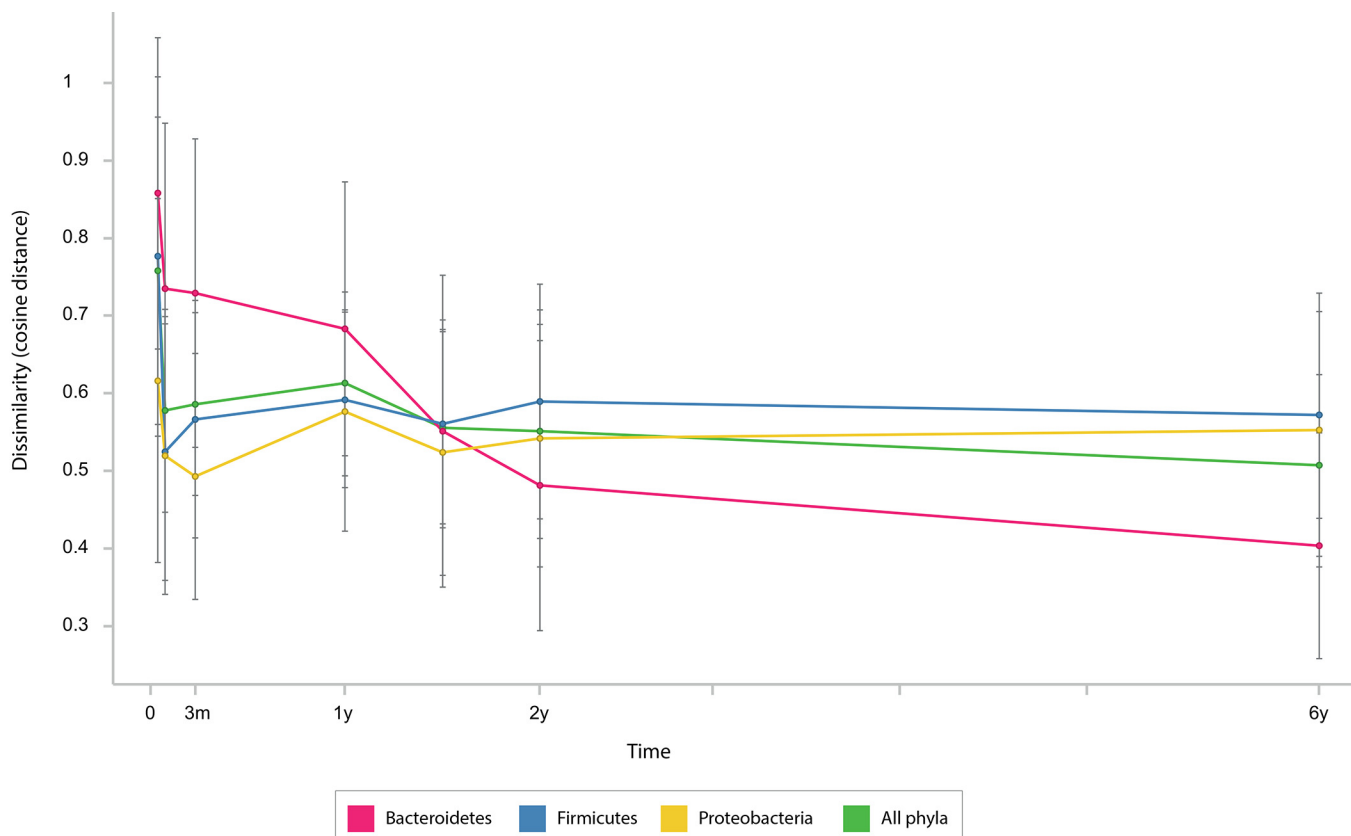


Fig 3. Microbiota stability over time. Depicted are average cosine distances (y-axis) between two subsequent time points (x-axis) for each phylum and all phyla combined.

doi:10.1371/journal.pone.0137681.g003

statistical differences were found (S1 Fig). As *Proteobacteria* are amplified in a separate PCR reaction, their relative abundance could not be quantified together with the other two phyla. But in accordance with *Bacteroidetes* and *Firmicutes*, relative abundance of *Proteobacteria* increased over time.

At species or genus level, differences between the microbial community in the atopic and non-atopic group was tested using LEfSe, [26] but no discriminative bacterial species that were significantly different between the disease groups, could be identified.

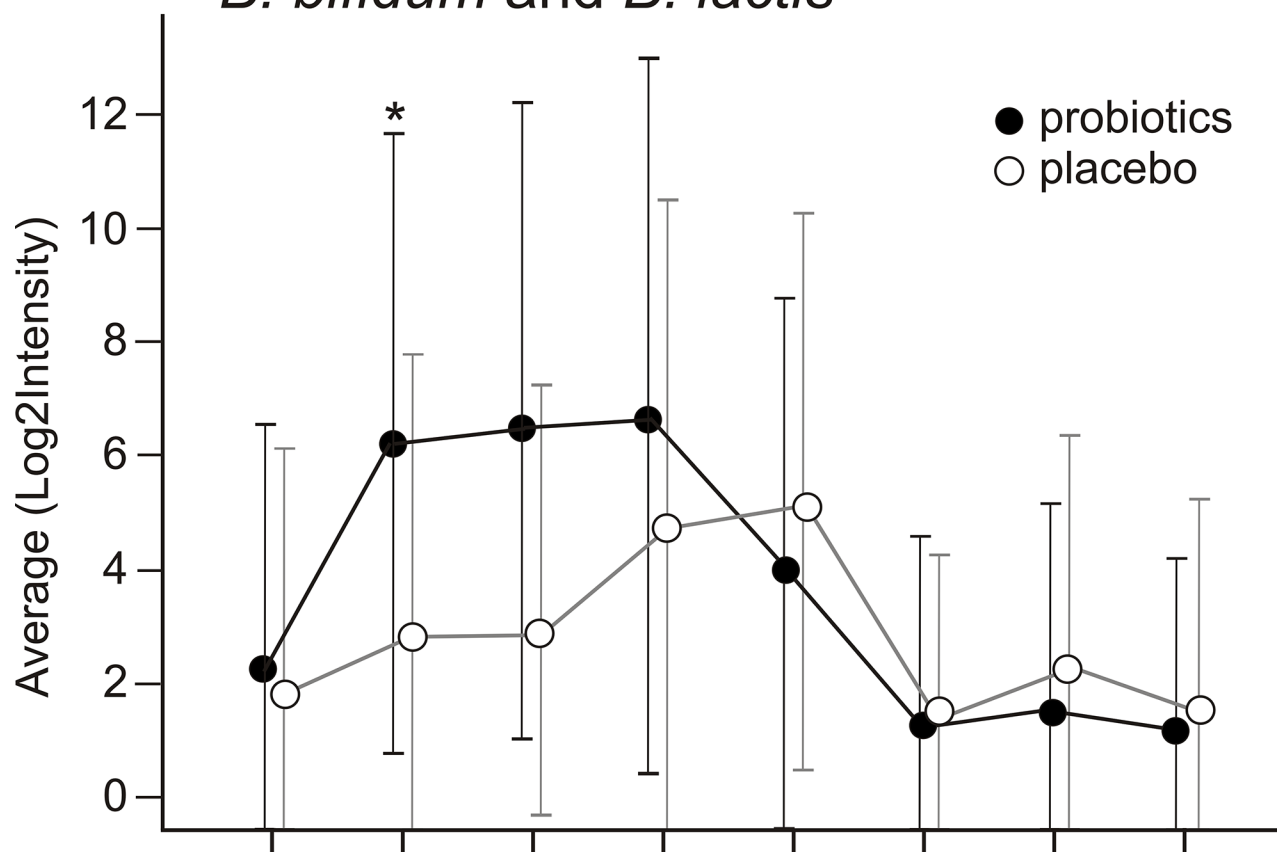
Effects of probiotic intervention or disease status over age

Finally, we investigated the development of microbiota composition over age depending on the intervention or a child's atopic disease status. A similar development of a stable, robust microbiota composition over time was found in all subgroups, and therefore was not associated with later development of atopic disease or influenced by supplementation with probiotics (Fig 6).

Discussion and Conclusion

In this study the long-term development of gut microbiota was investigated in infants at high-risk for atopic disease, who were supplemented with probiotics or placebo during the first year of life. Follow-up ended at the age of six years. Our data suggest that, regardless of intervention or atopic disease status, children develop a stable, converging gut microbiota during their first years of life. Age was the major driver of microbiota composition, overriding the differences

B. bifidum and *B. lactis*



L. lactis

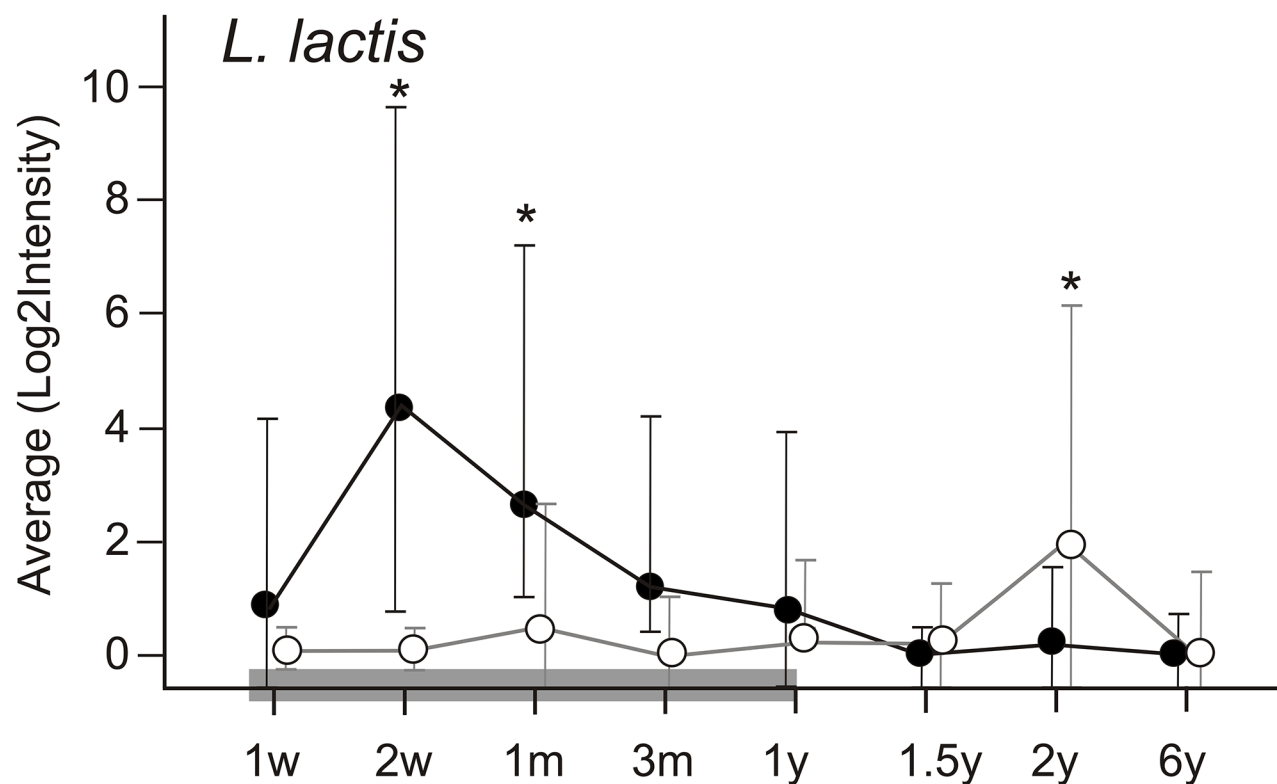


Fig 4. Relative abundance (y-axis) per time point (x-axis) of the probiotic strains *B. Bifidum*/*B. Lactis* and *L. Lactis* (dots) and error bars. Marked bar on the x-axis indicates intervention period. * = significant different time points.

doi:10.1371/journal.pone.0137681.g004

based on intervention or development of atopic disease and the gut microbiome development is suggested to continue between 2 and 6 years of age.

In line with this finding, intestinal microbiota development is currently thought to stabilize by the end of the first year of life and the composition considered to resemble the adult gastrointestinal tract by the age of 2 to 2.5 years. [6,27–29] Koenig *et al.* [29] showed that the qualitative measures of diversity responded to time, but the quantitative measures (such as abundance) responded to life events (illnesses, dietary changes, antibiotic treatment). Yatsunenko *et al.* [30] described an adult-like configuration within a three-year period after birth

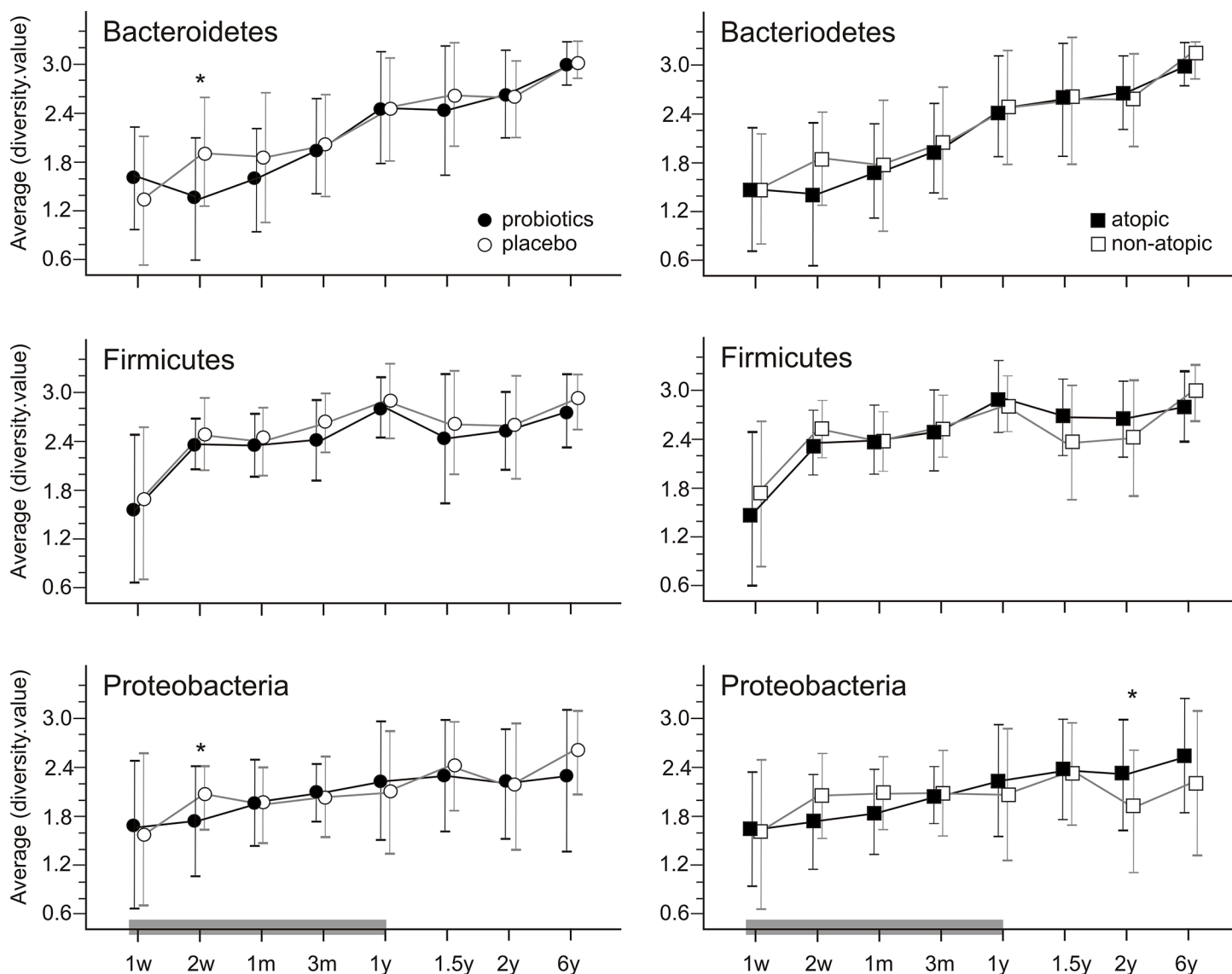


Fig 5. Diversity index (Shannon, y-axis) of the phyla *Bacteroidetes*, *Firmicutes* and *Proteobacteria* per time point (x-axis) for probiotics versus placebo group (A) and atopic versus non-atopic group (B) (dots, with error bars). Marked bar on the x-axis indicates intervention period. * = significant different time points.

doi:10.1371/journal.pone.0137681.g005

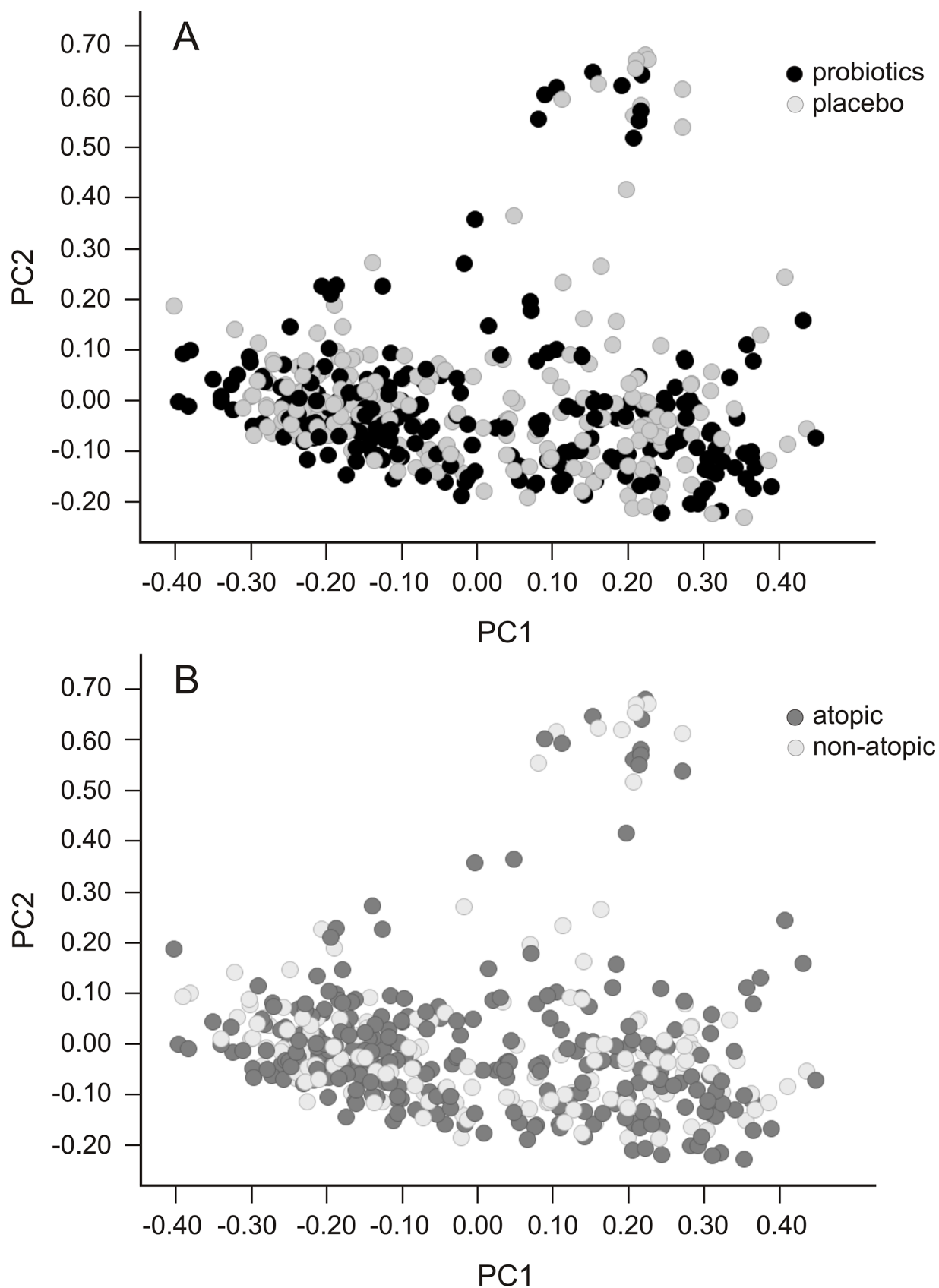


Fig 6. (Principle coordinate analysis) PCoA representing gut microbiota development. Samples are grouped by intervention (A) and disease (B). Dots represent microbiota composition (all phyla combined) per individual per time point.

doi:10.1371/journal.pone.0137681.g006

and showed some differences in clustering between very young children and adults. Results of Ringel-Kulka *et al.* [4] extend this difference (by describing significant differences in diversity between the group of 3–4 years old children and adults) and indicate that the microbiota has not yet reached the climax of bacterial diversity at the age of 4 years. The authors suggest that the evolvement into adult-like microbiota continues beyond 3 years of age. Our data support the last suggestion as the gut microbiome development seemed to continue between 2 and 6 years of age, though a specific time point for microbiome stabilization could not be indicated.

The presence of probiotic strains in stool samples was confirmed during supplementation. The fact that *Lactococcus lactis* was substantially absent in the placebo group during the intervention period is not surprising as the *Lactococcus* genus is not considered a commensal in infants. There was however a significantly higher presence and abundance of *Lactococcus lactis* at the age of two years (T7) in the placebo group compared to the probiotic group (9/45 versus 1/37) as we specifically analysed the presence of this strain being part of the supplied probiotic product. This difference can be caused by the introduction of solid food and the variability of the children's diet at this age, because *Lactococcus lactis* is a well-known ingredient of butter-milk and cheese. When analysing the prevalence of *Lc. lactis* at the age of two years in more detail, there was a tendency towards a higher prevalence in the atopic children within the placebo group (7/45) when compared to the non-atopic ones (2/45). This difference was however not significant after correction for multiple testing.

At the age of two weeks (T2) the diversity of Bacteroidetes was significantly higher in the placebo group compared to the probiotic group, a finding also described by Enomoto *et al.* [14] at the age of four months. This could suggest that probiotics suppress the acquisition of genera belonging to the phylum Bacteroidetes. Hypothetically, this could cause relevant disturbances on gut microbial patterns over time and have effects on clinical outcomes, since lower diversity of the phylum Bacteroidetes has been related to increased risk of asthma and atopic sensitization. [5,31] However, clinical results of the present study showed significantly lower eczema during the first 3 months of life in the intervention group compared with placebo, which does not point towards a predisposing role for the development of asthma and atopy in our population. Moreover, the difference demonstrated here seems to be without long-term consequences as microbiota composition of placebo and probiotic children showed no significant differences anymore during follow-up.

In this study no evident long-term consequences of probiotic supplementation on microbiota composition were found, as the abundance of probiotic strains decreased after the intervention and effects on diversity and abundance disappeared afterwards. Our results are in line with those described by Nylund *et al.* [5] who showed that *Lactobacillus rhamnosus* GG supplementation during the first 6 months of life, in children with and without eczema, had only minor long-term effect on the microbiota composition. Enomoto *et al.* [14] also demonstrated limited changes in the composition of faecal microbiota after bifidobacteria supplementation during the first six months of life to healthy infants.

The exact in vivo mechanism of action of probiotics in shaping the immune response still needs to be determined and a number of unanswered questions remain regarding how probiotics mediate their clinical effects. The intestinal microbiome may contribute to the pathogenesis of allergic diseases due to its substantial effect on mucosal immunity. A probiotic may have a direct interaction with the ecosystem within the gut lumen by providing enzymatic activities

that cause metabolic effects, it can interact with the gut lumen mucus and epithelium, and may be signaling the host to other organs beyond the gut.[32]

The design of the present study allowed us also to study potential differences in gut microbiota development in children who did and did not develop atopy. Variations in early gut colonization have been associated with the development of atopic disease. Results have, however, been highly variable across studies. Wang *et al.*[7] examined overall patterns of faecal microbial colonization in healthy and atopic infants and found that infants who developed eczema had significantly lower faecal bacterial diversity at 1 week of age. Others have confirmed that reduced gut microbial diversity in early life was associated with an increased risk of eczema [9,33] and multiple differences in specific bacterial groups result in microbiota profiles that are significantly distinct between healthy and eczematous infants.[5]

Johansson *et al.* showed that the kinetics of colonization postnatally seemed to differ generally in non-allergic children compared to allergic children, with a delayed colonization in early infancy in the allergic group. At 12 months of age however, the groups of children were similar in the frequencies of the different species investigated. Bisgaard *et al.*[2] described a population of high-risk infants comparable to the present study and showed an association between reduced bacterial diversity of the infant's intestinal microbiota with increased risk of allergic sensitization, allergic rhinitis and peripheral blood eosinophilia, but not asthma or atopic dermatitis, in the first 6 years of life.

In contrast to the above findings, in our study, abundance and diversity were the same over time in atopic and non-atopic children though small differences were seen. This is in accordance with a prospective study from 3 European birth cohorts that also found no differences in gut microbiota among infants developing or not developing atopic eczema and food allergy. [34]

Differences in findings between all these studies, including ours, may reflect differences in methods used for investigating the faecal microbiota or even differences in defining atopy. Our study does endorse the importance of the gut microbiota composition in early life, because of the beneficial clinical effect of probiotics on eczema,[11] but besides effects on gut microbiota composition during the intervention, no long lasting differences could be identified. In this respect, recent data point towards a major role for short chain fatty acids production, especially butyrate, in regulation of development of mucosal regulatory T cells. Therefore, next to the 16S-23S rRNA gene analysis, as performed in this study, microbial metagenomics (whole genome shotgun sequencing) could further expand the understanding of gut microbiota development and composition and microbial metabolomics may reveal mechanisms by which gut microbiota interacts with the human host.[35,36]

In conclusion, supplementation with a probiotic mixture consisting of *B. bifidum* W23, *B. lactis* W52 and *Lc. Lactis* W58 to children at high-risk for atopic disease had only minor effects on gut microbiota composition. Future studies should identify the functional activities of the gut microbiota, but also further elucidate the working mechanisms of probiotics, to illustrate host and microbiota interactions and identify optimal timing and duration of probiotic supplementation as strategy for prevention of allergic diseases.

Supporting Information

S1 Fig. Average abundances of the phyla *Bacteroidetes*, *Firmicutes* and *Proteobacteria* per time point (x-axis) for probiotics versus placebo group and atopic versus non-atopic group (dots/squares, with error bars). (EPS)

S1 File. Study protocol PandA study (Dutch).
(PDF)

S2 File. English summary study protocol PandA study.
(PDF)

S3 File. Study protocol PandA follow-up study.
(PDF)

Acknowledgments

We would like to thank all study participants and their parents. We also would like to thank Malieka Van der Lugt—Degen for her excellent help with sample processing in the laboratory.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: DMG LEN AMV IB CKE GTR. Performed the experiments: NBR. Analyzed the data: NBR LEN AE AEB. Contributed reagents/materials/analysis tools: AE AEB PHS. Wrote the paper: NBR DMG AE AMV CKE GTR. Acquisition of data: NBR DMG LEN.

References

1. Makino H, Kushiro A, Ishikawa E, Kubota H, Gawad A, Sakai T, et al. Mother-to-infant transmission of intestinal bifidobacterial strains has an impact on the early development of vaginally delivered infant's microbiota. *PLoS One*. 2013; 8: e78331. doi: [10.1371/journal.pone.0078331](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078331) PMID: [24244304](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24244304/)
2. Bisgaard H, Li N, Bonnelykke K, Chawes BLK, Skov T, Paludan-Müller G, et al. Reduced diversity of the intestinal microbiota during infancy is associated with increased risk of allergic disease at school age. *J Allergy Clin Immunol*. 2011; 128: 646–52.e1–5. doi: [10.1016/j.jaci.2011.04.060](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.04.060) PMID: [21782228](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21782228/)
3. Li M, Wang M, Donovan SM. Early development of the gut microbiome and immune-mediated childhood disorders. *Semin Reprod Med*. 2014; 32: 74–86. doi: [10.1055/s-0033-1361825](https://doi.org/10.1055/s-0033-1361825) PMID: [24390924](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24390924/)
4. Ringel-Kulka T, Cheng J, Ringel Y, Salojärvi J, Carroll I, Palva A, et al. Intestinal microbiota in healthy U.S. young children and adults—a high throughput microarray analysis. *PLoS One*. 2013; 8: e64315. doi: [10.1371/journal.pone.0064315](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064315) PMID: [23717595](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23717595/)
5. Nylund L, Satokari R, Nikkilä J, Rajilić-Stojanović M, Kalliomäki M, Isolauri E, et al. Microarray analysis reveals marked intestinal microbiota aberrancy in infants having eczema compared to healthy children in at-risk for atopic disease. *BMC Microbiol*. 2013; 13: 12. doi: [10.1186/1471-2180-13-12](https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-12) PMID: [23339708](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23339708/)
6. Fouhy F, Ross RP, Fitzgerald G, Stanton C, Cotter PD, Food E, et al. Knowledge, knowledge gaps and the use of high-throughput sequencing to address these gaps © 2012 Landes Bioscience. 2012; 203–220.
7. Wang M, Karlsson C, Olsson C, Adlerberth I, Wold AE, Strachan DP, et al. Reduced diversity in the early fecal microbiota of infants with atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol*. 2008; 121: 129–34. doi: [10.1016/j.jaci.2007.09.011](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.09.011) PMID: [18028995](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18028995/)
8. Nylund L, Nermes M, Isolauri E, Salminen S, de Vos WM, Satokari R. Severity of atopic disease inversely correlates with intestinal microbiota diversity and butyrate-producing bacteria. *Allergy*. 2014; 70: 241–244. doi: [10.1111/all.12549](https://doi.org/10.1111/all.12549)
9. Abrahamsson TR, Jakobsson HE, Andersson AF, Björkstén B, Engstrand L, Jenmalm MC. Low diversity of the gut microbiota in infants with atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol*. 2012; 129: 434–40, 440.e1–2. doi: [10.1016/j.jaci.2011.10.025](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.10.025) PMID: [22153774](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22153774/)
10. Kirjavainen P V, Arvola T, Salminen SJ, Isolauri E. Aberrant composition of gut microbiota of allergic infants: a target of bifidobacterial therapy at weaning? *Gut*. 2002; 51: 51–5. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1773282&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. PMID: [12077091](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12077091/)
11. Niers L, Martín R, Rijkers G, Sengers F, Timmerman H, van Uden N, et al. The effects of selected probiotic strains on the development of eczema (the PandA study). *Allergy*. 2009; 64: 1349–58. doi: [10.1111/j.1398-9995.2009.02021.x](https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2009.02021.x) PMID: [19392993](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19392993/)

12. Cox MJ, Huang YJ, Fujimura KE, Liu JT, McKean M, Boushey H a, et al. Lactobacillus casei abundance is associated with profound shifts in the infant gut microbiome. PLoS One. 2010; 5: e8745. doi: [10.1371/journal.pone.0008745](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008745) PMID: [20090909](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20090909/)
13. Nermes M, Kantele JM, Atosuo TJ, Salminen S, Isolauri E. Interaction of orally administered Lactobacillus rhamnosus GG with skin and gut microbiota and humoral immunity in infants with atopic dermatitis. Clin Exp Allergy. 2011; 41: 370–7. doi: [10.1111/j.1365-2222.2010.03657.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2010.03657.x) PMID: [21121981](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21121981/)
14. Enomoto T, Sowa M, Nishimori K, Shimazu S, Yoshida A, Yamada K, et al. Effects of bifidobacterial supplementation to pregnant women and infants in the prevention of allergy development in infants and on fecal microbiota. Allergol Int. 2014; 63: 575–85. doi: [10.2332/allergolint.13-OA-0683](https://doi.org/10.2332/allergolint.13-OA-0683) PMID: [25056226](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25056226/)
15. Lahtinen SJ, Boyle RJ, Kivivuori S, Oppedisano F, Smith KR, Robins-Browne R, et al. Prenatal probiotic administration can influence Bifidobacterium microbiota development in infants at high risk of allergy. J Allergy Clin Immunol. 2009; 123: 499–501. doi: [10.1016/j.jaci.2008.11.034](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.11.034) PMID: [19135234](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19135234/)
16. Pelucchi C, Chatenoud L, Turati F, Galeone C, Moja L, Bach J- F, et al. Probiotics supplementation during pregnancy or infancy for the prevention of atopic dermatitis: a meta-analysis. Epidemiology. 2012; 23: 402–14. doi: [10.1097/EDE.0b013e31824d5da2](https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e31824d5da2) PMID: [22441545](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22441545/)
17. Boyle RJ, Bath-Hextall FJ, Leonardi-Bee J, Murrell DF, Tang MLK. Probiotics for treating eczema. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2008. doi: [10.1002/14651858.CD006135.pub2](https://doi.org/10.1002/14651858.CD006135.pub2)
18. Boyle RJ, Tang MLK. The Role of Probiotics in the Management of Allergic Disease Clinical and Experimental Allergy. 2006; 568–576. PMID: [16650040](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16650040/)
19. Elazab N, Mendy A, Gasana J, Vieira ER, Quizon A, Forno E. Probiotic administration in early life, atopy, and asthma: a meta-analysis of clinical trials. Pediatrics. 2013; 132: e666–76. doi: [10.1542/peds.2013-0246](https://doi.org/10.1542/peds.2013-0246) PMID: [23958764](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23958764/)
20. Bezirtzoglou E, Stavropoulou E. Immunology and probiotic impact of the newborn and young children intestinal microflora. Anaerobe. Elsevier Ltd; 2011; 17: 369–74. doi: [10.1016/j.anaerobe.2011.03.010](https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.03.010) PMID: [21515397](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21515397/)
21. Osborn DA, Sinn JKH. Probiotics in infants for prevention of allergic disease and food hypersensitivity (Review). Cochrane Database Syst Rev. 2007; Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17943912>.
22. Gorissen DMW, Rutten NBMM, Oostermeijer CMJ, Niers LEM, Hoekstra MO, Rijkers GT, et al. Preventive effects of selected probiotic strains on the development of asthma and allergic rhinitis in childhood. The Panda-study. Clin Exp Allergy. 2014; doi: [10.1111/cea.12413](https://doi.org/10.1111/cea.12413)
23. Budding a E, Grasman ME, Lin F, Bogaards J a, Soeltan-Kaersenhout DJ, Vandenbroucke-Grauls CMJE, et al. IS-pro: high-throughput molecular fingerprinting of the intestinal microbiota. FASEB J. 2010; 24: 4556–64. doi: [10.1096/fj.10-156190](https://doi.org/10.1096/fj.10-156190) PMID: [20643909](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20643909/)
24. D'Haeseleer P. How does gene expression clustering work? Nat Biotechnol. 2005; 23: 1499–501. doi: [10.1038/nbt1205-1499](https://doi.org/10.1038/nbt1205-1499) PMID: [16333293](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16333293/)
25. Haegeman B, Hamelin J, Moriarty J, Neal P, Dushoff J, Weitz JS. Robust estimation of microbial diversity in theory and in practice. ISME J. 2013; 7: 1092–101. doi: [10.1038/ismej.2013.10](https://doi.org/10.1038/ismej.2013.10) PMID: [23407313](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23407313/)
26. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. Genome Biol. BioMed Central Ltd; 2011; 12: R60. doi: [10.1186/gb-2011-12-6-r60](https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60) PMID: [21702898](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21702898/)
27. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman D a, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. PLoS Biol. 2007; 5: e177. doi: [10.1371/journal.pbio.0050177](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050177) PMID: [17594176](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17594176/)
28. Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. Cell. Elsevier Inc.; 2012; 148: 1258–70. doi: [10.1016/j.cell.2012.01.035](https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.035) PMID: [22424233](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22424233/)
29. Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, et al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011; 108 Suppl: 4578–85. doi: [10.1073/pnas.1000081107](https://doi.org/10.1073/pnas.1000081107) PMID: [20668239](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20668239/)
30. Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. Nature. 2012; 486: 222–7. doi: [10.1038/nature11053](https://doi.org/10.1038/nature11053) PMID: [22699611](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22699611/)
31. Kolokotroni O, Middleton N, Gavatha M, Lamnisos D, Priftis KN, Yiallourous PK. Asthma and atopy in children born by caesarean section: effect modification by family history of allergies—a population based cross-sectional study. BMC Pediatr. 2012; 12: 179. doi: [10.1186/1471-2431-12-179](https://doi.org/10.1186/1471-2431-12-179) PMID: [23153011](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23153011/)

32. Kalliomäki M, Antoine J-M, Herz U, Rijkers GT, Wells JM, Mercenier A. Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: prevention and management of allergic diseases by probiotics. *J Nutr.* 2010; 140: 713S–21S. doi: [10.3945/jn.109.113761](https://doi.org/10.3945/jn.109.113761) PMID: [20130079](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20130079/)
33. Ismail IH, Oppedisano F, Joseph SJ, Boyle RJ, Licciardi P V, Robins-Browne RM, et al. Reduced gut microbial diversity in early life is associated with later development of eczema but not atopy in high-risk infants. *Pediatr Allergy Immunol.* 2012; 23: 674–81. doi: [10.1111/j.1399-3038.2012.01328.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2012.01328.x) PMID: [22831283](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22831283/)
34. Adlerberth I, Strachan DP, Matricardi PM, Ahm  S, Orfei L, Aberg N, et al. Gut microbiota and development of atopic eczema in 3 European birth cohorts. *J Allergy Clin Immunol.* 2007; 120: 343–50. doi: [10.1016/j.jaci.2007.05.018](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.05.018) PMID: [17604093](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17604093/)
35. Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikiy S, van der Veeken J, deRoos P, et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature.* 2013; 504: 451–5. doi: [10.1038/nature12726](https://doi.org/10.1038/nature12726) PMID: [24226773](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24226773/)
36. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature.* 2013; 504: 446–50. doi: [10.1038/nature12721](https://doi.org/10.1038/nature12721) PMID: [24226770](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24226770/)

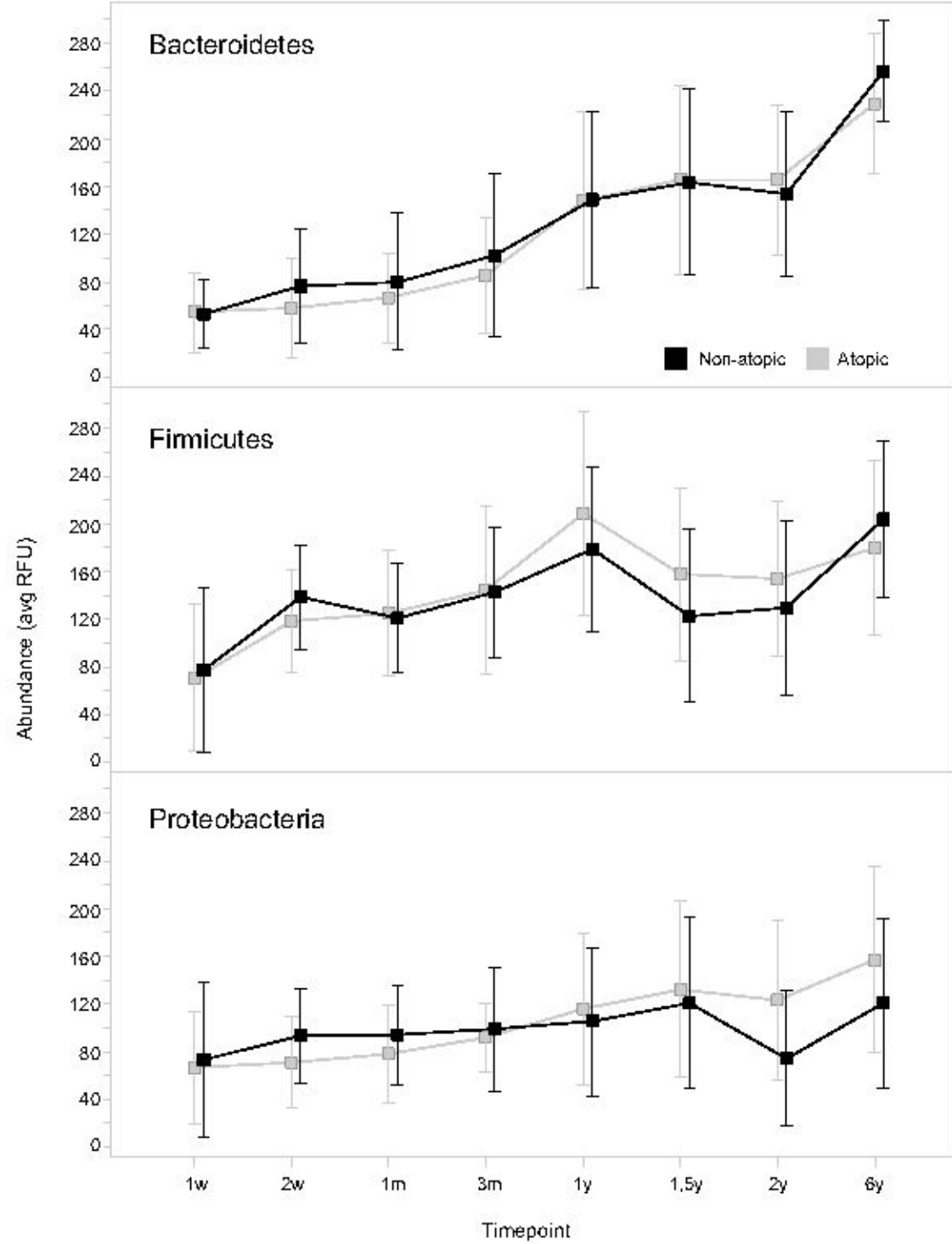
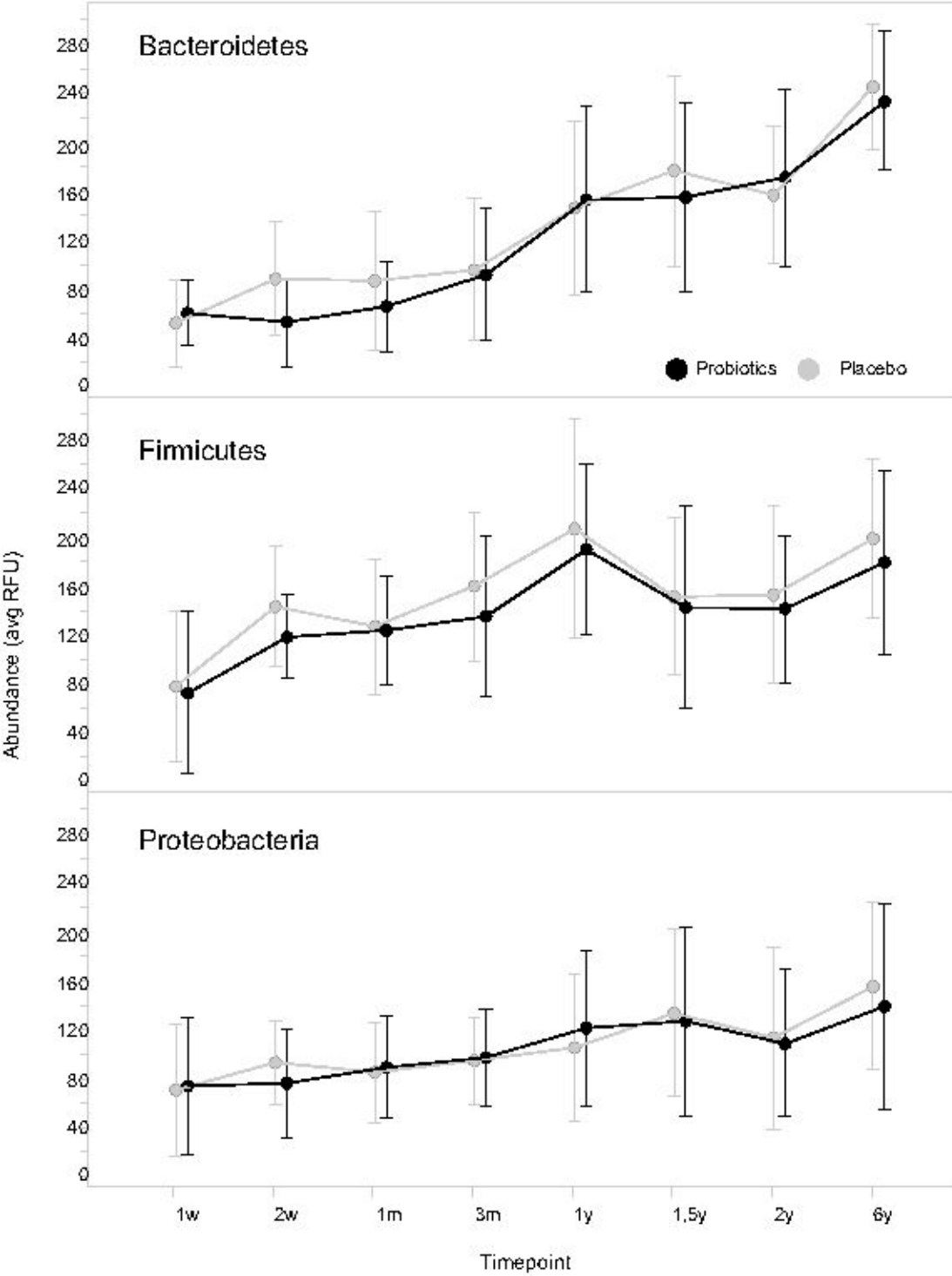
readme.txt

S1_Fig.eps
10.1371/journal.pone.0137681.s001

S1_File.pdf
10.1371/journal.pone.0137681.s002

S2_File.pdf
10.1371/journal.pone.0137681.s003

S3_File.pdf
10.1371/journal.pone.0137681.s004



PANDA STUDIE



Probiotics AND Allergie

Primaire preventie van astma en allergie
door perinatale toediening van probiotica

Inhoudsopgave

1.	Samenvatting	3
2.	Introductie en vraagstelling	5
3.	Belang van dit onderzoek voor de volksgezondheid	7
4.	Studieopzet	
4.1	Tijdschema	8
4.2	Statistiek	8
4.3	Patiënten	8
4.4	Voeding	9
4.5	Methoden en uitkomstvariabelen	
4.5.1.	Uitkomstvariabelen Hoofdvraagstelling A	9
4.5.2.	Uitkomstvariabelen Afgeleide vraagstelling B	11
4.5.3.	Uitkomstvariabelen Afgeleide vraagstelling C	12
4.5.4.	Uitkomstvariabelen Afgeleide vraagstelling D	13
5.	Probiotica preparaat	14
6.	Vooronderzoek	16
7.	Onderzoekslijnen UMCU waar PANDA op aansluit	17
8.	Ethische overwegingen	18
9.	Organisatie	20
10.	Literatuur	21

Bijlagen:

I	Vragenlijst PANDA studie	23
II	Patiënten Informatiebrief	27
III	Informed Consent	30
IV	Verzekering	31
V	Serious adverse Events formulier	33

1. Samenvatting

Achtergrond

Allergie komt in toenemende mate voor in Westerse landen. De hygiëne hypothese suggereert dat de toename van allergische aandoeningen het gevolg is van een verminderde blootstelling aan microbiële antigenen. Daarnaast staat algemeen vast dat de immunologische basis voor het ontwikkelen van allergie reeds op zeer jonge leeftijd wordt gelegd. Voor succesvol ingrijpen in de immuunrespons van de zuigeling bestaat een zogenaamde “window of opportunity” die gelegen is in de eerste 6 levensmaanden. Indien getracht wordt het immuunsysteem te moduleren door in te grijpen in de kolonisatie van de darm dan dient dit in de eerste levensweek te gebeuren. Als mogelijke nieuwe preventieve therapie voor het ontwikkelen van allergie is het gebruik van probiotica gesuggereerd. Probiotica zijn microben die aanwezig zijn in de humane intestinale flora en een immuunrespons kunnen induceren. Probiotica, waaronder melkzuurbacteriën komen significant meer voor in de darmflora van niet-allergische kinderen ten opzichte van allergische kinderen. Probiotica toegediend aan zwangere vrouwen met allergie in de laatste 6 weken van de zwangerschap en aan hun pasgeborenen tot de leeftijd van 6 maanden resulteerde in een reductie van de prevalentie van eczeem met bijna 50 %. Bovenstaande gegevens en observaties suggereren dat vroege toediening van probiotica aan zuigelingen met een hoog risico op het ontwikkelen van allergie kan leiden tot preventie van allergie. Desondanks zijn meerdere belangrijke vragen nog onbeantwoord waaronder: wat is het werkingsmechanisme van probiotica, wat is het immuunmodulerend potentieel van andere (combinaties van) probiotica?

Doel van de studie

Het voorkomen of verminderen van klachten van astma, (atopisch) eczeem, hooikoorts en (voedsel-)allergie bij kinderen met een hoog risico op het ontwikkelen hiervan door middel van perinatale toediening van probiotica

Vraagstelling

Hoofdvraagstelling A: wat is het effect van vroege toediening van probiotica op astma, (atopisch) eczeem, hooikoorts en (voedsel-)allergie op de kinderleeftijd?

Afgeleide vraagstellingen:

B: Leidt vroege toediening van probiotica tot een blijvende andere samenstelling van de darmflora ten opzichte van de placebogroep?

C: Geeft vroege toediening van probiotica in-vivo modulatie van het immuunsysteem? (Suppressie van Thelper-2-cel respons of inductie van regulatoire T cellen?)

D: Spelen genetische polymorfismen van moleculen en receptoren van het immuunsysteem een bepalende rol in de respons op probiotica (“gene by environment interaction”)?

Werkplan / methode

Dubbelblind gerandomiseerd placebo gecontroleerde studie naar klinische effecten en immunomodulatie van probiotica in zwangere vrouwen die bekend zijn met atopische ziekte en hun pasgeborenen. Zwangere vrouwen gebruiken de probiotica in de laatste 8 weken van de zwangerschap en vervolgens de pasgeborenen tot de leeftijd van 1 jaar. De klinische follow-up is tot de leeftijd van 2 jaar met als primaire uitkomstvariabele de incidentie van allergische aandoeningen. Onderzoek naar de effecten op het

immuunsysteem als secundaire uitkomstvariabele worden afgemeten aan productie van cytokinen en morfologie van mononucleaire cellen uit perifere bloed. De keuze voor een bepaalde probiotische stam in de klinische trial is gebaseerd op de resultaten van de in-vitro studie en van het diermodel.

Deelnemers

- *Inclusie:*

Zwangere vrouwen die in heden of verleden bekend zijn met of door arts gediagnosticeerd zijn met allergische aandoeningen als astma, allergische rhinitis (hooikoorts), voedselallergie, atopisch eczeem. Of gezinnen waarin zowel de vader als één of meer van de oudere kinderen is aangedaan met één van de beschreven aandoeningen.

Elke medicamenteuze behandeling voorgeschreven door een arts is toegestaan maar dient te worden gemeld aan de onderzoekers.

- *Exclusie:*

Het voornaamste exclusie criterium is het niet kunnen starten van de interventie / placebo bij de neonat of indien de interventie beïnvloed wordt door antibiotica gebruik. Antenataal systemisch gebruik van medicijnen die het afweersysteem beïnvloeden, als corticosteroïden zijn een exclusie criteria. Neonataal glucocorticoïde therapie geldt als exclusie criterium. Het gebruik van regulier gebruik van probiotica-houdende producten is tevens een exclusie criterium.

Belasting en risico proefpersonen

Het toedienen van probiotica aan volwassenen en kinderen wordt als veilig beschouwd. Daarnaast wordt er in deze studie gebruik gemaakt van probiotische stammen die reeds veelvuldig gebruikt worden in voedingssupplementen en zuivelproducten. Met name de pasgeborene wordt in dit onderzoek belast met op 3 tijdstippen een venapunctie en op de leeftijd van 2 jaar huidtesten voor allergie. Huidtesten worden door kinderen van deze leeftijd i.h.a. niet als vervelend ervaren en de belasting van een venapunctie wordt zoveel mogelijk verminderd door de huid van tevoren te verdoven.

Probiotica product

Op basis van uitgebreid in-vitro onderzoek zijn in samenwerking met Winclove Bioindustries®, Amsterdam, 3 stammen gekozen die als multi-species preparaat zullen worden toegediend in een hypoallergeen drager (rijstzetmeel) in flesjes van 10 ml partieel gehydrolyseerde melk in een dagelijkse dosis van 3×10^9 CFUs. De placebo behandeling bestaat uit de partieel gehydrolyseerde melk met drager. Het staat de ouders / deelnemers vrij om te kiezen tussen borstvoeding of flesvoeding.

Eindpunten

Primaire eindpunt is de incidentie en prevalentie van astma, (atopisch) eczeem, hooikoorts en (voedsel-)allergie op de leeftijd van 2 jaar.

2. Introductie en Vraagstelling

Gedurende de laatste decennia is er een forse toename van allergie en allergische aandoeningen met name onder kinderen. De huidige behandelingsmogelijkheden geven geen blijvende verbetering. In deze studie zal met perinatale toediening van probiotica de mogelijkheden van primaire preventie van allergische aandoeningen onderzocht worden.

Onze hypothese is dat vroege toediening van probiotica aan zwangere vrouwen met allergie en vervolgens aan hun pasgeborenen leidt tot het voorkomen of verminderde ontwikkeling van sensibilisatie en allergische aandoeningen bij het kind.

Deze hypothese is gebaseerd op de volgende waarnemingen:

Allergie wordt immunologisch gekenmerkt door overexpressie van type 2 T helper (Th2) cel immuunresponsen die al vroeg in het leven aanwezig zijn.⁶⁻⁸ Opvallend is dat het immuunsysteem van een foetus en pasgeborene reeds Th2 dominant is. Uitgebalanceerde rijping van het immuunsysteem dient tot stand te komen door postnatale blootstelling aan microbiële antigenen die bij voorkeur leiden tot type 1 T helper (Th1) cel immuunresponsen. Indien het Th2 dominante immuunsysteem van de pasgeborene in stand wordt gehouden door verminderde blootstelling aan microbiële antigenen kan dit leiden tot allergische aandoeningen. De hygiëne hypothese suggereert dan ook dat de toename van allergie kan worden toegeschreven aan een verminderde blootstelling aan microbiële antigenen op de kinderleeftijd.¹⁻³ Gezinsgrootte, verbeterde hygiënische omstandigheden, vaccinaties en het gebruik van antibiotica kunnen volgens deze hypothese een belangrijke rol spelen in de verminderde blootstelling aan microbiële antigenen.^{4, 5} Een essentiële rol in dat proces lijkt te zijn weggelegd voor de kolonisatie en opbouw van de darmflora van de pasgeborene. Aangezien de darmmucosa het grootste oppervlak is van het menselijk lichaam waar direct contact plaats vindt tussen antigenen en de gastheer lijkt de opbouw van de darmflora belangrijk te zijn voor een evenwichtige uitrijping van het neonatale immuunsysteem en de ontwikkeling van tolerantie.¹⁵ De rol van de darmflora in de ontwikkeling van allergie wordt geïllustreerd aan de verschillen tussen de darmflora van kinderen in de ontwikkelde landen (met een hoge prevalentie van allergie) en ontwikkelingslanden waar bifidobacteria en lactobacilli de initiële darmflora domineren. Vergelijking van de darmflora van allergische en niet-allergische kinderen suggereerde eveneens dat allergische kinderen in mindere mate gekoloniseerd waren met lactobacilli en bifidobacteria.^{13, 14} Lactobacilli en bifidobacteria staan ook wel bekend als probiotica. In in-vitro studies is aangetoond dat probiotica invloed hebben op productie van cytokinen van mononucleaire cellen. Probiotica bewerkstellingen een verschuiving naar een Th1-respons, onderdrukking van Th2-respons en mogelijk inductie van een regulatoire immuunrespons²⁰⁻²⁵, hetgeen uitzicht biedt op therapeutische toepassingen voor patiënten met Th2-gerelateerde ziektes als allergie en astma. Het aantal klinische studies met probiotica toepast bij allergische aandoeningen is gering. De meerderheid zijn tertiaire preventie studies²⁸⁻³⁴, waarvan de resultaten niet eensluidend zijn en niet voldoende overtuigend zijn. In de vooralsnog enige primaire preventie studie werd een duidelijk gunstig effect gezien van probiotica op de ontwikkeling van eczeem. Er was geen effect op het ontstaan van atopie, gemeten als een verhoogde serum IgE concentratie.^{26, 27}

Bovenstaande intrigerende gegevens en observaties suggereren dat vroege toediening van probiotica aan zuigelingen met een hoog risico op het ontwikkelen van allergie kan leiden tot preventie van allergie en vermindering van de morbiditeit van allergische aandoeningen.

Desondanks zijn meerdere belangrijke vragen nog onbeantwoord waaronder: wat is het werkingsmechanisme van probiotica, wat zijn de mogelijkheden van andere (combinaties van) probiotica, wat is het belang van reeds prenatale toediening van probiotica? Daarnaast dienen de resultaten van recentelijk verschenen studies bevestigd te worden alvorens definitieve conclusies over de toepassing van probiotica bij allergische aandoeningen getrokken kunnen worden.

In de beschreven studie willen wij dan ook antwoord geven op de volgende vragen:

Hoofdvraag A: Wat is het effect van vroege toediening van probiotica op allergische aandoeningen op de kinderleeftijd (i.e. atopische dermatitis, koemelkeiwitallergie).

Afgeleide vragen:

B: Leidt vroege toediening van probiotica tot een blijvende andere samenstelling van de darmflora ten opzichte van de placebogroep?

C: Geeft vroege toediening van probiotica in-vivo modulatie van het immuunsysteem? (suppressie van de Thelper-2-cel respons of inductie van regulatoire T cellen?)

D: Spelen genetische polymorfismen van moleculen en receptoren van het immuunsysteem een bepalende rol in de respons op probiotica ("gene by environment interaction")?

Samengevat luidt de vraagstelling van dit onderzoeksproject: leidt vroege toediening van probiotica tot verminderde ontwikkeling van allergische aandoeningen en kan dit effect gerelateerd worden aan een andere samenstelling van de darmflora en modulatie van immuunresponsen?

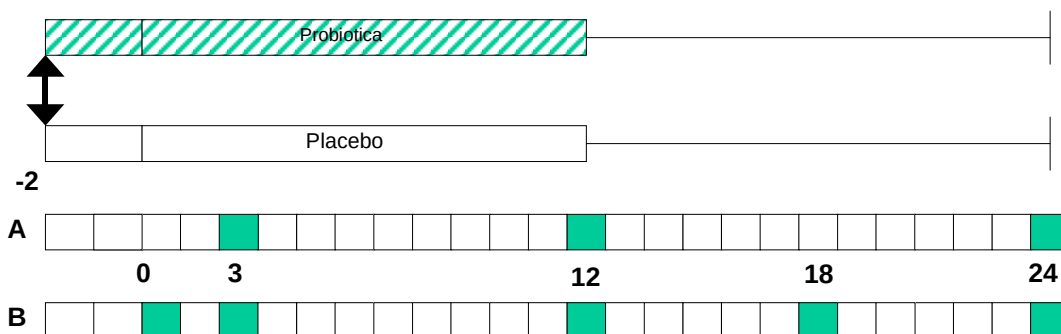
3. Belang van dit onderzoek voor de volksgezondheid

Allergie komt in toenemende mate voor in Westerse landen. Al eerder waarschuwde de WHO voor de epidemische omvang van allergieën. Volgens de WHO is er sprake van een verdubbeling sinds de jaren zeventig. Deze toename treft voornamelijk kinderen. In de internationale literatuur wordt geschat dat 30 % van de kinderen tot 18 jaar last heeft van allergie of allergische aandoeningen. In Nederland gelden ongeveer dezelfde getallen. Hiermee zijn allergische aandoeningen dus verantwoordelijk voor een groot deel van de morbiditeit op de kinderleeftijd. Allergie is een multiorgaanziekte met een breed scala aan klachten als jeuk, eczeem, huiduitslag, gastrointestinale problemen en in het meest ernstige geval anafylactische shock. Tot op heden richt de behandeling van allergische aandoeningen zich voornamelijk op het beperken of behandelen van klachten. Bijvoorbeeld door gebruik van medicijnen tijdens of ter voorkoming van klachten en vermijden van contacten met allergenen door voedingsadviezen en eliminatie diëten, geen huisdieren en saneren van het huis. De ontwikkeling van nieuwe mogelijkheden voor primaire preventie van allergie is daarom van groot belang voor de volksgezondheid. Probiotica zijn hiervoor een veelbelovende kandidaat. De beschreven klinische interventie studie beoogt meer inzicht geven in de effecten van toediening van probiotica op de ontwikkeling van allergische aandoeningen op de kinderleeftijd. Daarnaast zal deze studie de rol van de darmflora en de effecten op het immuunsysteem verduidelijken.

4. Studie opzet

Om onze hypothese te toetsen en onze vraagstellingen te kunnen beantwoorden is gekozen voor een gerandomiseerde, dubbel blind, placebo gecontroleerde klinische studie in zwangere vrouwen bekend met allergische aandoeningen en hun hoog-risico kinderen. De probiotica of placebo worden dagelijks gegeven vanaf 4-6 weken voor de geboorte. Na de geboorte krijgen de pasgeborenen probiotica of placebo (afhankelijk van de randomisatie van moeder) gedurende hun eerste levensjaar. De follow-up is tot de leeftijd van 2 jaar.

4.1 Tijdschema



Tijd aangeduid in maanden

0 = tijdstip geboorte en afname navelstrengbloed

Randomisatie op tijdstip -2 maanden

A = follow-up bezoeken + afname perifeer bloed, bij 24 maanden inclusief huidpriktesten voor allergie

B = tijdstip van afname faeces monsters

4.2 Statistiek

Voor de power analyse is uitgegaan van een 25% reductie in de cumulatieve prevalentie van atopisch eczeem in de interventie groep. Dit betekent een aantal van 50 kinderen per groep. Ervan uitgaande dat 20% van de deelnemers na inclusie hun medewerking opzeggen, zullen 120 zwangere vrouwen met allergische aandoeningen moeten worden geïncludeerd. Voor verwerking van de data zal gebruik worden gemaakt van SPSS. De data zullen worden gestratificeerd naar maternaal roken, maternaal eczeem en voeding van het kind.

4.3 Patiënten

Inclusie:

Zwangere vrouwen die in heden of verleden bekend zijn met of door arts gediagnosticeerd zijn met allergische aandoeningen als astma, allergische rhinitis (hooikoorts), voedselallergie, atopisch eczeem. Of gezinnen waarin zowel de vader als één of meer van de oudere kinderen is aangedaan met één van de beschreven aandoeningen.

Gezinnen met een ouder kind met koemelkeiwit allergie zullen niet worden geïncludeerd aangezien het in Nederland beleid is volgende pasgeborenen in het gezin gehydrolyseerde voeding te geven. Elke medicamenteuze behandeling voorgeschreven door een arts is toegestaan maar dient te worden gemeld aan de onderzoekers.

Exclusie:

Het voornaamste exclusie criterium is het niet kunnen starten van de interventie / placebo bij de neonaat of indien de interventie beïnvloed wordt door antibiotica gebruik. In de praktijk betekent die exclusie van prematuur (< 37 W AD) geboren kinderen die opname behoeven en a terme neonaten die in verband met infectie opgenomen worden voor antibiotica. Bij beide groepen neonaten zal de introductie en start van de voeding anders verlopen dan normaal in de thuissituatie zou hebben plaats gevonden, wat de start van de interventie / placebo vertraagd en bemoeilijkt, zoniet onmogelijk maakt. Aangezien de moeder de laatste 6 weken van de zwangerschap ook probiotica / placebo gebruikt zal antibiotica gebruik 2 weken voor de bevalling exclusie betekenen van de betreffende deelnemer.

Antenataal systemisch gebruik van medicijnen die het afweersysteem beïnvloeden, als corticosteroïden zijn een exclusie criteria. Neonataal glucocorticoïde therapie geldt als exclusie criterium. Het gebruik van regulier gebruik van probiotica-houdende producten is tevens een exclusie criterium.

4.4 Voeding

De geïncludeerde zwangere vrouwen mogen zowel borstvoeding of flesvoeding geven. Probiotica of placebo worden toegevoegd aan het normale eetpatroon van de proefpersoon. Er zijn m.a.w. geen restricties wat betreft dieet behalve dat de proefpersonen géén gebruik mogen maken van probiotica-bevattende producten.

4.5 Methoden en uitkomstvariabelen

Probiotica: probiotica (keuze wordt gemaakt op basis van de resultaten van in-vitro studie en dierstudie) worden gegeven aan de moeders vanaf 4-6 weken antepartum en aan hun hoog-risico pasgeborenen gedurende het eerste levensjaar in een dagelijkse dosis van 3×10^9 CFU. Hetzelfde geldt voor het placebo preparaat.

Uitkomstvariabelen (gebruikte referenties zie 8c):

De uitkomstvariabelen en de tijdstippen van meting zullen per vraagstelling worden beschreven en toegelicht.

4.5.1 Hoofdvraagstelling A: Wat is het effect van vroege toediening van probiotica op allergische aandoeningen op de kinderleeftijd?

De primaire uitkomstvariabele ten aanzien van deze vraag is de aanwezigheid van allergische aandoeningen op de leeftijd van 2 jaar. Deze uitkomstvariabele wordt bepaald op de leeftijd van 3, 12 en 24 maanden (zie tijdschema). Allergische aandoeningen zijn als volgt gedefinieerd: ⁹

- Eczeem: diagnose van eczeem of atopische dermatitis is gebaseerd op de Sampson criteria: erytheem, oedeem, krabeffecten (excoriaties) en jeuk gedurende tenminste 4 weken.¹⁰ De ernst wordt bepaald met behulp van de Scoring Atopic Dermatitis (SCORAD).¹¹
- Voedselallergie: Voedselallergie wordt gedefinieerd als klinische manifestaties van erythemateuze, papulaire, macrovesiculaire huiduitslag, diarree, braken of ademhalingsproblemen in relatie tot inname van bepaald voedsel. Voor de definitieve diagnose is een positieve huidpriktest of verhoogd specifiek IgE en een eliminatie-provocatie-reëliminatie procedure noodzakelijk.
- Astma: astma is moeilijk te definiëren bij kinderen op de leeftijd van 2 jaar. Bij kinderen onder de 3 jaar worden 3 verschillende fenotypen van bronchusobstructieve aandoeningen beschreven.¹² Recidiverende klachten van bronchusobstructie in de aanwezigheid van atopie (gedefinieerd als verhoogd totaal of specifiek IgE) ontwikkelen zich meest waarschijnlijk later tot chronisch astma. Daarom zal de aanwezigheid van atopie voor of op de leeftijd van 2 jaar in combinatie met terugkerende klachten van bronchusobstructie worden aangeduid als astma. Veranderingen in de ernst van astma worden bepaald aan het gebruik van kortwerkende beta-2-agonisten. Aangezien op de leeftijd van 4-5 jaar een meer definitieve diagnose van astma kan worden gesteld zal op deze leeftijd de follow up van het cohort kinderen worden uitgevoerd.
- Rhinitis: rhinitis wordt gedefinieerd als terugkerende perioden van waterige rhinorrhoe (neusvloed) in combinatie met frequent niezen, jeuk aan de neus, roodheid van de ogen en tranende ogen. De diagnose wordt bevestigd met de aanwezigheid van verhoogd specifiek IgE. Veranderingen in de ernst worden afgemeten aan subjectieve beleving en gebruik van medicijnen die de klachten verminderen.

Symptoomscore

Ouders wordt gevraagd een dagboek bij te houden met daarin gegevens over symptomen van allergische aandoeningen, infectieuze ziekten (inclusief gastroenteritis), bezoek aan de huisarts (inclusief diagnose), voorgeschreven medicijnen en gebruik daarvan, veranderingen in voedselpatroon tot de leeftijd van 2 jaar. Bij de long-term follow up zal contact worden opgenomen met de behandelende huisartsen ter evaluatie van doktersbezoek en medicijngebruik naar aanleiding van allergische en/of astmatische klachten. Elk gepland bezoek aan de polikliniek zal bestaan uit een uitgebreide anamnese naar de symptomen van allergische aandoeningen. Veranderingen in de ernst van symptomen worden bepaald aan het gebruik van medicijnen en de hoeveelheid daarvan.

Algemeen Lichamelijk onderzoek

Tijdens elk bezoek aan de polikliniek wordt een algemeen lichamelijk onderzoek verricht, met nadruk op symptomen van allergische aandoeningen. Aanwezigheid of veranderingen van eczeem worden bepaald met gebruik van scoringsmethoden (SCORAD).

Huidpriktesten

Als aanvullend, meer sensitief, onderzoek naar het voorkomen van allergie, zullen op de leeftijd van 2 jaar bij alle deelnemende kinderen huidpriktesten worden uitgevoerd in samenwerking met de polikliniek van het Centrum voor Kinderallergologie.

Afgeleide vraagstellingen (secundaire uitkomstvariabelen)

4.5.2 B: Leidt vroege toediening van probiotica tot een blijvende andere samenstelling van de darmflora ten opzichte van de placebogroep?

Om deze vraag te beantwoorden zal plaatsvinden:

1. Afname oppervlaktekweken en verzamelen uitgezogen sputum postpartum.
2. Vanaf dag 2 post partum 1x/week gedurende 4 weken afname faeces portie.
3. Na staken probiotica/placebo op leeftijd 12 maanden 1x/week gedurende 4 weken afname faecesportie.
4. Afname 1 faecesportie op de leeftijd van 3, 18 en 24 maanden

Ad 1: het kind wordt tijdens de geboorte gekoloniseerd door de flora van de moeder. Door middel van oppervlakte kweken postpartum wordt deze kolonisatie bepaald en gekeken of er verschil is tussen probiotica groep en placebo groep.

Ad 2 t/m 4: om de kolonisatie van de darmflora te volgen is gekozen voor frequente faeces monsters, met name rondom de start van toediening van probiotica/placebo aan het kind en het staken daarvan op de leeftijd van 12 maanden.

De humane intestinale flora wordt gedomineerd door anaërobe micro-organismen, die lastig en tijdrovend zijn om te kweken, met als gevolg dat vele stammen vooralsnog niet kunnen worden gekweekt. Er zal daarom in deze studie gebruik gemaakt worden van moleculaire methoden en technieken, gebaseerd op 16S rRNA genen, die onafhankelijk zijn van kweken en waarmee het mogelijk is tijdens de studie veranderingen van de intestinale flora te volgen.

PCR en "denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) van 16S rDNA genen

(Favier CF, Vaughan EE et al. Molecular Monitoring of Succession of Bacterial Communities in human neonates. Appl Environ Microbiol 2002;68:219-6)

Dit is een kwalitatieve analyse waarmee de dominante species in de faeces kunnen worden aangetoond en worden vervolgd in de tijd. Faeces monsters worden door de ouders thuis verzameld, ingestuurd naar het WKZ en daar ingevroren. DNA wordt geïsoleerd uit de faeces monsters. Bacterieel 16S DNA wordt geamplificeerd met PCR en de PCR fragmenten worden gescheiden met DGGE. De resulterende profielen worden gebruikt om veranderingen van de flora te vervolgen gedurende de tijd. Binnen deze techniek kan er gekeken worden naar specifieke populaties, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* species, met genus specifieke PCR en DGGE. Dit betekent dat de ingenomen probiotische stam kan worden vervolgd.

Fluorescentie in situ hybridisatie (FISH) in combinatie met flowcytometrie

(Vaughan EE et al. The intestinal LABs. 2002 Antonie van Leeuwenhoek 82:341-352)

Bacteriën in de faeces worden gehybridiseerd met fluorescent gelabelde 16S rRNA probes specifiek voor een type bacterie. Op dit moment zijn er 6 gevalideerde probes beschikbaar , waaronder voor bifidobacteria, lactobacilli, clostridium en bacteroides. Met flowcytometrie kunnen de gelabelde populaties onderscheiden worden van de ongelabelde populaties en kan een kwantitatieve analyse worden gedaan naar de samenstelling van de darmflora.

4.5.3 C: Geeft vroege toediening van probiotica in-vivo modulatie van het immuunsysteem? Vindt er onderdrukking van plaats van Thelper-2-cel responsen of worden regulatoire T cellen geïnduceerd?

Van de pasgeborenen worden de parameters op tijdstip 0 (=geboorte) bepaald in navelstrengbloed en beschouwd worden als baseline parameters. Daarna wordt tijdens de follow-up bezoeken van 3, 12, 24 maanden en 5 jaar perifeer bloed afgenomen bij de kinderen. De parameters waarnaar gekeken zal worden zijn totaal IgE en specifiek IgE, morfologie mononucleaire cellen (inclusief toll-like receptoren), bepaling van productie van cytokinen. Deze uitkomstvariabelen worden hieronder afzonderlijk beschreven.

IgE

Totaal en specifiek IgE wordt bepaald door middel van immunoCAP techniek (Pharmacia, Nederland). Specifiek IgE tegen de 6 belangrijkste allergenen (koemelkeiwit, huisstofmijt, kat, hond, gras- en boompollen) zullen worden bepaald.

Morfologie mononucleaire cellen

Voor lymfocyten fenotypering wordt gebruik gemaakt van CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD45RO. Om onderscheid te maken tussen Th1 en Th2 wordt gekeken naar expressie van CD30, CCR3, CCR4, CCR5 en CCR8. Regulatoire T cellen worden onderscheiden met de markers CD4, CD25, CTLA-4, GITR, L-selectin, CCR4, CD45RB en CD45RO.

Expressie van toll-like receptoren (TLR) op mononucleaire cellen uit perifeer bloed worden bepaald met flow cytometrie met gebruik van antilichamen tegen TLR (commercieel verkrijgbaar: TLR2, -3, -4, -6, -9).

Cytokinen bepalingen

Volbloed wordt verdund met RPMI medium (GIBCO/BRL). Cellen worden gestimuleerd met LPS en IFN-gamma. Na 18 uur worden de supernatanten afgenomen en ingevroren ter bepaling van cytokinen met Luminex technologie. Cellen worden daarnaast gestimuleerd met medium (RPMI), CD2/CD28 en PHA. Na 48 en 72 uur worden de supernatanten afgenomen en ingevroren. Proliferatie van de cellen worden op 48 en 72 uur bepaald met incorporatie van 3H-thymidine. Cytokinen worden bepaald in de supernatanten met Luminex (De Jager W et al. *Simultaneous detection of 15 human cytokines in a single sample of stimulated peripheral blood mononuclear cells. Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10:133-9). Met deze techniek kunnen in 50 microliter supernatant 15 verschillende cytokinen en 5 verschillende chemokinen bepaald worden. De sensitiviteit van deze techniek is vergelijkbaar met een conventionele ELISA, intra-assay CV <10% en interassay CV <20%.

4.5.4 D: Spelen genetische polymorfismen van moleculen en receptoren van het immuunsysteem een bepalende rol in de respons op probiotica (“gene by environment interaction”)?

Polymorfismen van cytokine genen en andere genen betrokken bij de innate en adaptive immuniteit worden onderzocht (Lazarus R et al. *Single nucleotide polymorphisms in innate immunity genes: abundant variation and potent role in complex human disease. Immunological Reviews* 2002;190:9-25) . Daartoe zal in een samenwerkingsverband met Dr. Ruven en Grutters (Antonius Ziekenhuis, Nieuwegein) dmv sequentie specifieke primer PCR, polymorfismen van IL-4, IL-4R, IL-6, IL-10, IL-10R, IL-13, IL-1 β , TNF α , TNFR1, TNFR2, INF γ , INF γ R1, INF γ R2, CC16, CD14, Toll-like receptor 4, NRAMP, MBL, Fc γ RIIa, Fc γ RIIIa and IIIb worden bepaald. Met elk van deze genen is binnen het UMC specifieke ervaring. Uiteindelijk zal de klinische uitkomst van de primaire preventie worden gecorreleerd aan polymorfisme profielen.

5. Probiotica preparaat

Probiotica zijn “voedingssupplementen op basis van levende micro-organismen (met name melkzuurbacteriën) met een “gezondheidsbevorderend” effect voor de gastheer. Van probiotica is bekend dat ze (over-)groei van bepaalde pathogenen kunnen remmen en de barrière functie van de darm kunnen verbeteren. Bovendien is bekend dat bepaalde probiotica ons immuunsysteem op een positieve manier kunnen beïnvloeden.

Ontwikkeling

Er is in deze studie een multispecies probiotica preparaat ontworpen in samenwerking met Winclove Bio Industries B.V. ® te Amsterdam. Het preparaat bestaat uit 3 bekende en in zuivelproducten voorkomende probiotische stammen die geselecteerd zijn uit een stammenbank van ruim 75 probiotische stammen. Van al deze stammen zijn individuele eigenschappen bekend zoals stabiliteit in het eindproduct, overleving in het maagdarmkanaal en antibiotica resistentie. Op basis van de individuele eigenschappen zijn uit deze 75 stammen 14 stammen geselecteerd om verder te karakteriseren (zie hoofdstuk 6). Er is gekozen voor een multispecies preparaat in plaats van een preparaat bestaande uit 1 stam omdat een multispecies preparaat het voordeel kan hebben van synergie of symbiose tussen de verschillende stammen waardoor het effect van het totale preparaat kan worden versterkt.

Selectiecriteria

Op basis van het vooronderzoek (zie hoofdstuk 6) zijn 3 stammen geselecteerd om als multispecies probiotica preparaat te gaan gebruiken in de onderhavige studie. Kort samengevat zijn de stammen geselecteerd op basis van de hierboven genoemde individuele eigenschappen, in-vitro capaciteit om anti-inflammatoire cytokinen (IL-10) te induceren en productie van allergie gecorreleerde cytokinen te onderdrukken (IL-4, IL-5 en IL-13), hun capaciteit om te hechten aan dendritische cellen en vanuit het oogpunt van veiligheid en hun aanwezigheid in reeds bestaande zuivelproducten.

Geselecteerde stammen

1. *Bifidobacterium bifidum*
2. *Bifidobacterium Infantis*
3. *Lactococcus lactis*

Toediening

Het probiotica product zal 1 maal daags worden toegediend in een totale dosis van 3×10^9 Colony Forming Units (CFU). Voor een preparaat bestaande uit 3 stammen betekent dit 1×10^9 CFUs per stam. De zuigelingen krijgen borstvoeding of flesvoeding (afhankelijk van de keuze van de ouders). Het probiotica preparaat wordt toegediend in flesjes van 10 ml met daarin de voeding van keuze van de ouders. Deze wordt gegeven voor de borstvoeding of flesvoeding. De drager van de probiotica stammen zal bestaan uit rijstzetmeel aangezien die hypo-allergeen is. De drager zal bestraald worden met gamma-stralen om contaminatie van natuurlijk aanwezige bacteriën te voorkomen.

Placebo

Het placebo preparaat bestaat uit de voedingsmatrix, dus hydrolysaat melk en de drager van het probioticum bestaande uit rijstzetmeel.

Veiligheid

Er wordt uitsluitend gebruik gemaakt van probiotische bacterie stammen die sinds langere tijd reeds gebruikt worden in de voedingsindustrie voor de produktie van voedingssupplementen en zuivelproducten als kaas, kwark en yoghurt. De meeste probiotische stammen worden gezien als commensale microorganismen zonder pathogene werking. In recente artikelen worden de veiligheid van *Lactobacilli* en *Bifidobacteria* beschreven^{36, 37}. Deze artikelen geven een review van de beschikbare literatuur en beschrijven dat *Lactobacilli* en *Bifidobacteria* in zeldzame gevallen de oorzaak zijn van infectie bij zowel gezonde als immuungecompromitteerde individuen. Een uitgebreide literatuurstudie naar infectieuze complicatie van specifieke probiotische stammen leverde publicaties op over 2 probiotische stammen, *Lactobacillus rhamnosus* en *Enterococcus faecium*. Alhoewel het onduidelijk is of deze infecties veroorzaakt werden door de probiotische stam of een gelijknamige commensale stam, zullen deze stammen niet worden gebruikt. Op basis van de ervaringen van toediening van probiotica bij kinderen, met name zijn studies verricht van toediening van probiotica bij infectieuze diarree, worden geen ongewenste bijwerkingen of serious adverse events verwacht. We hebben voor deze studie een serious adverse events formulier samengesteld waarvan bij het voorkomen van ongewenste bijwerkingen en serious adverse events dit beoordeeld zal worden door de hoofdonderzoeker (Dr. M.O. Hoekstra) en direct gemeld worden aan de METC door de hoofdonderzoeker.

6. Vooronderzoek

In vitro studie

“In-vitro effects of probiotics on proliferation, morphology and cytokine production on cord-blood derived mononuclear cells from high-risk newborns”. (Drs. L.E.M. Niers, Dr. G.T. Rijkers, Dr. M.O. Hoekstra, Algemene Pediatrie, WKZ, UMC Utrecht)

Op basis van deze studie zijn de probiotische stammen met de meest gunstige effecten op het immuunsysteem ten aanzien van preventie en onderdrukking van allergie (lees: type-2-Helper cel responsen) geselecteerd en worden gebruikt in het beschreven onderzoeksvoorstel. Door onze expertise op het gebied van immunoregulatie bij kinderen en multiplex cytokinen onderzoek hebben we op dit onderzoeksterrein contacten met Numico (Dr. R. van Tol) en Winclove (Dr. P. Pekelharing), belangrijke industriële producenten van probiotica.

In deze studie zijn op basis van de individuele eigenschappen (als stabiliteit in het eindproduct, overleving in het maagdarmkanaal en antibiotica resistentie) van de 75 stammen van Winclove Bioindustries, Amsterdam, 14 stammen geselecteerd om verder te karakteriseren. De 14 geteste probiotica hebben stamspecifieke eigenschappen voor wat betreft invloed op mononucleaire cellen afgemeten aan productie van cytokinen. De 3 stammen die gebruikt worden in de onderhavige studie, zijn geselecteerd op basis van hun vermogen om de productie van anti-inflammatoire cytokinen (IL-10) te induceren, de productie van astma en allergie gerelateerde cytokinen (IL-4, IL-5, IL-13) te onderdrukken en minder productie van pro-inflammatoire cytokinen induceren ten opzichte van de overige 11 stammen. Tevens is de capaciteit van de 14 stammen om aan dendritische cellen te binden onderzocht. Hierbij zijn we uitgegaan van onze hypothese dat het contact tussen de “gastheer” en probiotische stammen cruciaal is voor een gunstige werking van deze bacteriën. Dit contact wordt tot stand gebracht in de darm waarbij de link tussen de bacterie in het darmlumen of op de darmwand en het immuunsysteem van de gastheer gevormd wordt door dendritische cellen, die aanwezig zijn in de wand van de darm. De drie geselecteerde stammen kunnen in-vitro goed binden aan dendritische cellen.

Met de keuze van de stammen is vanuit het oogpunt van veiligheid rekening gehouden met de aanwezigheid van deze stammen in reeds op de markt zijnde voedingssupplementen en zuivelproducten. Voor de 3 geselecteerde stammen geldt bijvoorbeeld dat ze aanwezig zijn in het voedingssupplement orthiflor en dat 1 van de stammen aanwezig is in het zuivelproduct Mona Vifit.

7. Onderzoekslijnen UMCU waar PANDA studie op aansluit

Het beschreven onderzoek maakt deel uit van een onderzoekslijn binnen het Wilhelmina Kinderziekenhuis naar de mogelijkheden van het gebruik van probiotica bij kinderen. Binnen het UMC Utrecht zijn de verschillende onderzoeken naar de mogelijkheden van probiotica verenigd in het Probiotica Platform Utrecht, wat bestaat uit een samenwerkingsverband tussen de divisies Algemene Kindergeneeskunde, Laboratorium Pediatrische Immunologie, Afdeling Dermato/ Allergologie, Heelkunde en de Faculteit Farmacie. Naast dit onderzoeksvoorstel omvat het Probiotica Platform Utrecht de volgende studies:

- *In vitro studie* "In-vitro effects of probiotics on proliferation, morphology and cytokine production on cord-blood derived mononuclear cells from high-risk newborns". (Drs. L.E.M. Niers, Dr. G.T. Rijkers, Dr. M.O. Hoekstra, Algemene Pediatrie, WKZ, UMC Utrecht)

METC protocol nummer: 03/035

- *Diermodel*: "The effect of different (combinations) of probiotics on several immune parameters in an ovalbumen-astma mouse model" (Drs. C. Severijnen, Dr. A. van Oosterhout, Dr. M.A. Bloksma en Dr. M.O. Hoekstra, Afdeling Farmacologie, UMC Utrecht)
- *Tertiaire preventie pilotstudie* met probiotica bij kinderen met constitutioneel eczeem (Dr. E. van Hoffen, Dermatologie/Allergologie, AZU, UMC Utrecht).

METC protocol nummer: 02/162

- *Preventie van bovenste luchtweginfecties* door probiotica en prebiotica bij kinderen die kinderdagverblijf bezoeken (Dr. E.A.M. Sanders, Pediatrische Immunologie en Reumatologie WKZ, UMC Utrecht).
- *Multicentre trial* naar de effecten van probiotica bij pancreatitis (PROPATRIA studie) en studie naar effecten van probiotica in een pancreatitis rattenmodel (Prof. Dr. L.M.A. Akkermans en Prof. Dr. H.G. Gooszen, afdeling Heelkunde en Gastrointestinale Research Afdeling, AZU, UMC Utrecht). Start september 2003.

METC protocol nummer: 03/169

8. Ethische overwegingen

De studie zal uitgevoerd worden in overeenstemming met de ethische principes van de Verklaring van Helsinki en na de goedkeuring van de onderhavige studie door de Medisch Ethische Toetsingscommissie van het UMC Utrecht. Het UMC Utrecht heeft, als verrichter (opdrachtgever) van dit onderzoek, een risicoverzekering afgesloten voor proefpersonen die meedoen aan wetenschappelijk onderzoek. Informatie over deze verzekering wordt bijgevoegd bij de patiënten informatiebrief en is als bijlage IV te vinden in dit onderzoeksprotocol.

Informed consent

De zwangere vrouw met haar aanstaande zoon / dochter die aan de inclusiecriteria voldoen en interesse heeft in deelname aan de studie, zullen om toestemming gevraagd worden voor deelname aan dit onderzoek. Voor de pasgeborene als wilsonbekwame persoon betekent dit dat de ouder(s) of wettelijk vertegenwoordiger hiervoor toestemming zal moeten verlenen. De opzet van de studie zal door de onderzoekster en door middel van de patiënten informatiebrief worden uitgelegd. De zwangere vrouw verleent door middel van ondertekening van een informed consent formulier medewerking aan dit onderzoek. De (aanstaande) ouders dan wel wettelijk vertegenwoordiger van de aanstaande pasgeborene geven door middel van ondertekening van het daartoe behorende informed consent formulier hun toestemming voor deelname van hun kind aan dit onderzoek. Hierbij houden de deelnemers de mogelijkheid zich te allen tijde uit het onderzoek terug te trekken, zonder dat de zorg voor hen daardoor veranderd. De gegevens van de deelnemers zullen centraal verzameld worden onder vermelding van een studienummer. Slechts de onderzoekscoördinatoren (Dr. M.O. Hoekstra en Dr. G.T. Rijkers) beschikken over een lijst met namen. Aldus is de privacy van de deelnemers gewaarborgd.

Belasting voor de deelnemers

De belasting voor de deelnemers zal voornamelijk gelden voor de pasgeborenen. Zij worden gedurende de follow-up tot de leeftijd van 2 jaar 3 maal geprikt voor een bloedafname. Tevens zal op de leeftijd van 2 jaar met huidpriktesten aanvullend onderzoek gedaan worden naar het voorkomen van sensibilisatie bij de kinderen. De onderzoeksgroep realiseert zich terdege de belasting die vena puncties betekenen voor kinderen en voor de ouders. De belasting wordt zoveel mogelijk beperkt door de venapunctie uit te laten voeren door iemand met ervaring in bloedprikken bij kinderen en door de plaats van prikken van tevoren te verdoven met emla zalf. Ten aanzien van huidpriktesten realiseert de onderzoeksgroep zich ook terdege dat die als belastend kunnen worden ervaren door de kinderen en ouders. Onze ervaring leert dat de huidpriktesten door kinderen in de betreffende leeftijdscategorie over het algemeen niet als belastend of oncomfortabel wordt ervaren, in tegenstelling wat op basis van de handelswijze en uitvoering van dit allergie onderzoek verwacht zou kunnen worden. Indien de zuigeling zich dusdanig verzet of oncomfortabel is en de ouder(s) / wettelijk vertegenwoordiger verzoekt om het prikken of ander aanvullend onderzoek te staken, dan zal dit verzoek vanzelfsprekend worden gehonoreerd. De belasting voor de ouders wordt als minimaal ingeschat. Het betreft voornamelijk het verzamelen van ontlasting en het bijhouden van klachten bij hun deelnemende kind.

Probiotica

Probiotica worden over het algemeen goed verdragen. In een enkel geval kan een onprettig gevoel ontstaan door overmatige productie van gassen. Mochten er bijwerkingen optreden dan zal hiervan melding worden gemaakt aan de METC. Indien nodig zal de toedieningen in overleg met de deelnemers gestaakt worden.

9. Organisatie

In onderstaande tabel zijn de betrokken personen bij dit onderzoek aangegeven. Het onderzoek wordt uitgevoerd door Mw. L.E.M. Niers, arts-assistent Kindergeneeskunde. Het onderzoek zal begeleid worden door Dr. M.O. Hoekstra en Dr. G.T. Rijkers. De immunologische uitkomstvariabelen zullen bepaald worden in het Laboratorium voor Pediatrische Immunologie, in samenwerking met Mw. N.O.P van Uden en Dr. G. van Bleek. Aangezien het onderzoek onderdeel uitmaakt van een samenwerkingsverband tussen de Divisie Kindergeneeskunde en de afdeling Dermatologie/Allergologie van het AZU is Dr. E.F. Knol betrokken bij het onderzoek.

Voor het onderzoek in de ontlasting wordt gebruik gemaakt van de expertise van de Universiteit van Wageningen, Mw. Dr. E.E. Vaughan.

Voor de statistische analyse van de uitkomstvariabelen is Dr. C.S.P.M. Uiterwaal betrokken.

Prof. M.L Kapsenberg en Mw. Dr. H.H. Smits hebben een grote expertise op het gebied van probiotica en antigeen presentatie en hebben een adviserende rol in het onderzoek

Naam (met titel)	discipline	t.l.v. inst/vakgr.	uren/week
Mw. Drs. L.E.M. Niers	Arts	UMCU	40
Dr. M.O. Hoekstra	Kinderarts	UMCU	6
Prof. J.L.L. Kimpen	Kinderarts en opleider	UMCU	2
Prof. W. Kuis	Kinderarts, immunoloog	UMCU	adv
Dr. G.T. Rijkers	Immunoloog, Hoofd Lab. Pediatrische Immunologie	UMCU	6
Dr. G. van Bleek	Immunoloog	UMCU	2
Mw. Drs. N.O.P van Uden	Research analist (WO)	UMCU	20
Dr. E.F. Knol	Immunoloog, Hoofd onder- zoek Dermato/Allergologie	UMCU	2
Mw. Dr. E.E. Vaughan	Microbioloog, Lab. Microbiologie Wageningen	WUR	1
Dr. C.S.P.M. Uiterwaal	Statisticus/epidemioloog	UMCU	adv
Prof. M.L. Kapsenberg	Immunoloog	AMC	adv
Mw. Drs. H.H. Smits	Med. Bioloog/Immunoloog	AMC	adv

10. Literatuur

Hygiene hypothesis

1. Umetsu DT, McIntire JJ, Akbari O et al. Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. *Nat Immunol* 2002;3:715-20.
2. Von Mutius E. Pro: the increase in asthma can be ascribed to cleanliness. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1106-7.
3. Platts-Mills TA, Woodfolk JA, Sporik RB. Con: the increase in asthma cannot be ascribed to cleanliness. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1107-8.
4. Weiss ST. Eat dirt: the hygiene hypothesis and allergic disease. *N Eng J Med* 2002;347:930-1.
5. Wills-Karp M, Santeliz J, Karp CL. The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nat Rev Immunol* 2001;1:69-75.

Timing: sensitization in utero and early life

6. Bjorksten B. Allergy priming early in life. *Lancet*. 1999;353:167-8.
7. Warner JO, Jones CA, Kilburn SA et al. Prenatal sensitization in humans. *Pediatr Allergy Immunol* 2001;11S13:6-8.
8. Herz U, Joachim R, Ahrens B et al. Allergic sensitization and allergen exposure during pregnancy favor the development of atopy in the neonate. *Int Arch Allergy Clin Immunol* 2001;124:193-6.

Allergic disease in childhood

9. Laan MP et al. Markers for early sensitization and inflammation in relation to clinical manifestations of atopic disease up to 2 years of age in 133 high-risk children. *Clin Exp Allergy* 2000;30:944-53.
10. Sampson HA. Pathogenesis of eczema. *Clin Exp Allergy* 1990;20:459-67.
11. Sprickelman AB et al. Severity scoring in allergic dermatitis: a comparison of three scoring systems. *Allergy* 1997;52:44-9.
12. Martinez FD. Development of wheezing disorders and asthma in preschool children. *Pediatrics* 2002;109(S2):362-7.

Role of the intestinal flora in the development of allergy and atopy

13. Bjorksten B, Naaber P, Seppe E et al. The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clin Exp Allergy*. 1999;29:342-6.
14. Kalliomaki M, Kirjavainen P, Eerola E et al. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;107:129-34.
15. Kalliomaki M, Isolauri E. Role of intestinal flora in the development of allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003;36:223-7.

Reviews or editorials addressing the use of probiotics

16. Mursh SH. Toll of allergy reduced by probiotics. *Lancet* 2001;357:1057-9.
17. Isolauri E, Sutas Y, Kankaanpaa P et al. Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr*. 2001;73:44S-50S
18. Erickson KL, Hubbard NE. Probiotic immunomodulation in health and disease. *J Nutr*. 2000;130:403S-9S
19. Matricardi PM. Probiotics against allergy: data, doubts and perspective. *Allergy* 2002;57:185-7.

In-vitro effects of probiotics

20. Hesse C, Hanson LA, Wold AE. Lactobacilli from human gastrointestinal mucosa are strong stimulators of IL-12 production. *Clin Exp Immunol*. 1999;116:276-82.
21. Christensen HR, Frokiaer H, Pestka JJ. Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J Immunol*. 2002;168:171-8.
22. Miettinen M, Vuopio-Varkila J, et al. Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 (IL-6), and IL-10 is induced by lactic acid bacteria. *Infect Immun*. 1996;64:5403-5.
23. Miettinen M, Matikainen S, Vuopio-Varkila J et al. Lactobacilli and streptococci induce interleukin-12 (IL-12), IL-18 and gamma interferon production in human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun* 1998;66:6058-62.
24. Pessi T, Sutas Y, Hurme M et al. Interleukin-10 generation in atopic children following oral Lactobacillus Rhamnosus GG. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1804-8.
25. Pochard P, Gosset P, Grangette C et al. Lactic acid bacteria inhibit Th2 cytokine production by mononuclear cells from allergic patients. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110:617-23.

Clinical trials probiotics in allergic disease

26. Kalliomaki M, Salminen S, Poussa T et al. Probiotics and prevention of atopic disease: 4 year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2003;361:1869-71. (*primary prevention*)
27. Kalliomaki M, Salminen S, Arvilommi H et al. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2001;357:1076-79. (*primary prevention*)
28. Kirjavainen PV, Salminen SJ, Isolauri E. Probiotic bacteria in the management of atopic disease: underscoring the importance of viability. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003;36:223-7.
29. Majamaa H, Isolauri E. Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 1997;99:179-85.
30. Isolauri E, Arvola T, Sutas Y et al. Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin Exp Allergy*. 2000;30:1604-10.
31. Kalliomaki M, Ouwehand A, Arvilommi H et al. Transforming growth factor-beta in breast milk: a potential regulator of atopic disease at an early age. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;104:1251-7.
32. Rautava S, Kalliomaki M, Isolauri E. Probiotics during pregnancy and breastfeeding might confer immunomodulatory protection against atopic disease in the infant. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:119-21.
33. Rosenfeldt V, Benfeldt E, Nielsen SD et al. Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:389-95.
34. Helin T, Haahtela S, Haahtela T. No effect of oral treatment with an intestinal bacterial strain, *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 53103), on birch-pollen allergy: a placebo-controlled double-blind study. *Allergy*. 2002;57:243-6.

Gene by environment interaction

35. Smit JJ, Loveren H van, Hoekstra MO et al. Influence of the macrophage bacterial resistance gene, *Nramp1* (*Slc11a1*), on the induction of allergic asthma in the mouse. *FASEB J* 2003 17:958-60.

Safety of probiotics

36. Borriello SP, Hammes WP, Holzapfel W et al. Safety of probiotics that contain *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. *Clin Infect Dis*. 2003;36:775-80.
37. Sipsas NV, Zonios DI, Kordosis T. Safety of *Lactobacillus* strains used as probiotic agents. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 1283-1284

VRAGENLIJST VOOR DEELNEMERS AAN DE PANDA STUDIE



Probiotics AND Allergy

Toelichting bij de vragenlijst

De vragenlijst is ontwikkeld om een beeld te krijgen van het voorkomen van voedselallergie, hooikoorts, allergische rhinitis, astma en andere allergische klachten bij deelnemers of gezinnen van de deelnemers aan de PANDA studie

Bij de vragen hoeft u alleen het juiste antwoord te kiezen en het betreffende hokje aan te kruisen. Indien u het lastig vindt om een keuze te maken tussen 'ja' of 'nee' is het voor het onderzoek beter als u in zo'n geval toch een keuze maakt en het antwoord aankruist dat het beste van toepassing is. U kunt uw twijfel kort toelichten bij de desbetreffende vraag.

Met het oog op privacy worden de gegevens zonder uw naam en adres in de computer verwerkt en alleen onder uw deelnemersnummer ingevoerd.

Voor nadere informatie kunt u bellen met:

Titia Niers, arts-assistent Kindergeneeskunde, Wilhelmina Kinderziekenhuis Utrecht
030-2504000, sein 5063 OF 0302504582

ALGEMENE GEGEVENS DEELNEMERS PANDA STUDIE BIJ INCLUSIE

(in te vullen door onderzoekster)

Naam moeder:

Geboorte datum moeder:

Geboorte datum vader:

Geboorte datum / data kinderen: -
-
-

Datum laatste menstruatie moeder:

A terme datum moeder:

Gravida: /Para:

STUDIE NUMMER Deelnemer (in te vullen door onderzoekster):

VRAGENLIJST ASTMA EN ALLERGISCHE AANDOENINGEN

Vraag 1

- | | |
|--|--|
| A. Bent u bij de huisarts bekend met astma en / of allergie? | JA ☐ NEE ☐ |
| B. Is uw echtgenoot / partner bij de huisarts bekend met astma en / of allergie? | JA ☐ NEE ☐ |
| C. Heeft u een kind, die bekend is bij de huisarts met astma en / of allergie? | JA ☐ NEE ☐ |

Vraag 2

- | | |
|--|--|
| A. Zijn er bij u <u>ooit</u> allergietesten verricht, door middel van bloedonderzoek of testen op de huid? | JA ☐ NEE ☐ |
| B. Zijn er bij uw echtgenoot / partner <u>ooit</u> allergietesten verricht, door middel van bloedonderzoek of testen op de huid? | JA ☐ NEE ☐ |
| C. Zijn er bij één of meerdere ouder(e) kind(eren) <u>ooit</u> allergietesten verricht, door middel van bloedonderzoek of testen op de huid? | JA ☐ NEE ☐ |

Vraag 3

- | | |
|---|--|
| A. Gebruikt u nu of heeft u in het verleden medicatie voor astma gebruikt, de zogenaamde pufjes? Zo ja , kunt u aangeven welke medicijnen en in welke dosering?..... | JA ☐ NEE ☐ |
| | |
| | |
| B. Gebruikt uw echtgenoot / partner nu of heeft hij in het verleden medicatie voor astma gebruikt, de zogenaamde pufjes? Zo ja , kunt u aangeven welke medicijnen en in welke dosering?..... | JA ☐ NEE ☐ |
| | |
| | |
| C. Gebruikt één of meerdere ouder(e) kind(eren) nu of in het verleden medicatie voor astma gebruikt, de zogenaamde pufjes? Zo ja , kunt u aangeven welke medicijnen en in welke dosering?..... | JA ☐ NEE ☐ |
| | |
| | |

Vraag 4

- | | |
|---|--|
| A. Gebruikt u of heeft u medicatie gebruikt om klachten van allergie te verminderen, bijvoorbeeld een anti-histaminicum? Zo ja, kunt u aangeven welke?..... | JA ☐ NEE ☐ |
| | |
| B. Gebruikt uw echtgenoot / partner of heeft hij medicatie gebruikt om klachten van allergie te verminderen? Zo ja, welke?..... | JA ☐ NEE ☐ |
| | |
| C. Gebruikt één of meerdere ouder(e) kind(eren) ooit medicatie om klachten van allergie te verminderen? Zo ja, welke?..... | JA ☐ NEE ☐ |
| | |

Vraag 5

- | | |
|---|--|
| A. Heeft u last van hooikoorts? | JA ☐ NEE ☐ |
| B. Heeft uw echtgenoot / partner last van hooikoorts? | JA ☐ NEE ☐ |
| C. Heeft één of meerdere ouder(e) kind(eren) last van hooikoorts? | JA ☐ NEE ☐ |

Vraag 6

- | | | |
|----|---|----------------|
| A. | Heeft u ooit eczeem gehad? | JA [] NEE [] |
| B. | Heeft uw echtgenoot / partner ooit eczeem gehad? | JA [] NEE [] |
| C. | Heeft u één of meerdere ouder(e) kind(eren) die ooit eczeem hebben gehad? | JA [] NEE [] |

Vraag 7

- | | | |
|----|---|----------------|
| A. | Heeft u ooit een allergische reactie gehad, bijvoorbeeld galbulten, jeuk of ernstige acute reactie op voedsel of bent u bekend met een voedsel allergie? Zo ja, kunt u aangeven voor welk voedsel?..... | JA [] NEE [] |
| B. | Heeft uw echtgenoot / partner ooit een allergische reactie gehad, bijvoorbeeld galbulten, jeuk of een ernstige acute reactie op voedsel of is hij bekend met een voedsel allergie? Zo ja, kunt u aangeven voor welk voedsel?..... | JA [] NEE [] |
| C. | Heeft uw één of meerdere ouder(e) kind(eren), die ooit een allergische reactie gehad, bijvoorbeeld galbulten, jeuk of een ernstige acute reactie op voedsel of bekend zijn met een voedsel allergie? Zo ja, kunt u aangeven voor welk voedsel?..... | JA [] NEE [] |

Vraag 8

- | | | |
|----|---|----------------|
| A. | Heeft u ooit allergisch gereageerd (zoals bovengenoemde reacties) op geneesmiddelen? Zo ja, welke?..... | JA [] NEE [] |
| B. | Heeft uw echtgenoot / partner ooit allergisch gereageerd op geneesmiddelen? Zo ja, welke?..... | JA [] NEE [] |
| C. | Heeft u één of meerdere ouder(e) kind(eren) die ooit allergisch hebben gereageerd op geneesmiddelen? Zo ja, welke?..... | JA [] NEE [] |

Vraag 9

- | | | |
|----|--|----------------|
| A. | Heeft u ooit allergisch gereageerd (zoals bovengenoemde reacties) op een wespen- of andere insektenbeet? | JA [] NEE [] |
| B. | Heeft uw echtgenoot / partner ooit allergisch gereageerd op een wespen- of andere insektenbeet? | JA [] NEE [] |
| C. | Heeft u één of meerdere ouder(e) kind(eren) die ooit allergisch hebben Gereageerd op een wespen- of andere insektenbeet? | JA [] NEE [] |

Vraag 10

- | | | |
|----|--|----------------|
| A. | Heeft u ooit allergische klachten (zoals bovengenoemd (vraag 7) gehad tijdens uitoefening van werk of hobby? Zo ja, kunt u aangeven waarop u allergisch reageerd?..... | JA [] NEE [] |
| B. | Heeft uw echtgenoot / partner ooit allergische klachten (zoals bovengenoemd (vraag 7) gehad tijdens uitoefening van werk of hobby? Zo ja, kunt u aangeven waarop hij allergisch reageerd?..... | JA [] NEE [] |
| C. | Heeft u één of meerdere ouder(e) kind(eren) die ooit allergisch gereageerd hebben tijdens knutselen, uitoefening van hobby's? Zo ja, kunt u aangeven waarop?..... | JA [] NEE [] |

Dit is het einde van de vragenlijst. Hartelijk dank voor het invullen!

Bijlage II

Informatiebrief m.b.t. de PANDA studie: “Primaire preventie van astma en allergie door perinatale toedieningen van probiotica”

Geachte Mevrouw, Heer,

U heeft gereageerd op de advertentie waarin u gevraagd wordt deel te nemen aan een wetenschappelijk onderzoek naar de mogelijkheden om de ontwikkeling van astma en allergie reeds op zeer jonge leeftijd te voorkomen. Het is voor deelname aan wetenschappelijk onderzoek vereist dat u een schriftelijke verklaring geeft dat u volledig over het onderzoek bent ingelicht en dat u bereid bent om mee te werken. Dit wordt “informed consent”, ofwel “geïnformeerde toestemming genoemd. U zult uitgelegd krijgen wat de opzet is van het onderzoek, wat uw medewerking precies zal inhouden en wat de mogelijke risico's zijn. Ook zal u worden uitgelegd hoe er met de resultaten van het onderzoek wordt omgegaan zodat uw privacy gewaarborgd is. In de nu volgende tekst kunt u nalezen wat deelname aan het onderzoek inhoudt.

Achtergrond van het onderzoek

Astma en allergie komen steeds meer voor in Westerse landen, met name bij kinderen. We denken dat dit komt doordat kinderen en mensen in het algemeen tegenwoordig te weinig afweer ontwikkelen tegen bijvoorbeeld bacteriën, of met andere woorden, dat we tegenwoordig te “schoon” leven. Dat astma en allergie mogelijk iets met het doormaken van infecties te maken heeft, blijkt uit de waarneming dat in ontwikkelingslanden, waar kinderen veel (ernstige) infecties doormaken, er relatief weinig astma en allergie voorkomt. Het is daarom misschien mogelijk om met onschuldige bacteriën (waar je dus niet ziek van wordt) het afweersysteem te beïnvloeden. Dit zou betekenen dat je door toediening van onschuldige bacteriën aan kinderen die een grote kans hebben astma of allergie te krijgen, ervoor kan zorgen dat deze kinderen daar geen of minder last van zullen krijgen.

De onschuldige bacteriën die in dit onderzoek gebruikt gaan worden heten probiotica. Dit zijn bacteriën die normaal ook te vinden zijn (als onschuldige bacteriën) in onze darm.

Doel van het onderzoek

Het uiteindelijke doel van dit onderzoek is om de ontwikkeling van astma en allergie te voorkomen of te verminderen bij kinderen die een hoog risico hebben op het ontwikkelen hiervan. Hierbij zijn we op zoek naar een eenvoudige en veilige manier om deze aandoeningen te voorkomen. Door probiotica of placebo (= geen probiotica) te geven aan zwangere vrouwen in de laatste 8 weken van de zwangerschap en vervolgens aan hun pasgeborenen gedurende 1 jaar en deze 2 groepen (wel of geen probiotica) met elkaar te vergelijken, kunnen we onderzoeken of de kinderen die wel probiotica hebben gekregen inderdaad geen of minder klachten van astma of allergie krijgen dan de kinderen die geen probiotica hebben gehad.

Belang van het onderzoek

In de afgelopen 20-30 jaar komen astma en allergie steeds meer voor in Westerse landen. Voor ons in Nederland betekent dit dat 1 op de 3 kinderen tot de leeftijd van 18 jaar in meer of mindere mate klachten krijgt van astma of allergie (bijvoorbeeld voedselallergie, hooikoorts). Met name kinderen, van wie de moeder klachten heeft van astma of allergie of uit gezinnen waarin de vader plus een ouder kind deze klachten hebben, hebben een verhoogd risico (30-70%) om ook klachten van astma of allergie te krijgen. Tot nu toe zijn we hebben we alleen maar medicijnen die klachten van astma of allergie kunnen verminderen. We kunnen astma of allergie niet genezen. Daarom is het belangrijk om te onderzoeken of we astma en allergie bij kinderen op een veilige en eenvoudige manier kunnen voorkomen en daar is dit onderzoek voor bedoeld.

Wie kunnen er mee doen?

Kinderen met een verhoogde kans om het ontwikkelen van astma of allergie kunnen meedoen aan dit onderzoek. Dit zijn kinderen met een astmatische of allergische moeder, of een astmatische of allergische vader én een astmatisch of allergisch broertje of zusje. De onderzoekster zal voordat u toestemming geeft voor deelname aan dit onderzoek een vragenlijst van astma en allergie met u doornemen of u of uw gezin kunnen deelnemen aan het onderzoek. Omdat we deze kinderen zo vroeg mogelijk bloot willen stellen aan de probiotica en in navelstrengbloed willen kijken naar tekenen van allergie, willen we de moeders al tijdens de zwangerschap probiotica gaan geven. Daarom vragen we (aanstaande) ouders al tijdens de zwangerschap of ze met hun kind mee willen doen.

Methoden en duur van de studie

Voor een goede opzet van wetenschappelijk onderzoek is het nodig om twee groepen te maken, namelijk een groep die probiotica krijgt (probiotica groep) en een groep die geen probiotica krijgt (placebo groep). Het lot bepaalt of u en uw kind in de probiotica groep of in de placebo groep komen. Om het onderzoek zo eerlijk mogelijk te laten verlopen weten zowel u als de onderzoekster niet in welke groep u en uw kind zitten. Het onderzoek duurt in totaal 2 jaar (totdat uw kind 2 jaar is geworden).

Wat gebeurt er voor en tijdens de behandeling

Twee maanden voor de uitgekende datum wordt een intakegesprek gepland. Daarin wordt het onderzoek uitgebreid besproken. Afhankelijk van de groep waarin u terecht bent gekomen krijgt u de laatste 8 weken van de zwangerschap probiotica of placebo om dagelijks in te nemen. U moet hiermee stoppen na de bevalling. Vanaf het moment dat uw kind geboren is en zijn eerste voeding gaat krijgen moet hij / zij ook dagelijks probiotica of placebo door u toegediend krijgen. Het maakt hierbij niet uit of u borstvoeding of flesvoeding geeft. U bent dus vrij om te kiezen tussen borstvoeding of flesvoeding. Tot de leeftijd van 1 jaar moet uw kind dagelijks de probiotica of placebo van u krijgen. Na zijn / haar eerste verjaardag moet u stoppen met het toedienen hiervan. Tijdens de 2 jaar van het onderzoek wordt 3 maal de polikliniek van het Wilhelmina Kinderziekenhuis van het UMC Utrecht bezocht. Als u kind 3 maanden, 1 jaar en 2 jaar is komt u voor een bezoek naar het ziekenhuis. Er worden dan vragenlijsten afgenomen, er wordt lichamelijk onderzoek gedaan en bloed afgenomen (na verdoving van de huid met zalf). Op de leeftijd van 2 jaar zal er bij u kind met huidpriktesten onderzoek gedaan worden naar allergie. Tevens zullen we u vragen om regelmatig (vanaf dag 2 post partum 1x/week gedurende 4 weken, na staken probiotica/placebo op leeftijd 12 maanden 1x/week gedurende 4 weken, afname 1 faecesportie op de leeftijd van 3, 18 en 24 maanden) wat ontlasting van uw kind in te sturen. Indien u interesse heeft in deelname aan dit onderzoek, zal de onderzoekster met u het schema van de studie uitgebreid doornemen. Wilt u meer informatie dan kunt u haar telefonisch bereiken zoals vermeldt aan het einde van deze informatiebrief.

Wat zijn de mogelijke voor- en nadelen

Deze studie is verbonden met het recent geopende Centrum voor Kinderallergologie.

Aangezien uw kind een verhoogd risico heeft op het ontwikkelen van astma of allergie is het voordeel van deelname aan deze studie dat eventuele klachten hiervan vroegtijdig onderkend kunnen worden, dat er vroegtijdig adequate behandeling gestart kan worden en zo nodig contacten kunnen worden gelegd met kinderarts, dermatoloog of diëtiste.

Er zijn voor u geen nadelen verbonden aan deze studie. Voor uw kind zijn de nadelen dat hij / zij tijdens het onderzoek drie maal het ziekenhuis moet bezoeken voor lichamelijk onderzoek en bloedprikken. De belasting van het lichamelijk onderzoek is minimaal. Om de nadelen van het prikken zo minimaal mogelijk te houden wordt uw kind geprikt door iemand met ervaring in het prikken van kinderen. Tevens zal de plek waar geprikt zal worden eerst verdoofd worden met zalf.

Wat zijn de risico's van deelname aan dit onderzoek

Er zijn geen risico's verbonden voor u of uw kind aan deelname aan dit onderzoek. Probiotica zijn zoals eerder vermeldt, onschuldige bacteriën die normaal in de darmflora voorkomen. Probiotica worden algemeen beschouwd als veilig bij volwassenen en kinderen. Daarnaast worden probiotica steeds meer gebruikt in alledaagse zuivelproducten. De bacteriën die u en uw kind in dit onderzoek zullen krijgen zijn reeds veelvuldig gebruikt in zuivelproducten en hiervan zijn geen infecties of andere vervelende bijwerkingen van bekend.

Vervolgonderzoek

Omdat de diagnose van astma en allergie op de leeftijd van 2 jaar lastig te stellen is, is het mogelijk dat we u in de toekomst verzoeken om deel te nemen aan een kort vervolgonderzoek, waarbij we uw kind éénmalig op de leeftijd van 5 jaar terug zullen zien.

Vertrouwelijkheid van gegevens

Uw persoonsgegevens zullen niet worden gebruikt. U krijgt bij deelname aan dit onderzoek een zogenaamd studienummer, waaronder alle gegevens die verzameld worden tijdens dit onderzoek zullen worden opgeslagen. Alleen de onderzoekers hebben toegang tot de informatie die uw persoonsgegevens verbindt aan uw studienummer. Tevens zullen bij eventuele publicatie van onderzoeksgegevens uw persoonsgegevens niet gebruikt worden, waardoor uw privacy gewaarborgd blijft. De gegevens en materialen, zoals bloed, verzameld tijdens dit onderzoek zullen voor geen ander doel gebruikt worden dan dit onderzoek. Overgebleven materialen

zullen wel worden opgeslagen onder vermelding van uitsluitend uw studienummer om eventuele nieuwe vragen tijdens deze studie in te kunnen onderzoeken.

Stoppen van de studie

Uw deelname en die van uw zoon / dochter aan deze studie is geheel vrijwillig en u en uw zoon / dochter kunnen zich op ieder moment uit dit onderzoek terugtrekken. Uw behandelend arts heeft het recht, ook zonder uw toestemming, deze studie of deelname van u en uw zoon / dochter aan de studie op ieder moment te stoppen. Wanneer u besluit niet deel te nemen of wanneer u of uw zoon / dochter zich vroegtijdig terugtrekt uit het onderzoek, zal dit geen gevolgen hebben voor uw of uw zoon / dochter behandeling in het UMC Utrecht.

Aansprakelijkheid

Het UMC Utrecht heeft, als verrichter (opdrachtgever) van dit onderzoek, een risicoverzekering afgesloten voor proefpersonen die meedoen aan wetenschappelijk onderzoek. Voor meer informatie over de verzekering verwijst ik u naar de bijlage behorend bij deze brief.

Klachten

Hoe te handelen bij klachten?

Als u klachten heeft over het onderzoek, kunt u dit melden aan de onderzoeker. Wilt u dit liever niet, dan kunt u contact opnemen met het Bureau Patiëntenservice.

Patiëntenservice locatie WKZ is te vinden op de eerste verdieping naast het opnamebureau, tel. 030-2504468

Administratieve gang van zaken

Dit onderzoek is voorgelegd aan en goedgekeurd door de Raad van Bestuur van het UMC Utrecht op advies van de Medisch Ethische Toetsingscommissie en zal uitgevoerd worden volgens de richtlijnen van de 'Verklaring van Helsinki' (Amendement van Edinburgh 2000).

Nadere informatie

Wanneer u nog vragen heeft over dit onderzoek kunt u zich wenden tot de onderzoekers:

Titia Niers, arts-assistent Kindergeneeskunde UMCU, 030-2504000, pieper 5063

Dr. M.O. Hoekstra, kinderarts UMCU, 030-2504001.

Tevens kunt u uitgebreide informatie over dit onderzoek vinden op de website www.pandastudie.nl

Indien u wilt overleggen met een onafhankelijk arts, die niet bij de uitvoering van het onderzoek betrokken is, kunt u contact opnemen met Dr. T. Wolfs, kinderarts UMCU, 030-2504001.

Tenslotte hartelijk dank voor uw aandacht en eventuele medewerking.

Met vriendelijke groet,

Titia Niers, arts-assistent Kindergeneeskunde, UMCU

Dr. M.O. Hoekstra, kinderarts, UMCU

Bijlage III

Toestemmingsverklaring voor deelname aan de PANDA studie: “ Primaire preventie van astma en allergie door perinatale toediening van probiotica”

Er is mij uitgelegd wat het doel en de opzet van deze studie zijn. Ik heb de tijd gehad om een en ander te overdenken en vragen te kunnen stellen over deelname van mezelf en mijn aanstaande zoon / dochter * aan deze studie.

Ik begrijp dat deelname aan dit onderzoek geheel vrijwillig is en dat ik op elk moment mijn toestemming in kan trekken.

Ik weet dat mijn medische gegevens en de medische gegevens over mijn zoon / dochter *, die van betekenis zijn voor dit onderzoek, gebruikt worden voor wetenschappelijke doeleinden en eventueel gepubliceerd worden. Hiermee ga ik akkoord op voorwaarde dat de privacy van mij en van mijn zoon / dochter * gewaarborgd wordt.

Ik wil dat mijn wel / niet* op de hoogte wordt gesteld van mijn deelname en de deelname van mijn zoon / dochter * aan deze studie.

Ik wil wel / niet* geïnformeerd worden over de resultaten van het onderzoek na afronding van het onderzoek.

Ik heb uitgelegd gekregen dat mijn zoon / dochter na afloop van dit onderzoek opnieuw benaderd kan worden voor mogelijke vervolgonderzoek op latere leeftijd. Ik geef hierbij mijn toestemming dat dit verzoek gedaan mag worden.

Ik geef hierbij uit vrije wil toestemming dat ik en mijn zoon / dochter * deelnemen aan het onderzoek.

Naam Ouder / Vertegenwoordiger 1.:

Datum:

Handtekening:

Naam Ouder / Vertegenwoordiger 2.:

Datum:

Handtekening:

Ik, ondergetekende, bevestig hierbij dat deze studie zowel mondeling als schriftelijk aan de ouder(s) of wettelijke vertegenwoordiger van bovengenoemde deelnemer is uitgelegd.

Naam Arts / Onderzoeker:

Datum:

Handtekening:

* Doorhalen wat niet van toepassing is.

Bijlage IV

Bijlage bij proefpersooninformatie indien de proefpersonenverzekering van het UMC Utrecht van toepassing is voor het onderzoek (PANDA studie)

Geachte heer, mevrouw,

U denkt er over na om mee te doen aan een wetenschappelijk onderzoek waaraan in meer of mindere mate risico's verbonden zijn. In verband met de Wet Medisch wetenschappelijk Onderzoek met mensen treft u hierbij aanvullende informatie aan betreffende de verzekering die in verband met de studie ten behoeve van alle proefpersonen is afgesloten.

Het UMC Utrecht heeft, als verrichter (opdrachtgever) van dit onderzoek¹⁾, een risicoverzekering afgesloten voor proefpersonen die meedoen aan wetenschappelijk onderzoek. De verzekering is afgesloten bij Marketform Limited te Londen onder het polisnummer L030082.

Deze verzekering dekt schade door dood of letsel die het gevolg is van deelname aan het onderzoek, en die zich gedurende de deelname aan het onderzoek openbaart, of binnen vier jaar na beëindiging van de deelname aan het onderzoek. De schade wordt geacht zich te hebben geopenbaard wanneer deze bij de verzekeraar is gemeld.

De verzekeraar van het onderzoek is:

Naam: Marketform Ltd
Adres: One Lime Street 783, LONDON EC3M 7HA

In geval van schade kunt u contact op nemen met de schaderegelaar:

Naam: C en E Verzekeringen
De heer H. Melinga
Adres: Herculesplein 5
Telefoonnummer: 030 - 25 60 406
Fax: 030 - 25 60 250
E-mail: verzekering@cene.nl

De verzekering biedt een maximum dekking van € 450.000 per proefpersoon en € 3.500.000 voor het gehele onderzoek, en € 5.000.000 per jaar voor alle onderzoeken van dezelfde opdrachtgever. De dekking van specifieke schades en kosten is verder tot bepaalde bedragen beperkt. Dit is opgenomen in het Besluit verplichte verzekering bij medisch-wetenschappelijk onderzoek met mensen. Informatie hierover kunt u vinden op de website van de Centrale Commissie Mensgebonden Onderzoek: www.ccmo.nl.

Voor deze verzekering geldt een aantal uitsluitingen. De verzekering dekt niet:

- schade waarvan op grond van de aard van het onderzoek zeker of nagenoeg zeker was dat deze zich zou voordoen;
- schade aan de gezondheid die ook zou zijn ontstaan indien u niet aan het onderzoek had deelgenomen;
- schade die het gevolg is van het niet of niet volledig nakomen van aanwijzingen of instructies;

¹⁾ Doorhalen indien niet van toepassing.

- schade aan nakomelingen, als gevolg van een nadelige inwerking van het onderzoek op u of uw nakomeling;
- bij onderzoek naar bestaande behandelmethoden: schade die het gevolg is van één van deze behandelmethoden;
- bij onderzoek naar de behandeling van specifieke gezondheidsproblemen: schade die het gevolg is van het niet verbeteren of van het verslechteren van deze gezondheidsproblemen.

Bijlage V

SERIOUS ADVERSE EVENTS (SAE) REPORT

Instructies: Vul dit formulier volledig in z.s.m. na melding van ongewenste bijwerking of SAE en stuur het formulier ter beoordeling op naar Dr. T. Wolfs en METC UMC Utrecht (zie pag. 2)

Melding: ☐ Initieel ☐ Follow-up Datum:...../...../..... Plaats:..... Studienummer deelnemer:..... Initialen deelnemer:..... Geboortedatum:...../...../..... Geslacht: ☐ man ☐ vrouw Formulier ingevuld door:.....	Persoonsgegevens onderzoeker: Naam:..... Adres:..... Telefoon:..... E-mail:..... Handtekening onderzoeker: Datum:...../...../.....
--	---

Beschrijving van adverse event:

Datum **start symptomen:**/...../.....

Datum **einde bijwerking:**/...../.....

Ernst	Relatie tot studie product *	Studie status: status van deelnemer tgv bijwerking/SAE	Uitskomst
☐ Mild ☐ Matig ☐ Ernstig ☐ Levensbedreigend	☐ Definitief ☐ Waarschijnlijk ☐ Mogelijk ☐ Waarschijnlijk Niet ☐ Geen relatie	☐ Toediening product reeds afgerond ☐ Toediening product voortgezet ☐ Toediening product gestaakt ☐ Deelname studie gestopt door onderzoeker	☐ Duurt nog voort ☐ Rest verschijnselen ☐ Hersteld ☐ Overlijden ☐ Onbekend

* Als toevoeging, denkt u dat de bijwerking/SAE gerelateerd is aan één van het volgende. Zo ja, licht dit toe :

- | | |
|---|--|
| ☐ Ander product gelijktijdig ingenomen met studieproduct | Ja ☐ Nee ☐ |
| ☐ Procedure van toediening | Ja ☐ Nee ☐ |
| ☐ Andere verdachte oorzaak | Ja ☐ Nee ☐ |

Kruis alles aan wat betreft de bijwerking/SAE van toepassing is:

- ☐ Resulteerde in overlijden...../...../..... (datum van overlijden)
- ☐ Was levensbedreigend
- ☐ Leidde tot ziekenhuisopname
- ☐ Leidde tot blijvende of tijdelijke handicap
- ☐ Was medisch niet relevant

SERIOUS ADVERSE EVENTS (SAE) REPORT (vervolg)

Datum...../...../.....	Studienummer deelnemer.....
------------------------	-----------------------------

Studie product: Geef details over het studie product, of controle als de interventie geblindeerd is				
Studie product	Hoeveelheid	Route	Schema	Datum
			Eerste gift	/...../.....
			Tweede gift	/...../.....
			Derde gift	/...../.....
			Andere gift	/...../.....
Toegevoegd product: Geef details over het product dat ten behoeve van toediening van het studie product wordt toegevoegd aan het studie product.				
Toegevoegd product	Hoeveelheid	Route	Schema	Datum
			Eerste gift	/...../.....
			Tweede gift	/...../.....
			Derde gift	/...../.....
			Andere gift	/...../.....
<i>Ruimte voor aanvullende opmerkingen</i>				

Stuur het volledig ingevulde formulier naar Dr. T. Wolfs, Algemene Kindergeneeskunde, huispostnummer KE 04 133.1 en een copy van het formulier naar de METC UMC Utrecht, huispostnummer D 01.343.

PANDA STUDY



Probiotics AND Allergy

*Primary prevention of asthma and allergy
by supplementation of probiotics in early life*

ENGLISH SUMMARY

The date of the original protocol was January 2004

SUMMARY

Background. Atopic diseases are increasing in countries with a Western lifestyle. The hygiene hypothesis states that the increase in atopic disease could be due to reduced exposure to microbial antigens in early in life. In search of new preventive therapies for atopic disease, exposure of pregnant women with previous or recent atopic disease, and their offspring to probiotics has been suggested. Probiotics are mono or mixed cultures of microbes which, when applied to animal or man, can beneficially affect the host, among others by inducing an immune response. Probiotics are generally accepted to be safe in children. Probiotics have shown to be effective in primary prevention of atopic disease in high-risk neonates in one study so far. However, it is still unclear by what mechanism probiotics work and which is the most immunopotent (combinations of) probiotic(s). It is likely that antigen-presenting cells (APC's) are involved, since these cells are important in the first line of defence in the gastrointestinal tract. It can be imagined that the immune response is the result of the interplay between probiotics and APC's. In particular, the match between pathogen-associated molecular patterns (PAMP's) on probiotics and their counterparts on APC's, the pathogen-recognition-receptors (PRR's) (like for instance Toll-like receptors) is decisive in this aspect.

Hypothesis. Administration of probiotics to pregnant women and their offspring may reduce the development of sensitization as well as the onset of atopic disease in their offspring.

Aim. To study the effect of probiotics on sensitisation and the prevalence of atopic disease, the severity of atopic disease, the intestinal flora and immune parameters in high-risk newborns.

Methods. To study this hypothesis, a randomised, double-blind placebo-controlled trial will be carried out by administration of probiotics to pregnant women with previous or recent atopic disease as well as to their offspring. Primary outcome parameters are firstly the prevalence and severity of sensitization and atopic disease in the offspring during a follow-up of two years. Secondary outcome parameters are the change in stool composition during treatment with probiotics and in-vitro production of cytokines by PBMCs collected at 3 months, 1 year and 2 years of age.

Expected results. Perinatal administration of probiotics to pregnant women and their offspring may hamper the development of sensitization and atopic disease in their offspring. This may be due to modulation of the intestinal microbiota composition, and modulation of the developing immune system.

DESCRIPTION OF THE STUDY:

Background

Allergy

Atopic disease adds considerably to childhood morbidity. The cumulative prevalence during childhood is estimated to be 20 to 30%.¹ Moreover, in several countries (especially with a Western lifestyle) the prevalence of atopic disease has increased during the last decades.² This increase in atopic disease may be explained by a decreased exposure to microbial antigens, which are presumed to be obligatory for a "normal" development of the innate and adaptive immune system (*the hygiene hypothesis*).³ Allergy is considered to be an immune-mediated disease: the inflammatory response is characterised by a Th2-predominance.⁴ Increased exposure to microbial antigens by administration of probiotics may be a way to down-regulate the Th2-response. As a result, the increasing prevalence of atopic and immune-mediated disease may be suppressed as well.³

Probiotics

Probiotics are defined as "live microbial, food ingredients that are beneficial to health by promoting the endogenous host defense mechanisms".⁵ Probiotics are generally considered to be safe since they belong to the normal human intestinal flora.⁶ In children with acute infectious diarrhoea, probiotics are generally accepted to be effective in reducing both quantity and frequency of the diarrhoea. Moreover, in these trials probiotics have proved to be safe; no adverse effects have been reported.⁷ Circumstantial evidence for a beneficial effect of probiotics on atopic disease comes from epidemiological studies. Björkstén has shown that the prevalence of atopic disease was lower in children from Estland compared to Sweden, and that the faeces of the former group contained more Lactobacilli, which is a probiotic.⁸ Subsequently, in a randomised controlled trial Kalliomäki showed that administration of Lactobacillus GG to pregnant women during the last 6 weeks of gestation and subsequently in their high-risk offspring during the first six months of life reduces the incidence of atopic eczema by almost 50%.⁹ Recently, four year follow-up data were published. At the age of four the odds ratio for eczema was still around 50% for the intervention group compared to the placebo group.¹⁰ No difference in the incidence of asthma and rhinitis and number of positive skin prick tests was found between the two groups. Suggesting that treatment with LAB GG results in a reduction of the rate of non-atopic eczema rather than atopic dermatitis.¹¹ Nevertheless, the exact mechanism by which probiotics exert their effect is as of yet unknown. Several mechanisms have been proposed to contribute to the probiotic effect, mostly generated from animal studies: direct interfering with antigen transport by stabilisation of the gut microflora, enhancement of the humoral immune response (thereby promoting the intestine's immunologic barrier) and stimulation of the non-specific host resistance to microbial pathogens (thereby stimulating immune elimination).^{12,13}

Antigen-Presenting-Cells (APC's)

APC's are among the first line of defence in the mucosa of the human body. In the inflammatory response, APC's mediate between the environment and the second line of defence, the orchestrating T-cells. Recently, it has been suggested that 'pattern recognition receptors' on APC's can recognise microbes carrying specific pathogen-associated-molecular-patterns (PAMP's). One example of such a 'pattern-recognition-receptor (PRR)' is the family of Toll-like receptors (TLR's), which may play an important role in the contact between APC's and probiotics.^{14,15} Polymorphisms in TLR's have indeed been described in humans.¹⁶ Therefore, it can be imagined that polymorphisms in TLR's contribute, and may even be decisive, to the occurrence of disease, as well as to the individual response to treatment. It has long been believed that only T-cells orchestrate the direction of the immune response.¹⁷ Recently, this view has been adapted, since APC's can be divided into type1- and type2-cells. By differentiation into either APC1 (Dendritic cell type 1 – DC1-cell) or APC2 (DC2- cell), these cells can skew the immune response into a Th1- or Th2-direction.¹³ Moreover, DC's can induce regulatory T-cells. Therefore, it is current belief that APC's not only transfer signals from antigens to T-cells, but that they actively contribute to the direction of the inflammatory response.¹⁸ Since APC's from the lungs and the gut cannot be obtained non-invasively, APC's will be developed in vitro from monocytes from cord blood, as previously described.¹⁹ We assume that pre-APC's from atopic patients are already primed due to the presence of cytokines and chemokines in utero.

T-cells

T-cells can be divided into suppressor T-cells and helper T-cells (Th-cells). Th-cells are characterised as Th1-cells and Th2-cells based on their production of cytokines. Th1-cells mainly produce IL2 and IFN γ and are involved in intracellular infections. Th2-cells mainly produce IL4, IL5 and IL-13 and are mediators in extracellular infections, helminth infections and atopic disease. Within this Th1/Th2-concept two principles are important: Th1- and Th2-cells stimulate their own proliferation and stimulation (autocrine stimulation) and inhibit each others proliferation and differentiation (reciproque inhibition).²⁰ In atopic disease, the immune response is skewed towards a Th2-response.¹⁵ Although the Th1/Th2-concept is useful in understanding the pathophysiology and considering therapeutic strategies, it is in general too simplified to explain the pathophysiology of inflammatory diseases. Recently, the presence of Th0-, Th3- and Tr1-cells has been shown.²¹ Th0 cells are considered to be immature T-cells, not yet differentiated with respect to cytokine production. Th3- and Tr1-cells are regulatory T-cells (T-reg cells), formerly called suppressor T-cells, which play an important role in the development of tolerance. In that way, these T-reg cells contribute to immune homeostasis. Th3-cells can be induced by pulmonary DC's that produce IL10, and Tr1-cells can be induced by DC's from the gut by production of TGF β . Th3- and Tr1-cells may downregulate the immune response by production of cytokines.²²

The ontogeny of allergic disease

The intrauterine environment is Th2-skewed in all pregnancies to prevent the foetus from stillbirth. The development of sensitisation is, therefore, not thought to be due to Th2-skewing, but to an inability to respond to environmental stimuli that must evoke the necessary switch to Th1/Th2 equilibrium.²³ One of the cells necessary to realise this switch may be the regulatory T-cell.^{24,25} It can be hypothesised that sensitisation takes place due to insufficient formation of regulatory T-cells. Therefore, acquisition of an increased number of regulatory T-cells could be essential in preventing or suppressing the onset of allergic disease in high-risk new-borns.

Primary or Tertiary (treatment) prevention of allergic disease

So far, it has been accepted that allergy and asthma are inflammatory diseases dominated by a Th2-immune response. Prevention or treatment of these diseases should consist of suppressing the Th2-response or the induction of a counteractive Th1-response. Several IFN γ -generating (i.e. Th1-inducing) treatment strategies have been described, like administration of live or dead bacteria, CpG-oligodinucleotides or combinations of interleukines, either alone or in combination with allergen (allergen-specific immunotherapy). Besides IFN γ -generation, induction of Th2-cell anergy or Th2-cell suppression by induction of regulatory T-cells are suggested.^{26,27} If allergic disease is caused by a failure of early instigation of regulatory T-cells, than induction of these cells could be the aim of primary prevention of allergic disease. Probiotics have shown to be associated with a decline in the prevalence of atopic dermatitis in infancy. This could be due to the induction of regulatory T-cells in the intestine, which secrete chemo- and cytokines that downregulate Th2-responses on APC- and T-cell-level. The hypothesis of induction of regulatory T-cells by probiotics is substantiated by increased levels of TGF- β (produced by regulatory T-cells) in breast milk of pregnant women receiving probiotics.²⁸

Timing

Several studies indicate that sensitisation may already take place in utero.^{29,30} It has so far not yet been decided whether pre- or postnatal administration of probiotics is equally effective. To modulate successfully the immune system of new-borns, there seems to be a "window of opportunity" within the first six months of life. However, to modulate the immune system by influencing the colonisation of the intestinal flora the first week of life is crucial.³¹

Aim

The aim of this study is firstly to establish the effect of early administration of probiotics on the development and severity of allergic disease in the offspring. Secondly, we will study the effect on the microbial colonisation of the intestinal tract, the effect on the T-cell response and the association with the TLR-repertoire on APC's .

Hypotheses

Administration of probiotics to allergic pregnant women and their high risk-offspring results in:

- a reduction of sensitisation and incidence or severity of atopic disease in the offspring
through:
- a permanent presence of probiotics in the intestine, followed by induction of regulatory T cells in the intestinal wall, the draining lymph nodes and in the peripheral blood, depending on the presence of the TLR-repertoire on APC's.

Research questions

Does administration of probiotics to pregnant women with allergic disease and to their high-risk offspring result in:

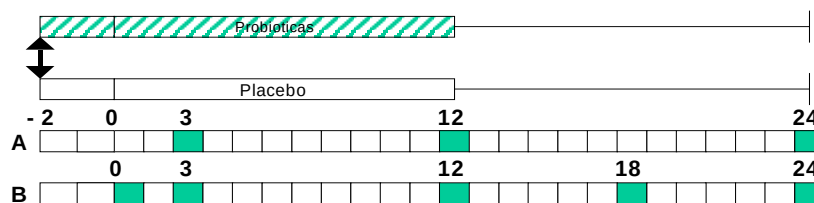
1. a reduction of the prevalence and severity of allergic disease?
2. a permanent presence of probiotics in the intestine?
3. a T-reg cell response in the peripheral blood of the infants?
4. Does the development of this response depend on the presence and function of a certain repertoire of TLR's on APC's?

Design, methods and timetable

Study Design

This study concerns a randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial in pregnant women with previous or recent allergic disease and their offspring at risk for the development of allergic disease (see below). Probiotics or placebo will be administered to the pregnant women on a daily basis from four before the expected delivery. Newborns will receive either probiotics or placebo, depending to which group the mother has been at random allocated, during their first year of life. Follow-up is done until the second birthday.

Study Design – Time Table



- Time indicated in months
- 0 = time of birth
- Randomisation at time point -2 months
- A = follow-up visits + peripheral blood investigations
- B = collecting fecal samples

Patients

Inclusion criteria

Eligible are pregnant women who ever or recently suffered from allergic disease, like food allergy, allergic eczema, asthma or rhinitis. Or families in which the father as well as at least one sibling suffers from allergic disease.

Families in which an older child is affected with cow's milk allergy can not be included because in the Netherlands it is generally accepted to start from birth with hydrolysed formulas in siblings.

Exclusion criteria

Antenatal systemic use of immunomodulatory drugs, like corticosteroids.
Regular use of products containing probiotics.

Feeding

Participating women are allowed to choose between breast-feeding or infant formula. In case of infant formula, participants will be asked to agree on using the same formula among all non-breast-feeding participants, in order to avoid too much heterogeneity in feeding.

Methods

Independent variables

Probiotics (strain(s)) will be selected based on the results of the animal study [8] and the in-vitro study [9]. Probiotics will be administered to mothers from 4 weeks before expected delivery and to the neonates till the end of the first year of life, in a daily dose of 1×10^{10} cfu. Probiotics will be prepared and provided by Winclove Bioindustries bv, Amsterdam.

Execution

Once inclusion is secured an appointment is made at the 7th month of pregnancy. At that time, pregnant women will visit the out-patient department (OPD), inclusion is formalised and women are allocated to one of the study groups by computer randomisation. Participants start using probiotics and fill in daily record cards at home to monitor the use of any diet and drugs. By telephone, the father will be asked to inform the researcher or one of the senior investigators about the birth of the offspring. Just after birth, cord blood will be collected (by the obstetric nurse, the general practitioner) and will be brought to the laboratory to determine base-line immune parameters for the offspring (we have ample experience with this procedure in the BCG-study). The newborn will be allocated to the same treatment group (either probiotics or placebo) as the mother. The father can collect the study drug for the newborn. The parents fill in a daily record card for the baby with respect to symptoms of infectious and allergic disease as well as the use of any diet and drugs. When the child reaches the age of 3, 12 months and 2 years the parents visit the OPD for a medical history, physical examination and blood sampling. The general practitioner will be asked by mail to deliver information on diagnosis of any allergic disease.

Outcome variables

All variables will be determined in the offspring. The outcome variables will be described in order of the research questions

1. Does administration of probiotics to pregnant women with allergic disease and to their high-risk offspring result in a reduction of the prevalence and severity of allergic disease in the offspring ?

The incidence of allergic disease is the primary outcome criteria and is defined as follows (Laan MP, et al. Markers for early sensitisation and inflammation in relation to clinical manifestations of atopic disease up to 2 years of age in 133 high-risk children. Clin Exp Allergy 2000;30:944-53) :

- **eczema** – eczema (or atopic dermatitis) is based on Sampson's criteria: erythema, oedema, oozing and excoriation with evidence of itchiness lasting longer than 4 weeks (Sampson HA. Pathogenesis of eczema. Clin Exp Allergy 1990;20:459-67). The severity will be measured by using the Scoring Atopic Dermatitis (SCORAD) (Sprikkelman AB, et al. Severity scoring of allergic dermatitis: a comparison of three scoring systems. Allergy 1997;52:944-9).
- **food allergy** – food allergy is diagnosed clinically by the presence of erythematous, papular, macrovesicular skin eruptions, diarrhoea, vomiting, or respiratory problems in relation to food ingestion. For the definite diagnosis an elimination/provocation/re-elimination procedure is necessary. A positive skin test or increased specific IgE are considered supportive.
- **asthma** – asthma is difficult to define in children younger than 2 years.. For bronchusobstructive disease in infants younger than 3 years of age, 3 different phenotypes can be distinguished. (Martinez FD. Development of wheezing disorders and asthma in pre-school children. Paediatrics 2002;109(S2):362-7). Of these, recurrent bronchus-obstructive complaints in the presence of atopy (defined as increased specific serum IgE) is likely to proceed to chronic asthma. Therefore, atopy present at or before the age of 2 in combination with recurrent periods of bronchusobstruction will be designated as asthma. At the age of 2, general practitioners as well as parents will be telephoned to make a definite diagnosis of asthma in each child prior to breaking the study randomisation code. A change in asthma will be scored as a decrease in the use of short acting β_2 agonists. Since a more definite diagnosis of asthma can be made at the age of 6, a follow-up of this cohort of children will be done. However, this will not be consistent with the duration of this project. Therefore, at the age of 6 diagnosis of asthma and other allergic disease will be evaluated by a ISAAC-questionnaire sent to the parents by mail.
- **rhinitis** – rhinitis is defined as recurrent periods of watery rhinorrhoea in combination with frequent sneezing and nasal itching, redness and tearing of the eyes. The diagnosis is confirmed by the

presence of either a positive skin test or an increased specific serum IgE. A change in disease severity will be scored as a decreased need of relieving drugs.

Symptom score

A daily record card will be kept, containing data on allergic disease, infectious disease (including gastro-enteritis), doctor's visits (and diagnosis), drug prescriptions and use, change of feeding habits. A detailed medical history will be taken with focus on symptoms of allergic disease on every planned visit to the out-patient department. A change in severity of allergic disease will be scored by a change in the use of drugs.

Physical examination

This will be performed every planned visit to the out-patient department with focus on asthma and allergic disease. A change of eczema will be evaluated using the SCORAD.

2. Does administration of probiotics to pregnant women with allergic disease and to their high-risk offspring result in a permanent presence of probiotics in the intestine ?

The presence of probiotics in the intestine will be measured as the microbial composition of the infants stool.

In order to answer this question we will collect:

- a. post-partum cultures of nose, anus, throat and umbilicus swabs.
- b. from the second day post partum faecal sample once weekly, for 4 weeks
- c. at the age of 12 months after ending the administration of probiotics again faecal samples once weekly for 4 weeks
- d. at the age of 3, 18 and 24 months faecal sample once

The human intestinal microflora is dominated by anaerobic micro-organisms, that are laborious and time-consuming to culture, and consequently many are still not yet cultured or described. Thus, the present study will use rapid modern molecular methods, based on the 16S rRNA gene, that are culture independent to monitor changes in the intestinal flora during the trial.

PCR and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S ribosomal DNA genes.

(Favier CF, Vaughan EE et al. *Molecular Monitoring of Succession of Bacterial Communities in human neonates. Appl Environ Microb* 2002;68:219-26)

This is a qualitative analysis by which dominant species in faecal samples can be determined and monitored during time. Faecal samples are collected by the parents at home, send to the hospital and frozen until further use. DNA will be isolated from faecal samples. Bacterial 16S rRNA will be amplified with PCR and the PCR fragments are separated by DGGE. The resulting profiles are used to monitor changes in the total microbiota over time.

Within this technique, specific bacterial populations like *Bifidobacteria* and *Lactic acid bacteria* can be determined with species specific PCR and DGGE. This implicates that the administered probiotic strain can be monitored.

Fluorescent *in situ* hybridisation (FISH) combined with flow cytometric analysis.

(Vaughan EE et al. *The intestinal Labs Antonie van Leeuwenhoek* 2002;82;341-52)

This is a quantitative analysis to identify and enumerate bacteria in complex ecosystems. Bacteria in the faeces are hybridised with fluorescent oligonucleotides (16S rRNA) probes, specific for a group of bacteria. Currently, six validated probes are available and among those for *Bifidobacteria*, *Lactic acid bacteria*, *Clostridium* and *Bacteroides*. With flow cytometric analysis labelled bacterial species can be differentiated from unlabeled bacterial populations.

3. Does administration of probiotics to pregnant women with allergic disease and to their high-risk offspring result in a T-reg cell response in the peripheral blood of the infants ?

Baseline parameters for participating neonates will be determined in cord blood. Follow-up visits are planned at the age of 3, 12 and 24 months, and peripheral blood will be drawn at these visits. Parameters will be described below.

IgE

Total and specific IgE concentrations will be determined by immunoCAP technique (Pharmacia, The Netherlands). Specific IgE against the 6 major allergens (milk, house dust mite, cat, dog, grass- and tree pollen) will be determined.

Cytokine determination

Cytokines will be determined in unstimulated and stimulated peripheral blood cells. Fresh blood will be diluted with RPMI medium (GIBCO/BRL). Cells will be stimulated with LPS and IFN- γ . After 18 hours, supernatant is collected for determination of cytokines. Cells will also be stimulated with medium (RPMI), CD2/CD28 and PHA. After 48 and 72 hours, supernatant will be collected. Proliferation of the cells will be determined at 48 and 72 hours with incorporation of 3H-thymide. The following cytokines will be determined by *Luminex* (de Jager et al., submitted): monoclonal antibody (specific for a certain cytokine) is bound specifically to Luminex polystyren microspheres (with a specific fluorescence pattern). Binding of the corresponding cytokine is visualized with a biotine labeled second antibody, directed against a non-overlapping epitope on the same cytokine. After incubation with streptavidine-phycoerythrine the fluorescence-intensity of the spheres is measured on the Bioplex system (BioRad). Because different Luminex spheres display different fluorescence characteristics, they can be used in a mixture (multiplex). In one sample (volume 50 microliter) 15 different cytokines can be determined simultaneously: interleukin 1 α (IL-1 α), IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18, γ -interferon and TNF- α . The sensitivity of the assay is comparable with a conventional ELISA, intra-assay CV <10%, interassay CV < 20%.

Morphology of mononuclear cells

To determine the phenotype of lymphocytes, mononuclear cells will be double stained with CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD45RO. To differentiate between Th1 en Th2-cells, expression of CD30, CCR3, CCR4, CCR5 and CCR8 will be determined. *Regulatory T-cells* will be differentiated using the markers CD4, CD25, CTLA-4, GITR, L-selectin, CCR-4, CD45RB and CD45RO. In regulatory T-cells, all these markers are expressed.

4. Does the development of this response depend on the presence and function of a certain repertoire of TLR's on APC's ?

APC's will be generated from the cord blood derived mononuclear cells from each participant, as we did in the research carried out this year in the in-vitro project (*"A comparison of the in-vitro effects of several strains of probiotics on antigen-presenting cells derived from cord-blood mononuclear cells derived from atopic and non-atopic children"*). In short, cord blood-derived monocytes will be seeded in 24 well culture plates (Costar, Cambridge, MA) at a density of 0.5×10^6 cells/ml. After 1 h incubation at 37C, non-adherent cells will be removed and adherent cells will be cultured in IMDM (Life Technologies, Paisley, UK) and 1% FCS (Hyclone, Logan, UT) supplemented with GM-CSF (500 IU/ml) and IL-4 (250 U/ml) to obtain DC. After 3 days the media including the supplements will be refreshed. After 6 days of culture, DC will be harvested and washed extensively before use. Purity and quality of the DC will be determined by FACS analysis using mAb against CD1a, CD3, CD14, CD40, CD115 and CD83. APC's will be frozen and stored until usage.

Subsequently the presence (expression) of TLR's on APC's will be determined by flow cytometry using antibodies to TLR's (currently commercially available: TLR2, -3, -4, -6 and -9).

The function of TLR's on APC's will be determined in-vitro by combining each participant's APC's, T-cells and exposing these cells to the probiotic used in this study. The T-cell response in the supernatants will be determined by Luminex as described above.

Statistics

The primary outcome parameter is the incidence of atopic disease in the high-risk offspring. For the power analysis we anticipate a 25% reduction in the cumulative prevalence of eczema in the intervention group, which implicates a number of 50 children in each of the treatment groups. This results in the inclusion of 120 pregnant high-risk women, including 20% drop-out. The SPSS package will be used to process the data. Stratification of the data will be done for maternal smoking, for current maternal eczema, and for infant feeding.

Probiotic Product

Probiotics are live micro-organisms which, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host (WHO 2002). Their precise mode of action is not well established, but they have been shown to reduce markers of intestinal inflammation and intestinal permeability in disease states, and this might change the way in which antigens present in the intestine are recognised by the immune system.

Selection criteria

In collaboration with Winlove Bio Industries B.V., Amsterdam, a multispecies probiotic product is designed based on the individual strain properties, mainly stability, surviving the GI-tract and antibiotic resistance. Out of 75 strains, 14 strains were selected (see Preliminary Research) for further characterization. A multispecies product was designed (in stead of a single strain) because of the possible symbiotic, strengthening effect the strains have on each other.

Selected strains

1. Bifidobacterium bifidum
2. Bifidobacterium Infantis
3. Lactococcus lactis

Administration

The probiotic product will be supplied once daily in a total amount of 3×10^9 Colony Forming Units (CFU) (which means 1×10^9 CFUs of each strain). The supplement will be dispensed as a stable powder in identical individually packed sachets containing 3 g of material. The contents of each sachet can be mixed with at least 10 ml of water, breast milk or infants formula, depending on the parents' preference, and ingested as a suspension.

The placebo product consists of the carrier of the probiotic product, i.e. rice starch and maltodextran.

Safety

Probiotics are generally accepted to be safe in children, and a number of probiotic strains are already incorporated in baby formulas. The frequently applied probiotic strains (Bifidobacteria, Lactobacilli) are considered to be commensal microorganisms, without pathogenic properties. Only well-known bacterial strains will be administered, used in food industry for producing food supplements and dairy products (cheese, yoghurt, quark). In general, probiotics are well accepted without major side effects. Feeling unwell because of excessive production of gas can occur. In case of Adverse Events during the treatment period, the Ethics Committee will directly be informed. Supplementation of the product can of course be terminated when necessary.

Preliminary Research

"In-vitro effects of probiotics on proliferation, morphology and cytokine production on cord-blood derived mononuclear cells from high-risk newborns".

In the *cord blood in-vitro study* we aimed to answer the question which probiotic(s) are the most immunopotent on human cells. Probiotics were provided by Winlove Bio Industries bv, Amsterdam.

Firstly, a selection of probiotics (14 strains) was based on tolerance to acid and bile, and adherence to the intestinal epithelium and inhibition of pathogens. Secondly, we investigated the effect of these strains by determination of cytokine production and proliferation of PBMCs from healthy volunteers. Results show that the different strains can be characterised by different profiles of cytokine production by PBMC's. Based on the assumption that the cytokine environment in both the intestinal tract and dendritic cells determines the direction of the immune response, we have further selected 3 strains with either a high production of IL-10 leading to a regulatory T-cell response, or strains that lead to a high production of pro-inflammatory cytokines or strains that induce a Th1 cell response.

Finally, we will culture APC's from cord-blood derived mononuclear cells from offspring from atopic and non-atopic mothers. These APC's will be exposed to the 3 different strains of probiotics and their influence on the cord-blood derived T-cells with respect to cytokine production will be determined. Based on these results we will choose which (combination) of probiotics strain(s) will be used in the primary prevention study.

Ethics

This study will be performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments and after approval by the Medical Ethics Committee of the UMC Utrecht. The UMC enclosed a subject insurance for scientific research participants. Parental written informed consent will be obtained.

Effectuation

The study will be conducted by Ms. L.E.M. Niers, Pediatric Resident and PhD candidate. The research project will be supervised by Dr. M.O. Hoekstra and Dr. G.T. Rijkers. All persons concerned in the project are listed in the adjective table (see Dutch protocol).

REFERENCES (from the original Dutch protocol)

Hygiene hypothesis

1. Umetsu DT, McIntire JJ, Akbari O et al. Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. *Nat Immunol* 2002;3:715-20.
2. Von Mutius E. Pro: the increase in asthma can be ascribed to cleanliness. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1106-7.
3. Platts-Mills TA, Woodfolk JA, Sporik RB. Con: the increase in asthma cannot be ascribed to cleanliness. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1107-8.
4. Weiss ST. Eat dirt: the hygiene hypothesis and allergic disease. *N Eng J Med* 2002;347:930-1.
5. Wills-Karp M, Santeliz J, Karp CL. The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nat Rev Immunol* 2001;1:69-75.

Timing: sensitization in utero and early life

6. Bjorksten B. Allergy priming early in life. *Lancet*. 1999;353:167-8.
7. Warner JO, Jones CA, Kilburn SA et al. Prenatal sensitization in humans. *Pediatr Allergy Immunol* 2001;11S13:6-8.
8. Herz U, Joachim R, Ahrens B et al. Allergic sensitization and allergen exposure during pregnancy favor the development of atopy in the neonate. *Int Arch Allergy Clin Immunol* 2001;124:193-6.

Allergic disease in childhood

9. Laan MP et al. Markers for early sensitization and inflammation in relation to clinical manifestations of atopic disease up to 2 years of age in 133 high-risk children. *Clin Exp Allergy* 2000;30:944-53.
10. Sampson HA. Pathogenesis of eczema. *Clin Exp Allergy* 1990;20:459-67.
11. Sprickelman AB et al. Severity scoring in allergic dermatitis: a comparison of three scoring systems. *Allergy* 1997;52:44-9.
12. Martinez FD. Development of wheezing disorders and asthma in preschool children. *Pediatrics* 2002;109(S2):362-7.

Role of the intestinal flora in the development of allergy and atopy

13. Bjorksten B, Naaber P, Seppe E et al. The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clin Exp Allergy*. 1999;29:342-6.
14. Kalliomaki M, Kirjavainen P, Eerola E et al. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;107:129-34.
15. Kalliomaki M, Isolauri E. Role of intestinal flora in the development of allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003;36:223-7.

Reviews or editorials addressing the use of probiotics

16. Mursh SH. Toll of allergy reduced by probiotics. *Lancet* 2001;357:1057-9.
17. Isolauri E, Sutas Y, Kankaanpaa P et al. Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr*. 2001;73:44S-50S.
18. Erickson KL, Hubbard NE. Probiotic immunomodulation in health and disease. *J Nutr*. 2000;130:403S-9S.
19. Matricardi PM. Probiotics against allergy: data, doubts and perspective. *Allergy* 2002;57:185-7.

In-vitro effects of probiotics

20. Hessle C, Hanson LA, Wold AE. Lactobacilli from human gastrointestinal mucosa are strong stimulators of IL-12 production. *Clin Exp Immunol*. 1999;116:276-82.
21. Christensen HR, Frokiaer H, Pestka JJ. Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J Immunol*. 2002;168:171-8.
22. Miettinen M, Vuopio-Varkila J, et al. Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 (IL-6), and IL-10 is induced by lactic acid bacteria. *Infect Immun*. 1996;64:5403-5.
23. Miettinen M, Matikainen S, Vuopio-Varkila J et al. Lactobacilli and streptococci induce interleukin-12 (IL-12), IL-18 and gamma interferon production in human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun* 1998;66:6058-62.
24. Pessi T, Sutas Y, Hurme M et al. Interleukin-10 generation in atopic children following oral Lactobacillus Rhamnosus GG. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1804-8.
25. Pochard P, Gosset P, Grangette C et al. Lactic acid bacteria inhibit Th2 cytokine production by mononuclear cells from allergic patients. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110:617-23.

Clinical trials probiotics in allergic disease

26. Kalliomaki M, Salminen S, Poussa T et al. Probiotics and prevention of atopic disease: 4 year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2003;361:1869-71. (*primary prevention*)
27. Kalliomaki M, Salminen S, Arvilommi H et al. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2001;357:1076-79. (*primary prevention*)
28. Kirjavainen PV, Salminen SJ, Isolauri E. Probiotic bacteria in the management of atopic disease: underscoring the importance of viability. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003;36:223-7.
29. Majamaa H, Isolauri E. Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 1997;99:179-85.

30. Isolauri E, Arvola T, Sutas Y et al. Probiotics in the management of atopic eczema. Clin Exp Allergy. 2000;30:1604-10.
31. Kalliomaki M, Ouwehand A, Arvilommi H et al. Transforming growth factor-beta in breast milk: a potential regulator of atopic disease at an early age. J Allergy Clin Immunol. 1999;104:1251-7.
32. Rautava S, Kalliomaki M, Isolauri E. Probiotics during pregnancy and breastfeeding might confer immunomodulatory protection against atopic disease in the infant. J Allergy Clin Immunol 2002;109:119-21.
33. Rosenfeldt V, Benfeldt E, Nielsen SD et al. Effect of probiotic Lactobacillus strains in children with atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol 2003;111:389-95.
34. Helin T, Haahtela S, Haahtela T. No effect of oral treatment with an intestinal bacterial strain, Lactobacillus rhamnosus (ATCC 53103), on birch-pollen allergy: a placebo-controlled double-blind study. Allergy. 2002;57:243-6.

Gene by environment interaction

35. Smit JJ, Loveren H van, Hoekstra MO et al. Influence of the macrophage bacterial resistance gene, Nramp1 (Slc11a1), on the induction of allergic asthma in the mouse. FASEB J 2003 17:958-60.

Safety of probiotics

36. Borriello SP, Hammes WP, Holzapfel W et al. Safety of probiotics that contain lactobacilli and bifidobacteria. Clin Infect Dis. 2003;36:775-80.
37. Sipsas NV, Zonios DI, Kordosis T. Safety of Lactobacillus strains used as probiotic agents. Clin Infect Dis 2002; 34: 1283-1284

RESEARCH PROTOCOL

‘Evaluation of the effect of probiotics on development of asthma and allergic rhinitis during childhood – follow-up study at age 5 or 6 years’

(August 2009)

PROTOCOL TITLE '<Evaluation of the effect of probiotics on development of asthma and allergic rhinitis during childhood – follow-up study at age 5 or 6 years.>'

Protocol ID	NL
Short title	Follow-up study on probiotics and atopy
Version	1.0
Date	August 2009
Coordinating investigator/project leader	Dr. C.K. van der Ent 088-7553201 K.vanderEnt@umcutrecht.nl
Principal investigator(s) (in Dutch: hoofdonderzoeker/uitvoerder) <i>Multicenter research: per site</i>	Dr. C.K. van der Ent 088-7553201 K.vanderEnt@umcutrecht.nl
Sponsor (in Dutch: verrichter/opdrachtgever)	Dr. C.K. van der Ent 088-7553201 K.vanderEnt@umcutrecht.nl
Independent physician(s)	Dr. T. Wolfs 088-7554555 <u>T.Wolfs@umcutrecht.nl</u>
Laboratory sites <if applicable>	Laboratory of Paediatric Immunology, Wilhelmina Kinderziekenhuis, Utrecht
Pharmacy <if applicable>	Not applicable

PROTOCOL SIGNATURE SHEET

Name	Signature	Date
For non-commercial research, Head of Department: Prof. dr. W. Kuis		
Coordinating Investigator/Project leader/Principal Investigator: Dr. C.K. van der Ent		

TABLE OF CONTENTS

1. INTRODUCTION AND RATIONALE	8
2. OBJECTIVES.....	10
3. STUDY DESIGN	11
4. STUDY POPULATION	12
4.1 Population (base)	12
4.2 Inclusion criteria.....	12
4.3 Exclusion criteria.....	12
4.4 Sample size calculation.....	12
5. TREATMENT OF SUBJECTS	13
6. INVESTIGATIONAL MEDICINAL PRODUCT	14
7. METHODS	15
7.1 Study parameters/endpoints	15
7.1.1 Main study parameter/endpoint.....	15
7.1.2 Secondary study parameters/endpoints (if applicable)	15
7.1.3 Other study parameters (if applicable).....	15
7.2 Randomisation, blinding and treatment allocation	15
7.3 Study procedures.....	15
7.4 Withdrawal of individual subjects.....	16
7.4.1 Specific criteria for withdrawal (if applicable)	16
7.5 Replacement of individual subjects after withdrawal	16
7.6 Follow-up of subjects withdrawn from treatment.....	16
7.7 Premature termination of the study	16
8. SAFETY REPORTING	17
8.1 Section 10 WMO event	17
8.2 Adverse and serious adverse events	17
8.2.1 Suspected unexpected serious adverse reactions (SUSAR)	18
8.2.2 Annual safety report	18
8.3 Follow-up of adverse events	18
8.4 Data Safety Monitoring Board (DSMB).....	18
9. STATISTICAL ANALYSIS	19
9.1 Descriptive statistics.....	19
10. ETHICAL CONSIDERATIONS.....	20
10.1 Regulation statement	20
10.2 Recruitment and consent	20
10.3 Objection by minors or incapacitated subjects (if applicable).....	20
10.4 Benefits and risks assessment, group relatedness.....	20
10.5 Compensation for injury	21
10.6 Incentives (if applicable).....	21
11. ADMINISTRATIVE ASPECTS AND PUBLICATION	22
11.1 Handling and storage of data and documents	22

11.2	Amendments.....	22
11.3	Annual progress report.....	22
11.4	End of study report.....	22
11.5	Public disclosure and publication policy	23
12.	REFERENCES	24

LIST OF ABBREVIATIONS AND RELEVANT DEFINITIONS

ABR	ABR form (General Assessment and Registration form) is the application form that is required for submission to the accredited Ethics Committee (ABR = Algemene Beoordeling en Registratie)
AE	Adverse Event
AR	Adverse Reaction
CA	Competent Authority
CCMO	Central Committee on Research Involving Human Subjects
CV	Curriculum Vitae
DSMB	Data Safety Monitoring Board
EU	European Union
EudraCT	European drug regulatory affairs Clinical Trials GCP Good Clinical Practice
IB	Investigator's Brochure
IC	Informed Consent
IMP	Investigational Medicinal Product
IMPD	Investigational Medicinal Product Dossier
METC	Medical research ethics committee (MREC); in Dutch: medisch ethische toetsing commissie (METC)
(S)AE	Serious Adverse Event
SPC	Summary of Product Characteristics (in Dutch: officiële productinformatie IB1-tekst)
Sponsor	The sponsor is the party that commissions the organisation or performance of the research, for example a pharmaceutical company, academic hospital, scientific organisation or investigator. A party that provides funding for a study but does not commission it is not regarded as the sponsor, but referred to as a subsidising party.
SUSAR	Suspected Unexpected Serious Adverse Reaction
Wbp	Personal Data Protection Act (in Dutch: Wet Bescherming Persoonsgegevens)
WMO	Medical Research Involving Human Subjects Act (Wet Medisch-wetenschappelijk Onderzoek met Mensen)

SUMMARY

Rationale: Probiotics, if instituted early in life, can give a significant reduction of development of eczema in infants at high risk of atopic diseases. In 2004 a randomized controlled trial started to investigate whether probiotics have a significant effect on the development of atopic symptoms as eczema, allergic rhinitis, food allergy and asthma. This study population has been followed until the age of two years. The present study is meant as a prolongation of the former study, we will perform a follow-up study of the included children on development of atopic diseases, in particular asthma and allergic rhinitis.

Objective: To establish the effect of perinatal probiotics on the prevalence of allergic disease at the age of 5 years.

Study design: Prospective, single blind, randomised, placebo-controlled trial.

Study population: Subjects are 98 predominantly Caucasian high risk children, having either a mother, or both a father and at least one sibling with past or present atopic diseases, to whom probiotics or placebo was administered perinatally during the previously carried out PANDA study.

Intervention (if applicable): None.

Main study parameters/endpoints: Development of allergic symptoms, evaluated by questionnaire and physical examination. Development of allergic asthma and allergic rhinitis, measured by lung function testing, nitric oxide measurements in exhaled air, and specific IgE to allergens.

Nature and extent of the burden and risks associated with participation, benefit and group relatedness: Parents and child are asked to fill in a questionnaire, and pay one visit to the out patient department for physical examination, blood sampling and pulmonary function testing with measurement of exhaled nitric oxide. The risks of these procedures are negligible and the burden minimal. It should be carried out specifically in these children, since they have been included in the former study and received placebo or probiotics.

INTRODUCTION AND RATIONALE

The last decennia a rising incidence of allergy and atopic disorders is seen, especially amongst children. The aim of this study is to investigate possible primary prevention in high risk children by means of administration of probiotics from 4-6 weeks prenatally until the age of one year.

The hypothesis is, that early administration of probiotics to pregnant women with allergy and subsequently to their offspring, leads to prevention or reduction of development of sensitisation and allergic disorders in childhood.

Modification of the intestinal flora early in life by administration of probiotic bacteria may be a potential approach to prevent atopic disease. Strachan (1) suggested a decreased occurrence of T helper type 1 (Th1)-associated infections to be a causative factor in the increased prevalence of allergy. More recently, modifications of the hygiene hypothesis have moved away from the impact of Th1-driving infections and towards the influence of the diversity of the microbial exposure in general during establishment of the intestinal flora (2,3). In industrial countries having a high degree of hygiene, changed microbial exposure might cause an altered composition of the intestinal flora and thus, an altering of the immunomodulatory microbial signalling posed during the critical stages of immune development in infancy (4). Atopic disease is the result of a T helper type 2 (Th2)-deviated immune response characterized by the production of the cytokines IL-4, IL-5, and IL-13. According to the hygiene hypothesis, insufficient infection-related Th1 responses during the neonatal period and infancy were considered to lead to unrestricted Th2 responses, resulting in allergic diseases.

Because the gastro-intestinal (GI) tract encompasses the largest surface of the human body where microbial products interact with the immune system, much attention is focused on the possibility that the intestinal flora may play a role in the development of atopic disease (2). Indeed, different bacterial colonization patterns have been observed in the intestinal flora of allergic children when compared with non-allergic children. Lactobacilli and bifidobacteria are more commonly found in the intestinal flora of non-allergic children, while allergic children seem to harbour higher number of clostridia and staphylococci (5,6). Lactobacilli and bifidobacteria are most frequently investigated probiotic species for possible beneficial effects in prevention and treatment of allergic disease (7). Preliminary data indicate that probiotic bacteria can be effective in prevention and treatment of atopic disease (8-13). Perinatal administration of probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus* GG) significantly reduced the development of eczema during the first 2-4 years of life in children with a family history of atopic disease (8,9). In addition, specific probiotic strains have been beneficial in the treatment of infants suffering from atopic eczema and cow's milk allergy by significantly decreasing the SCORAD score (10,11,14). The mechanism by which probiotic bacteria may modify immune-mediated diseases such as atopic disease, and which different species or strains may contribute are poorly understood.

Niers et al(15,16) showed the ability of live lactic acid bacteria to modulate the immune responses by inducing IL-10 in peripheral blood mononuclear cells, and these effects appeared to be strain specific. Based on this study, they selected *B. Bifidum*, *B. infantis*, and *Lc Lactis* (because of their good IL-10-inducing capacity as well as efficient inhibition of IL-5 and IL-13) to be used as a multi-species probiotics in a clinical trial on primary prevention of allergic diseases by probiotic bacteria. *B. Bifidum* was most potent to polarize dendritic cells to drive Th1 cell responses involving increased IFN-gamma producing T cells concomitant with reduction of IL-4-producing T cells. *L. Lactis* was much less effective in this respect.

This study will encompass a follow-up of the previously included children in the above mentioned double blinded randomized clinical trial performed by Niers from 2003 till 2007. It will be carried out when the children have reached the age of 5 years. Since Niers completed follow-up till the age of 2 years, a thorough evaluation of the development of asthma and allergic rhinitis was not possible. The diagnosis of asthma is best made at an age beyond 5 years for reasons of lung function testing, and the prevalence of allergic rhinitis rises from the age of 4. The aim of this follow-up study is to study if administration of probiotics during pregnancy and in the first year of life has any influence on the prevalence of asthma and allergic rhinitis, in Caucasian children at high risk of developing atopy, at the age of 5 or 6 years.

Besides this, we wish to perform a pilot study evaluating the diagnostic value of measurement of nasal nitric oxide (nNO) in the diagnosis of allergic rhinitis. An effect of allergic rhinitis on nNO is not consistently reported. However, most studies suggest that nNO is increased in allergic rhinitis¹²⁻¹⁷. Normal values for nNO in children are well defined by Struben et al¹⁸. De Winter et al will shortly publish an evaluation of methodology for nNO-measurements, with good reproducibility and applicability, investigated at the Department of Paediatric Pulmonology of our hospital¹⁹. We do not expect a direct relationship between probiotics and nNO, but want to support the diagnosis of allergic rhinitis. This test is easily available in our hospital, easy to perform and not experienced as invasive by the child. As we expect a direct relationship between the severity of allergic rhinitis and level of nNO, we wish to evaluate the predictive value of the measurement of nNO for the diagnosis of allergic rhinitis.

1. OBJECTIVES

Primary Objective:

The aim of the present study is to determine the effect of probiotics in high-risk infants on the prevalence and severity of asthma and allergic rhinitis, lung function and specific IgE at the age of 5 or 6 years.

2. STUDY DESIGN

A randomised double-blind placebo-controlled prospective study was carried out in 156 high-risk children. 98 children completed the intervention period and the two years of follow-up. The present study comprises a follow-up at the age of 5 or 6 years, in the outpatient clinic.

3. STUDY POPULATION

3.1 Population (base): Children who previously participated in the PANDA study

3.2 Inclusion criteria: Children who previously participated in the PANDA study

3.3 Exclusion criteria: None

3.4 Sample size calculation: We will try to get as little as possible loss to follow-up by trying to find all the former participants of the PANDA-study and to ask for the collaboration.

For the pilot study evaluating the diagnostic value of measurement of nasal nitric oxide, we will evaluate the complete cohort, not considering whether the child has received probiotics. We estimate the prevalence of allergic rhinitis to be 15% in this cohort. To be able to detect a statistical significant difference between nasal NO in the subjects with a diagnosis of allergic rhinitis from the questionnaire and subjects who do not, we will need a minimum of 10-15 participants with allergic rhinitis, and the same amount who do not suffer from allergic rhinitis. In evaluating this, we consider the means for NO in both groups to be 450 and 600 ppb, the standard deviation 115 ppb, the power 90% and the alfa 0.05. With the expected prevalence of allergic rhinitis (14 of 95 participants), this should be possible.

4. TREATMENT OF SUBJECTS

Not applicable

5. INVESTIGATIONAL MEDICINAL PRODUCT

Not applicable

6. METHODS

6.1 Study parameters/endpoints

6.1.1 Main study parameter/endpoint

The prevalence of allergic disease, focussing on the prevalence of asthma and allergic rhinitis.

Definition of asthma: Periodic wheezing and dyspnoea, combined with a 9% reversibility in FEV1 and/or exhaled NO above 20 ppb.

Definition of allergic rhinitis: Periodic or perennial sneezing, runny, or blocked nose when not having a cold or the flu.

6.1.2 Secondary study parameters/endpoints (if applicable)

Specific IgE to allergens.

6.1.3 Other study parameters (if applicable)

Not applicable.

6.2 Randomisation, blinding and treatment allocation

The previous study was double-blinded, this was abated at the end of the PANDA study. In this follow-up study, the researcher will be blinded, but parents are not.

6.3 Study procedures

The questionnaire is based on the ISAAC questionnaire. It will be used to evaluate the participants for symptoms indicative of asthma, allergic rhinitis, eczema and food allergy at the age of 5 or 6 years, with the most used and best comparable questionnaire of nowadays research in allergy.

The treating physician will be asked for doctor-diagnosed atopic diseases (asthma, allergic rhinitis, food allergy, eczema, urticaria).

Physical examination.

Baseline pulmonary function (forced expiratory volume in 1 second (FEV1), forced vital capacity (FVC), peak expiratory flow (PEF), and subdivisions of forced expiratory flow) will be measured. Airway reversibility will be measured after administration of 400 microgram of salbutamol. Exhaled nitric oxide will be measured, including nasal nitric oxide (nNO). nNO will be measured during breath holding (nNO-BH) and during humming (nNO-HE). nNO-measurement is not experienced as invasive by the child. nNO-BH is measured during breath hold after inhalation to TLC. The subjects will be asked to hold their breath for 10 seconds while air is sampled from the right nostril.

To measure nNO-HE, subjects will be asked to make a humming noise during nasal exhalation at the frequency of a tuning fork. Before nNO-HE measurements subjects are asked not to speak during 5 minutes. After inhalation of ambient air to TLC subjects exhale to FRC through their left nostril, while air is sampled from the right.

The nasal humming procedure will be done at two different frequencies with the assistance of tuning forks of respectively 128 and 440 Hz (nNO-HE₁₂₈ and nNO-HE₄₄₀, respectively).

Participants will be asked to stop the possible use of nasal corticosteroids for 6 weeks before nNO-measurement, long acting β -mimetica for 48 hours before lung function testing, and short acting β -mimetica for 12 hours before lung function testing, if clinically acceptable for the medical situation of the child. This will be evaluated by the investigator and deliberated with the treating physician.

Specific IgE will be determined by Phadiatop assay, concerning the most common allergens, in 1 ml. of blood.

6.4 Withdrawal of individual subjects

Subjects can leave the study at any time for any reason if they wish to do so without any consequences. The investigator can decide to withdraw a subject from the study for urgent medical reasons.

6.4.1 **Specific criteria for withdrawal (if applicable)** Not applicable.

6.5 **Replacement of individual subjects after withdrawal** Not applicable.

6.6 **Follow-up of subjects withdrawn from treatment** Not applicable.

6.7 Premature termination of the study

No reason to terminate this study prematurely.

7. SAFETY REPORTING

7.1 Section 10 WMO event

In accordance to section 10, subsection 1, of the WMO, the investigator will inform the subjects and the reviewing accredited METC if anything occurs, on the basis of which it appears that the disadvantages of participation may be significantly greater than was foreseen in the research proposal. The study will be suspended pending further review by the accredited METC, except insofar as suspension would jeopardise the subjects' health. The investigator will take care that all subjects are kept informed.

7.2 Adverse and serious adverse events

No serious adverse effects are to be expected, children will undergo physical examination, capillary blood sampling and lung function testing. Mild adverse effects could be dyspnoea or wheezing during the 2 days before the lung function testing, for which the investigator will provide good accessibility for deliberations of the parents. Another mild adverse effect could be exacerbation of allergic rhinitis since intranasal corticosteroids will be stopped during 6 weeks before testing. For this, the investigator can be contacted. Restarting the medication is possible at any time by the child, parents or treating physician and discontinuation of the medication can be rejected at any time by the child, parents or treating physician.

Adverse events are defined as any undesirable experience occurring to a subject during a clinical trial, whether or not considered related to the investigational drug. All adverse events reported spontaneously by the subject or observed by the investigator or his staff will be recorded.

A serious adverse event is any untoward medical occurrence or effect that at any dose results in death;

- is life threatening (at the time of the event);
- requires hospitalisation or prolongation of existing inpatients' hospitalisation;
- results in persistent or significant disability or incapacity;
- is a congenital anomaly or birth defect;
- is a new event of the trial likely to affect the safety of the subjects, such as an unexpected outcome of an adverse reaction, lack of efficacy of an IMP used for the treatment of a life threatening disease, major safety finding from a newly completed animal study, etc.

All SAEs will be reported to the accredited METC that approved the protocol, according to the requirements of that METC.

7.2.1 Suspected unexpected serious adverse reactions (SUSAR)

Not applicable.

7.3 Follow-up of adverse events

Adverse events are not expected to occur during this study.

All adverse events will be followed until they have abated, or until a stable situation has been reached. Depending on the event, follow up may require additional tests or medical procedures as indicated, and/or referral to the general physician or a medical specialist.

7.4 Data Safety Monitoring Board (DSMB)

Not applicable.

8. STATISTICAL ANALYSIS

8.1 Descriptive statistics:

For the main endpoint we will calculate the relative risks with 95% confidence intervals.

For the secondary endpoints we will apply parametric and non-parametric tests, depending on the distribution of the parameter.

For the pilotstudy evaluating the diagnostic value of nNO, we will calculate sensitivity, specificity, positive and negative predictive values for nNO in the diagnosis of allergic rhinitis.

All analysis will be performed with the SPSS/PC+ package.

9. ETHICAL CONSIDERATIONS

9.1 Regulation statement

The study will be conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki (version 2004) and in accordance with the Medical Research Involving Human Subjects Act (WMO).

9.2 Recruitment and consent

Subjects will be recruited by drs. D.M.W. Gorissen among the participants of the previous PANDA-study. Parents will be asked if their child is willing to participate. They will receive printed information and will be contacted by phone after one week by the investigator. If they decide to participate, they are asked to return the informed consent form attached to the printed information.

9.3 Objection by minors or incapacitated subjects (if applicable)

Subjects can abandon the research any time. Medical staff, the investigator and the parents will observe the child during the examination, blood sampling and lung function testing to make sure the child is not being forced to co-operate. The Dutch Association of Pediatrics has edited a Behavioural Code concerning Resistance of minors in case of medical scientific research with children (11). This will be applied.

9.4 Benefits and risks assessment, group relatedness

No direct benefit can be expected for the participants, except for a thorough screening for the presence of atopic diseases with if indicated an appropriate reference to a specialist. The risk of blood sampling is negligible, and the same applies to pulmonary function testing including exhaled nitric oxide measurement. For the need of stopping the inhaled beta-mimetics, a risk of dyspnoea and wheezing exists, which will be treated with re-administration of beta-mimetics. The same applies to discontinuation of nasal corticosteroids, which carries the risk of exacerbation of allergic rhinitis. If the condition of the child does not allow stopping the above mentioned medication or the parents are not willing to do so, they can still fulfill the questionnaires but they cannot perform lungfunction testing in case of beta-mimetics, or nasal NO measurement in case of nasal corticosteroids.

We are convinced that the yield of the study for addressing the effect of probiotics on the development of atopic disease exceeds the burden of one visit to the hospital with the above mentioned diagnostic procedures and the risks.

This follow-up study can only be carried out on these subjects, since they have participated in the primary intervention (the PANDA-study) with either probiotics or placebo.

9.5 Compensation for injury

We will insure for the risks of adverse effects of the study to the participants, by use of the general insurance of the University Medical Center of Utrecht.

9.6 Incentives (if applicable)

Subjects will be able to obtain a travelling allowance for the visit to the outpatient department..

10. ADMINISTRATIVE ASPECTS AND PUBLICATION

10.1 Handling and storage of data and documents

The handling of personal data complies with the Dutch Personal Data Protection Act. They will be handled confidentially and anonymously, provided with a code, kept by the investigators drs. D.M.W. Gorissen and dr. C.K. van der Ent. The sera will be kept for the timespan of the study, which is estimated on 2 years. Thereafter they will be destroyed.

10.2 Amendments

Amendments are changes made to the research after a favourable opinion by the accredited METC has been given. All amendments will be notified to the METC that gave a favourable opinion.

All substantial amendments will be notified to the METC and to the competent authority.

Non-substantial amendments will not be notified to the accredited METC and the competent authority, but will be recorded and filed by the sponsor.

< Examples of non-substantial amendments are typing errors and administrative changes like changes in names, telephone numbers and other contact details of involved persons mentioned in the submitted study documentation.>

10.3 Annual progress report

The investigator will submit a summary of the progress of the trial to the accredited METC once a year. Information will be provided on the date of inclusion of the first subject, numbers of subjects included and numbers of subjects that have completed the trial, serious adverse events/ serious adverse reactions, other problems, and amendments.

10.4 End of study report

The investigator will notify the accredited METC of the end of the study within a period of 8 weeks. The end of the study is defined as the last patient's last visit.

In case the study is ended prematurely, the investigator will notify the accredited METC, including the reasons for the premature termination.

Within one year after the end of the study, the investigator/sponsor will submit a final

study report with the results of the study, including any publications/abstracts of the study, to the accredited METC.

10.5 Public disclosure and publication policy

The previous trial has been registered at ClinicalTrials.gov.

ISRCTN Register: ClinicalTrials.gov Identifier NCT00200954

REFERENCES

1. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 1989;299:1259-60.
2. Kalliomaki M, Isolauri E. Role of intestinal flora in the development of allergy. *Curr Opin Allerg Clin Immunol* 2003;3:15-20.
3. Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, Ree R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science* 2002;296:490-4.
4. Willis-Karp M, Santeliz J, Karp CL. The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nat Rev Immunol* 2001;1:69-75.
5. Bjorksten B, Naaber P, Sepp E, Mikelsaar M. The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clin Exp Allergy* 1999;29:342-6.
6. Kalliomaki M, Kirjavainen P, Eerola E, Kero P, Salminen S, Isolauri E. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:129-34.
7. Ogden NS, Bielory L. Probiotics, a complementary approach in the treatment and prevention of pediatric atopic disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005;5:179-84.
8. Kalliomaki M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H, Isolauri E. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomized placebo-controlled trial. *Lancet* 2003;361:1869-71.
9. Kalliomaki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet* 2001;357:1076-9.
10. Isolauri E, Arvola T, Sutas Y, Moilanen E, Salminen S. Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1604-10.
11. Majamaa H, Isolauri E. Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:179-85.
12. Pessi T, Sutas Y, Hurme M, Isolauri E. Interleukin-10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1804-8.
13. Rautava S, Kalliomaki M, Isolauri E. Probiotics during pregnancy and breast-feeding might confer with immunomodulatory protection against atopic disease in the infant. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:119-21.
14. Rosenfeldt V, Benfeldt E, Nielsen SD et al. Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:389-95.
15. Niers LEM, Timmerman HM, Rijkers GT, Bleek GM van, Uden NOP van, Knol EF, Kapsenberg ML, Kimpen JLL, Hoekstra MO. Identification of strong interleukin-10 inducing lactic acid bacteria which down-regulate T helper type 2 cytokines. *Clin Exp Allergy* 2005;35:1481-9.

16. Niers LEM, Hoekstra MO, Timmerman HM, Uden NO van, Graaf PMA de, Smits HH, Kimpen JLL, Rijkers GT. Selection of probiotic bacteria for prevention of allergic diseases: immunomodulation of neonatal dendritic cells. Clin Exp Immunol 2007;149:344-52.