

A general introduction to allergy to laboratory animals (ALA)

by *Otto Melchior Poulsen*,
National Institute of Occupational Health,
Lersø Parkalle 105, DK-2100 Copenhagen Ø.

INTRODUCTION

ALA is mainly an IgE-mediate type-1 hypersensitivity reaction and delayed type hypersensitivity reactions are less frequently reported (*Lutsky & Neuman 1975, Lee 1987, ABPI 1987*). More than half of the individuals who develop ALA have specific IgE antibodies which can be detected either by skin prick test (55 % of ALA individuals are positive) or by Radio-Allergo-Sorbent-Test (RAST) (62 % of ALA individuals are positive). Almost all ALA individuals with asthmatic symptoms are positive in skin prick test and RAST (*ABPI 1987*). In the type-1 hypersensitive individuals the produced IgE molecules become fixed to IgE receptors on mast cells in the connective tissue or basophilic leucocytes in the blood circulation. A subsequent cross binding of allergen to several IgE molecules on the surface of the cell results in cell degranulation and release of enzymes and mediators (vaso-active amines, prostaglandins, interleukins etc) which induce biological processes leading to the allergic symptoms.

In some laboratory animal facilities the prevalence of ALA exceeds 30 % (*ABPI 1987*) and ALA must be considered a major occupational health problem. However, some uncertainty exists regarding the actual prevalence of ALA and the following problems should be considered:

- 1) Types and prevalence of ALA symptoms.
- 2) Connection between symptoms and occupational exposure.
- 3) Multifactorial effects on incidence of ALA.
- 4) Possibility of preventing the development of ALA.

1. TYPE AND PREVALENCE OF ALA SYMPTOMS

Based mainly on questionnaires several studies have described prevalence of allergic symptoms between 19–30 percent of the workers routinely exposed to laboratory animals (i.e. scientists, animal technicians and animal caretakers) (*Taylor et al. 1976, Gross 1980, Cockcroft et al. 1981, Slovak & Hill 1981, ABPI 1987, Lee 1987*), and of these 7–15 % develop asthma (*Taylor et al. 1976, Cockcroft et al. 1981, Lee 1987*). Some studies report that a substantial fraction of the workers stopped to work with laboratory animals due to ALA (*Taylor et al. 1976, Davies & McArdle 1981*). An incidence of ALA between 7–14 % has been reported (*Lutsky & Neuman 1975, Kibby et al. 1989*).

Table 1 summarize the prevalence of the four major ALA symptoms.

2. CONNECTION BETWEEN SYMPTOMS AND OCCUPATIONAL EXPOSURE

In the majority of prevalence studies the prevalence of the allergic symptoms among laboratory animal workers was calculated without confirming by provocation tests or skin prick test that the symptoms were induced by laboratory animal allergens. Consequently, these studies did not take into consideration the prevalence of these symptoms occurring in the normal population not exposed to laboratory animals. *Davies & McArdle (1981)* found that 19.5 % of individuals working with laboratory animals and 13.4 % of the non-exposed control group developed allergic symptoms. The animal wor-

Table 1. Prevalence of ALA symptoms.

Symptom	Prevalence (%)				
	Ref. 1	Ref. 2	Ref. 3	Ref. 4	Ref. 5
Rhinitis	15	17	15	24	16
Conjunctivitis	15	10	n.d.	n.d.	16
Urticaria	9	11	n.d.	6	10
Asthma	10	9	7.6	15	5
Total	15	23	15	27	22

1. Lutsky & Neuman 1975.
2. Taylor *et al.* 1976.
3. Gross 1980.
4. Cockcroft *et al.* 1981.
5. Beeson *et al.* 1983.

ker group contained significantly more individuals with asthma. In agreement, Lutsky *et al.* (1986) later determined the prevalence of rhinitis and asthma among laboratory animal workers as compared with a non-exposed control group (Table 2). This study demonstrated the same high prevalence of rhinitis in both groups whereas the prevalence of asthma was significantly higher among the laboratory animal workers. Thus, registration of weak allergic symptoms (i.e. rhinitis) without identifying the causal allergens may have no or limited validity when the prevalence of ALA is to be determined.

3. MULTIFACTORIAL EFFECTS ON INCIDENCE OF ALA

In an early study of Lutsky & Neuman (1976) approximately half of 39 laboratory animal facilities experienced a high prevalence of ALA whereas the remaining facilities only rarely had cases of ALA. Similarly, Cockcroft *et al.* (1981) compared three ani-

Table 2. Prevalence of rhinitis and asthma among laboratory animal workers and unexposed control persons.

Symptom	Lab. ani. workers	Control	
Rhinitis	26 %	24 %	N.S.
Asthma	19 %	5 %	P < 0,005

Lutsky *et al.* 1986.
N.S. = not significant.

mal facilities and found 40 %, 26 %, and 11 % prevalence of ALA, respectively. In general, a low incidence of ALA might merely reflect that some facilities do not recognize ALA with rhinoconjunctivitis and/or urticaria as a occupational health problem. However, a strong clinical ALA manifestation such as asthma is not likely to remain unrecognized, and the prevalence of ALA is also often reported to vary greatly between different laboratory animal facilities (Table 1).

The development and triggering of allergic reactions might be dependent on several factors related to allergen exposure (i.e. type and concentrations of allergens, route of exposure etc.; ABPI 1987, Kirby *et al.* 1989), working procedures (simultaneous exposure to irritants, use of ventilation and air filter systems etc. ABPI 1987), personal genetics and personal life style (i.e. smoking habits; Venables *et al.* 1989). Thus, it is possible that differences in the prevalence of ALA might reflect multifactorial differences between the laboratory animal facilities. A detailed comparative study between facilities with low respectively high prevalence or incidence of ALA might provide important information on the occupational health risk factors.

4. POSSIBILITY OF PREVENTING THE DEVELOPMENT OF ALLERGY *Reduction of allergen exposure:*

It is well known, that sensitization with respect to IgE-mediated type-I hypersensitivity can occur at extremely low concentrations of allergens, whereas development of cell-mediated type-IV hypersensitivity requires sensitization at high allergen concentrations. Consequently, no lower allergen concentration exists below which the possibility of sensitization can be ruled out. In a prospective study Kibby *et al.* (1989) found no correlation between the degree of allergen exposure and the incidence of ALA. However, a significant positive correlation was observed between degree of allergen exposure and pre-

valence of ALA, indicating that a high degree of exposure on a long term basis (several years) might result in an increased number of individuals suffering from ALA.

Furthermore, triggering of allergic reactions in sensitized individuals are dependant on the exposure dose of allergen, and reduction of exposure might reduce the incidence of severe allergic reactions (i.e. asthma and anaphylactic shock) (Slovak & Hill 1981). The allergen exposure is highly dependant on the task. A recent study demonstrated that feeding and cleaning resulted in the highest exposure to airborne rat allergen, injection and handling resulted in medium exposure whereas only limited exposure was associated with surgery or sacrifice (Eggleston *et al.* 1989).

Consequently, it is now generally believed that a reduction in allergen exposure (improving ventilation and working procedures) results in a reduction of the incidence of severe ALA (Slovak & Hill 1981, ABPI 1987, HSC 1990).

Pre-employment test for atopy:

Several studies have demonstrated that individuals with an atopic pre-disposition have an increased risk of developing ALA (Gross 1980, Beeson *et al.* 1983, Osman 1989). Cockcroft *et al.* (1981) and Slovak & Hill (1981) found, that atopic individuals were not more likely than non-atopic individuals to have animal-related allergic symptoms in general, but the atopic individuals were more likely to have asthma. In contrast, several studies did not observe a significant correlation between a pre-employment history of atopy and the subsequently incidence of ALA (Davies & McArdle 1981, Kibby *et al.* 1989).

Pre-employment tests using skin prick tests with selected standard allergens suggest that 33 % of the population has an atopic pre-disposition, and among these only approximately 30 % will develop ALA (Osman 1989). Consequently, pre-employment tests for atopic pre-disposition will exclude a

large fraction of the population from working with laboratory animals.

Medical treatment:

Several studies have demonstrated that pre-exposure treatment with disodium cromoglycate reduced the bronchial challenge sensitivity in nearly all patients tested (Neuman & Lutsky 1976, Cross 1980).

Hyposensitization therapy:

Wahn & Siraganian (1980) describe the use of hyposensitization therapy in the treatment of ALA. The therapy resulted in increased serum concentrations of blocking antibodies and a decreased sensitivity to allergen exposure in nine of 11 patients. Therapy was discontinued in four patients and in all cases the effect of the therapy was transient and after 24 months no beneficial effects of the therapy could be observed. Thus, hyposensitization therapy is not considered generally applicable in dealing with ALA.

CONCLUSIONS

Uncertainty regarding actual incidence, multifactorial effects, value of pre-employment test for atopy.

Summary of discussion

The prevalence of asthma was discussed. A literature survey done by Richard Fosse and the opinion and facts from the group give an approximate estimation of 2-4 %. This figure is disturbingly high and must go down in the future.

After this the levels of antigen exposure were subject of discussion. The opinion on the significance of the levels varies, and also the impact of daily massive versus intermittent exposure must be scrutinized.

There is a difference in prevalence of ALA among animal caretakers and scientific members of the staff.

Personal samplers may give answers to individual levels of exposure and result in advice on good working habits in order to reduce the exposure.

A theory was put forward that early in life exposure to animals may be of importance, and it was stressed that laboratory animal caretakers and researchers are recruited from different categories.

It was discussed whether atopic persons should be excluded from work with animals. The general opinion was no. It is not possible or desirable to

do so. The individuals should be carefully informed about the risks and symptoms of allergy, and measures should be taken in order to minimize the risks.

It was pointed out that not only animals, but also bedding can be a problem.

Finally the nature of antigens was discussed. This is not always known, but rats and their urinary proteins result in the most frequent allergies. Rabbits' hair and probably saliva and urinary proteins as main allergens rank second.

References

- ABPI: Advisory note on allergy to laboratory animals. Prepared by ABPI (The Association of the British Pharmaceutical Industry), 12 Whitehall, London SW1A 2DY. Marts 1987.
- Beeson MF, Dewdney JM, Edwards RG, Lee D, Orr RG: Prevalence and diagnosis of laboratory animal allergy. *Clinical Allergy* 13, 422-433 (1983).
- Cockcroft A, Edwards J, McCarthy P, Anderson N: Allergy in laboratory animal workers. *The Lancet*, April 11, 827-830 (1981).
- Davies GE, McArdle LA: Allergy to laboratory animals: A survey by questionnaire. *Int. Archs Allergy appl. Immunol.* 64, 302-307 (1981).
- Eggleston PA, Newill CA, Ansari AA, Pustelnik A, Lou S-R, Evans III R, Marsh DG, Longbottom JL, Corn M: Task-related variation in airborne concentrations of laboratory animal allergens: Studies with *Rat n* I. *J. Allergy Clin. Immunol.* 84, 347-352 (1989).
- Gross NJ: Allergy to laboratory animals: Epidemiologic, clinical, and physiologic aspects, and a trial of cromolyn in its management. *J. Allergy Clin. Immunol.* 66, 158-165 (1980).
- HSC: Health & Safety Commission 1990. What you should know about allergy to laboratory animals. Health and Safety Executive, Library and Information Services, Broad Lane, Sheffield S3 7HQ.
- Kibby T, Powell G, Cromer J: Allergy to laboratory animals: A prospective and cross-sectional study. *J. Occupat. Med.* 31, 842-846 (1989).
- Lee D: Occupational Allergy to Laboratory Animals. *J. R. S. H.* 3, 98-99 (1987).
- Lutsky II, Neuman I: Laboratory animal dander allergy: I. An occupational disease. *Annals of Allergy* 35, 201-205 (1975).
- Lutsky II, Baum GL, Teichtahl H, Mazar A, Aizer F, Bar-Sela S: Respiratory disease in animal house workers. *Eur. J. Respir. Dis.* 69, 29-35 (1986).
- Neuman I, Lutsky I: Laboratory Animal dander allergy: II. Clinical studies and the potential protective effect of disodium cromoclycate. *Annals of Allergy* 36, 23-29 (1976).
- Osman S: Laboratory workers and animal allergies. *Occupational Health*, Marts, 1989, 72-74.
- Slovak JM, Hill RN: Laboratory animal allergy: a clinical survey of an exposed population. *Br. J. Ind. Med.* 38, 38-41 (1981).
- Taylor G, Davies GE, Altonyan REC, Brown HM, Frankland AW, Morrison Smith J, Winch R: Allergic reactions to laboratory animals. *Nature* 260, 280 (1976).
- Venables KM, Dally MB, Nunn AJ, Stevens JF, Stephens R, Farrer N, Hunter SV, Stewasol M, Hughes EG, Newman Taylor AJ: Smoking and occupational allergy in a platinum refinery. *Dr. Med. J.* 299, 939-942, 1989.
- Wahn U, Siraganian RP: Efficacy and specificity of immunotherapy with laboratory animal allergen extracts. *J. Allergy Clin. Immunol.* 65, 413-421 (1980).

Otto Melchior Poulsen

UDVIKLING OG APPLIKATION AF TO MURINE
FORSØGSDYRMODELLER TIL STUDIET AF
KOMÆLKSPROTEINERS OG -PEPTIDERS
ALLERGENICITET.

Indleveret den 18. december 1988

Antaget den 6. december 1989

»An animal model is an living organism in which normative biology or behaviour can be studied, or in which a spontaneous or induced pathological process can be investigated, and in which the phenomenon in one or more respects resembles the same phenomenon in humans or other species of animal«.

National Research Council Committee on Animal Models for Research on Aging 1981.

FORORD

Det eksperimentelle arbejde, der danner grundlag for denne afhandling, blev udført i perioden september 1984 til oktober 1988 i forbindelse med min ansættelse som videnskabelig assistent og senere adjunkt ved Den Kongelige Veterinær- og Landbohøjskole.

Arbejdet startede som en del af et større tværfagligt projekt »mælkeallergi og fremstilling af et hypoallergent fødemiddel til spædbørn«, finansieret af Statens Jordbrugs- og Veterinær videnskabelige Forskningsråd og Statens Lægevidenskabelige Forskningsråd.

Jeg ønsker at udtrykke en speciel tak til lektor cand. scient., dr. med. Jann Hau ved Laboratorium for Forsøgsdyrkundskab, Institut for Veterinær Patologi, Landbohøjskolen for et stimulerende og konstruktivt samarbejde.

Overlæge, cand. med. Arne Høst, Sønderborg Sygehus takkes for udførte provokationstests på komælksallergiske børn og for serumprøver fra komælksallergiske børn.

Afdelingsleder, dyrlæge H.J. Skovgaard Jensen, Panum Institutet, Københavns Universitet takkes for velvilligt at have stillet forsøgsdyr og faciliteter til rådighed.

Mejeriingeniør, produktionschef J. Kollerup, Mejeriet Enigheden, takkes for fremstilling af specielle mælkeprøver og for leverancer af større mængder ubehandlet mælk.

Statens Jordbrugs- og Veterinærvidenskabelige Forskningsråd og Statens Lægevidenskabelige Forskningsråd, samt Direktør Jacob Madsen og Hustru Olga Madsens Fond takkes for økonomisk støtte.

Endelig vil jeg rette en særlig tak til min hustru, Lene, og min datter, Signe, for deres opmuntring og støtte under udarbejdelsen af denne afhandling.

Otto Melchior Poulsen

18. december 1988

Nærværende afhandling er en sammenfatning af de undersøgelser, der er beskrevet i følgende publikationer I-VI, samt ikke-publicerede undersøgelser med tilknytning til emnet:

- I. O. M. Poulsen, J. Hau and J. Kollerup (1987). »Effect of homogenization and pasteurization on the allergenicity of bovine milk analysed by a murine anaphylactic shock model«. *Clinical Allergy* 17: 449-458.
- II. O. M. Poulsen, J. Hau and J. Kollerup (1988). »The effect of homogenization and pasteurization on the allergenicity of bovine milk analysed by a murine anaphylactic shock model«. In »New Developments in Biosciences: Their Implications for Laboratory Animal Science« (A. C. Beynen & H. A. Solleveld, eds.). *Proceedings 3rd FELASA Symposium, Amsterdam, June 1-5, 1987*, pg 81-86.
- III. O. M. Poulsen and J. Hau (1988). »Application of a murine anaphylactic shock model. A colloid chemical approach to cow's milk allergy«. *Proceedings of the IX ICLAS symposium, Bangkok january 12-14, 1988*. In press.
- IV. O. M. Poulsen and J. Hau (1987). »Murine passive cutaneous anaphylaxis test (PCA) for the »all or none« determination of allergenicity of bovine whey proteins and peptides«. *Clinical Allergy* 17: 75-83.
- V. B. Rye Nielsen, O. M. Poulsen and J. Hau (1989). »Reagin production in mice: Effect of Subcutaneous and Oral Sensitization with Untreated Bovine Milk and Homogenized Bovine Milk«. *In Vivo* 3: 271-274.
- VI. O. M. Poulsen, B. Rye Nielsen, A. Basse and J. Hau (1989). »Comparison of intestinal anaphylactic reactions in sensitized mice challenged orally with raw-untreated milk and homogenized bovine milk«. *Allergy* 1990, in press.

INDHOLDSFORTEGNELSE.

	SIDE
1. MÅLSÆTNING OG AFGRÆNSNINGER.	5
2. INTRODUKTION.	5
2.1. SAMMENSÆTNING AF HUMAN OG BOVIN MÆLK.	5
2.2. HUMAN KOMÆLKSALLERGI, KLINISKE MANIFESTATIONER OG KLINISK VIDEN.	7
2.3. MÅLING AF KOMÆLKSPROTEINERS OG - PEPTIDERS ALLERGENICITET <i>IN VITRO</i> OG <i>IN VIVO</i> .	10
2.3.1. <i>In vitro</i> måling af komælksproteiners allergenicitet	10
2.3.2. <i>In vitro</i> måling af peptiders allergenicitet	11
2.3.3. <i>In vivo</i> metoder	12
2.3.4. <i>In vivo</i> måling af komælksproteiners allergenicitet	13
2.3.5. <i>In vivo</i> måling af peptiders allergenicitet	13
3. MURIN ANAFYLAKTISK SHOCK MODEL. VIRKNING AF HOMOGENISERING OG PASTEURISERING PÅ KOMÆLKS ALLERGENICITET.	13
3.1. UDVIKLING OG OPTIMERING AF EN MURIN ANAFYLAKTISK SHOCK MODEL.	13
3.1.1. Formål	13
3.1.2. Valg af forsøgsdyr	14
3.1.3. Udvikling af model	14
3.1.4. Behandling af anafylaktisk shock med adrenalin	16
3.1.5. Sammenligning af sensitiviteten i anafylaktisk shock model udført på mus og marsvin	16
3.2. APPLIKATION AF ANAFYLAKTISK SHOCK MODEL TIL STUDIER AF EFFEKTEN AF HOMOGENISERING OG PASTEURISERING PÅ BOVINE MÆLKEPROTEINERS ALLERGENICITET.	17
3.2.1. Sammenligning af ubehandlet mælks og pasteuriseret-homogeniseret mælks evne til at inducere anafylaktisk shock i sensibiliserede mus	17
3.2.2. Test af uhomogeniseret modermælksstatning	18
3.2.3. Undersøgelser af emulsioner af olie og ovalbumin i anafylaktisk shock model	19
3.2.4. Effekt af oral indgift af ubehandlet og homogeniseret-pasteuriseret bovin mælk i sensibiliserede mus	19
3.2.4.1. Fordeling af kaseiner og valleproteiner i den murine tarm efter oral indgift af ubehandlet mælk og homogeniseret-pasteuriseret sødmælk	20
3.2.4.2. Tarmreaktioner i sensibiliserede mus efter oral indgift af ubehandlet mælk og homogeniseret-pasteuriseret sødmælk	21
3.3. DISKUSSION AF DEN MURINE ANAFYLAKTISK SHOCK MODEL.	22
3.3.1. Murin model sammenlignet med marsvin model	22
3.3.2. Effekt af homogenisering på mælks allergenicitet - den kolloidkemiske model	23
3.3.3. Effekt af homogenisering på mælks allergenicitet - betydning for mejeribrugets fremstilling af mælkeprodukter	25
3.3.4. Effekt af varmebehandling på mælks allergenicitet	25

	Side
4. HOMOLOG MURIN PCA-TEST. MÅLING AF KOMÆLKSPROTEINERS OG -PEPTIDERS ALLERGENICITET.	26
4.1. UDVIKLING OG OPTIMERING AF EN MURIN PCA-TEST.	26
4.1.1. Formål	26
4.1.2. Valg af forsøgsdyr	26
4.1.3. Udvikling af den murine PCA-test	26
4.2. APPLIKATION AF MURIN PCA-TEST TIL BESTEMMELSE AF KOMÆLKSPROTEINERS OG -PEPTIDERS ALLERGENICITET.	29
4.2.1. Allergenicitet af komælk	29
4.2.2. Sammenligning af ubehandlet mælks og homogeniseret-pasteuriseret mælks evne til at sensibilisere mus	30
4.2.3. Allergenicitet af valleproteiner, valleproteinhydrolysater og peptider heraf	31
4.2.4. Allergenicitet af hypoallergene modermælkserstatninger	32
4.2.4.1. Allergenicitet af hypoallergene vallepeptidprodukter fremstillet i forbindelse med projektet	32
4.2.4.2. Højmolekylære allergene komponenter i Nutramigen	33
4.2.4.3. Murint IgE og IgG og humant IgG mod højmolekylære komponenter ekstraheret fra Nutramigen og Alfare	34
4.3. DISKUSSION AF DEN MURINE PCA-TEST.	36
4.3.1. Udvikling af murin PCA-test - Valg af forsøgsdyr og metode	36
4.3.2. Murin PCA-test anvendt til undersøgelse af homogeniseret komælks evne til at inducere reaginproduktion	37
4.3.3. Murin PCA-test af vallepeptiders allergenicitet	37
4.3.4. PCA-test af hypoallergene modermælkserstatninger	38
5. DANSK SAMMENDRAG.	39
6. SUMMARY IN ENGLISH.	41
7. REFERENCELISTE.	44
8. INDEX.	50

1. MÅLSÆTNING OG AFGRÆNSNINGER.

Denne afhandling bygger i vid udstrækning på et delprojekt af et større tværfagligt projekt vedrørende udvikling af en metode til fremstilling af hypoallergene fødemidler, der kan tåles af komælksallergiske børn.

Som udgangspunkt valgtes komælksproteiner, fordi peptider fremstillet ud fra komælksproteiner let kan allergitestes dels ved *in vitro* metoder ved brug af kommercielle antistoffer mod komælksproteiner, og dels ved eliminations/provokations-test i komælksallergiske patienter.

Anvendelse af f.eks. soyaprotein som udgangsmateriale ville vanskeliggøre måling af peptidernes allergenicitet, fordi antallet af soyaproteinallergikere i Danmark er lavt sammenlignet med komælksallergikere.

Nærværende afhandling omhandler undersøgelser af mælkeproteiner og -peptiders allergenicitet ved anvendelse af to forsøgsdyrmodeller: Passiv kutan anafylaksi test (PCA-test) og systemisk anafylaktisk shock test. De to forsøgsdyrmodeller blev udviklet for at etablere *in vivo* metoder, der kunne anvendes som et alternativ eller supplement til eksisterende *in vitro* metoder til allergenicitetstest af potentielt egnede produkter.

De mejeriteknologiske undersøgelser, der blev udført i forbindelse med det tværfaglige projekt, har i denne sammenhæng kun begrænset videnskabelig interesse, og de anvendte metoder til fremstilling af hypoallergene peptider i industriel skala vil derfor ikke blive beskrevet i detaljer i nærværende afhandling.

Interesserede henvises til Dansk Patentansøgning nr. 5897/85 (Samuelsson & Poulsen 1985).

2. INTRODUKTION

2.1. SAMMENSÆTNING AF HUMAN OG BOVIN MÆLK.

Alle pattedyrs mælk består af proteiner, lipider, kulhydrater, vitaminer, mineraler, sporstoffer etc. Det relative indhold af de forskellige komponenter varierer betydeligt mellem forskellige arter. Indenfor den samme art kan forskelle i sammensætningen være genetisk betinget, betinget af individets alder, sundhedstilstand og dets omgivende miljø (vigtigst fodrets sammensætning). Denne gennemgang vil kun berøre de mest karakteristiske forskelle på human og bovin mælk. Flere reviews og bøger giver en detaljeret beskrivelse af mælks sammensætning (McKenzie 1970, Proceedings of the NIZO/IOF Symposium 1972, Edelsten 1982, Eigel *et al.* 1984).

De to mælketyper viser væsentlige forskelle i protein-, lipid- og kulhydratindhold (Tabel 1). I forbindelse med nærværende afhandling har de potentielle allergener, proteinerne, størst interesse.

Kaseiner

Kaseiner er mælkespecifikke proteiner karakteriseret dels ved tilstedeværelse af esterbundet fosfat, og dels ved et højt prolinindhold og få eller ingen cysteinresidualer. Tabel 2 beskriver de fire hovedtyper af kaseiner i komælk. Det skal bemærkes, at kvindemælk afviger fra komælk ved ikke at indeholde alfa(s)-kaseiner (Edelsten 1982). Kvindemælks kaseinmiceller består næsten udelukkende af betakasein og kappakasein (Edelsten 1982).

Kaseiner har zoner med høj ladningstæthed og andre zoner med højt indhold af hydrofobe aminosyrer. Kaseinerne findes associeret i submiceller, hvor de hydrofobe aminosyrer er pla-

Tabel 1. Gennemsnitlig sammensætning af bovin og human mælk (Edelsten 1982).

	Vand	Total tørstof	Lipid	Total protein	Kasein	Valleprotein	Laktose
Human	87,5	12,5	4,0	0,9	0,3	0,6	7,0
Bovin	87,5	12,5	3,8	3,3	2,7	0,6	4,7

Værdierne angiver g/100 ml mælk.

Tabel 2. Kaseiner i komælk (Edelsten 1982, Eigel et al. 1984)

Nomenklatur	Molekylvægt	Indhold % af total protein	Esterbundet fosfat
Alfa-S1-kasein	23600	39 - 46	ja
Alfa-S2-kasein	25150	8 - 11	ja
Beta-kasein	24000	25 - 35	ja
Kappa-kasein	19000	8 - 15	nej
Gamma-kasein	-	3 - 7	ja

De angivne molekylvægte er tilnærmede værdier, idet forskellige genetiske varianter viser mindre forskelle i molekylvægt. Kappa-kasein er et naturligt forekommende spaltningprodukt af Beta-kasein.

ceret i submicellernes indre, mens proteinernes ladede zoner findes på submicellernes overflade, dækket af kappakasein. Submicellerne aggregerer i miceller ved, at de esterbundne fosfatgrupper, der ikke er dækket af kappakasein, krydsbindes ved ionbinding mellem calciumioner og kolloidalt fosfat (McKenzie 1970, Proceedings of the NIZO/IOF Symposium 1972, Edelsten 1982).

Ved hydrolyse med Chymosin (EC 3.4.23.4) spaltes kappakasein i peptidbindingen Phe(105)-Met(106) (Visser 1981). Herved frigøres kappakaseinet og ved tilstedeværelse af calcium kan micellerne yderligere krydsbindes og til sidst danne et koagel.

Kaseiner har isoelektrisk punkt ved pH 4,6 og lav opløselighed ved pH 4,0 - 5,0. Dette forhold udnyttes ved fremstilling af syrefældet kasein, hvor fældningen typisk foregår ved pH 4,6 og 30 grader Celsius.

Det høje indhold af prolin i kasein forhindrer dannelse af stabile sekundære proteinstrukturer og kaseinerne er af denne grund varmestabile (Edelsten 1982). Selv opvarmning til 120 grader Celsius i 15 min fører ikke til denaturering (Edelsten 1982, Bahna & Gandhi 1983).

Valleproteiner

Valleproteiner er betegnelsen for de proteiner, der findes opløselige i mælken vandfase efter udfældning af kasein med syre eller chymosin. Native valleproteiner adskiller sig fra kaseinerne bl.a. ved ikke at være associerede i miceller, og ved at have en stabil sekundær og tertiær struktur, der gør dem relativt varmelabile (Edelsten 1982, Bahna & Gandhi 1983, Heppell

et al. 1984). Beta-lactoglobulin og alfa-lactalbumin er mælkespecifikke proteiner, mens resten af valleproteinerne er serumproteiner stammende fra blodet (Tabel 3).

Af Tabel 2 og Tabel 3 fremgår, at human mælk afviger fra bovin mælk ved et relativt større indhold af valleproteiner og ved at mangle alfa-kasein og beta-lactoglobulin (Edelsten 1982, Hambraeus 1982). Alfa-lactalbuminindholdet er nøje korreleret til mælken indhold af laktose, og indholdet af alfa-lactalbumin i human mælk er højere end i komælk. Ud over de i Tabel 3 nævnte proteiner indeholder mælk mere end 40 forskellige enzymer.

Kvantitativt udgør enzymerne kun en lille fraktion af proteinmængden i mælk, og enzymerne spiller næppe større rolle som allergener. Valleproteinerne i kvindemælk tjener i vid udstrækning både som proteinkilde og som faktorer, der beskytter spædbarnet mod infektionssygdomme (immunglobuliner, lysozym, lactoperoxidase og lactoferrin - IDF Bulletin 191).

Ændringer i mælken forårsaget af varmebehandling.

Ved fremstilling af konsummælk varmebehandles mælken for at dræbe eventuelle patogene bakterier. Tre niveauer af varmebehandling anvendes i det danske mejeribrug:

Lavpasteurisering 72 grader Celsius i 15 s

Højpasteurisering 87 grader Celsius i 15 s

UHT-behandling (Ultra-High-Temperature) 140 grader Celsius i 2-4 s

Ved de anvendte temperaturer og tider påvirkes kaseinerne ikke, mens denatureringen af valleproteiner stiger med stigende varmebe-

Tabel 3. Valleproteiner i bovin og human mælk.

Nomenklatur	Molekylvægt i bovin mælk(a)	Indhold i bovin mælk(b) (% af total protein)	Indhold i human mælk(b)
Beta-lactoglobulin	18000	7 - 12%	Mangler
Alfa-lactalbumin	14200	2 - 5%	17%
Serum Albumin	66000	0.7-1.3%	6%
Lactoferrin	76500	spormængde	17%
Immunoglobuliner	150000 900000	1.9-3.3%	11%
Lysozym	15000	spormængde	6%
Andre		spormængde	8%
Valleprotein i % af total protein		15 - 22%	65%

a = Eigel et al. 1984. b = Edelsten 1982.

De enkelte valleproteiner viser genetisk bestemte variationer i molekylvægt (Eigel et al. 1984). Ud over de nævnte proteiner har human mælks valle et højt indhold af enzymer, blandt andet lactoperoxidase.

handling. Selv ved lavpasteurisering sker en vis denaturering af især beta-lactoglobulin, der i forbindelse med denatureringen danner komplekser med kappa-kaseinmolekyler på kaseinmicellernes overflade (Edelsten 1982).

Ved en kraftig varmebehandling indtræder en fuldstændig denaturering af valleproteiner, der danner uopløselige komplekser ved etablering af intermolekylære svovlbindinger (Hidalgo & Gamper 1977, Kilara 1985).

Varmebehandling af proteiner ved tilstedeværelse af laktose, galaktose eller glukose kan føre til, at kulhydraterne reagerer med frie endestillede aminogruupper eller med sidestillede aminogruupper på basiske aminosyrer (lysin, arginin og histidin) og danner karakteristiske brune eller sortfarvede maillardreaktionsprodukter (Jennes & Patton, 1976, Otani & Tokita, 1982, Matsuda et al. 1985).

Ændringer i mælken forårsaget af homogenisering.

Ved homogenisering presses mælken under højt tryk gennem en smal dyse, hvorved mælakens største fedtlegemer spaltes til legemer mindre end 0,8 mikrometer. I ubehandlet mælk er fedtlegemerne stabiliseret af et ydre lag af fosfolipid, lipoprotein og protein. Ved

homogenisering stiger overfladearealet af fedtlegemerne voldsomt, og de nydannede overflader stabiliseres ved, at kaseinmolekyler og i mindre grad valleproteiner bindes til overfladerne ved hydrofob interaktion. Det forøgede overfladeareal af fedtlegemerne dækkes således af kaseinmolekyler og valleproteiner, der forhindrer at fedtlegemerne flyder sammen og danner fedtpropper på mælakens overflade (Spur 1948a,b, publikation I-III).

2.2. HUMAN KOMÆLKSALLERGI, KLINISKE MANIFESTATIONER OG KLINISK VIDEN.

Allergi blev oprindeligt defineret af von Pirquet i 1906 som en specifikt ændret reaktions-ejne beroende på en antigen-antistof reaktion (Bendixen 1986). Denne definition udelukker imidlertid T-lymfocytmedierede reaktioner, og i nærværende afhandling anvendes derfor følgende generelt accepterede definition på komælksallergi (Savilahti 1981, Husby 1988):

Ved komælksallergi forstås en immunologisk betinget overfølsomhed, hvor patienten reagerer med karakteristiske symptomer, når patienten efter en eliminationsperiode provokeres med komælk. Elimination af allergenbelastning skal føre til ophør af de kliniske manifestationer, der skal kunne reproduceres igen ved

en efterfølgende provokation med komælk. I denne terminologi betegner intolerance en sandsynligvis ikke-immunologisk betinget overfølsomhed (Husby 1988), hvor de kliniske manifestationer er et udtryk for reaktioner på kemiske forbindelser, der ikke kan fungere som allergen, f.eks. laktoseintolerance, hvor den osmotiske diarre forårsages af manglende evne til at hydrolysere og absorbere laktose (Savilahti 1981). Diagnosen på komælksallergi baseres på patientens kliniske reaktioner ved elimination og provokation med komælk. Allergiske reaktioner involverer ofte et samspil mellem en række forskellige serologiske faktorer (antistof-antigen komplekser, komplementfaktorer etc) og cytologiske mekanismer (mastcelledegranulering, aktivering af granulocytter, makrofager, T- og B-lymfocytter etc.) (Matthews and Soothill 1970, Savilahti 1981, Martin et al. 1984, Bahna 1985). Coombs og Gells (Roitt 1977) klassiske inddeling af hypersensitivetsreaktioner i fire typer repræsenterer en systematisering af reaktionerne i forhold til de involverede serologiske og cytologiske faktorer (Bahna 1985). Det er endnu usikkert om type-II-hypersensitivitet (antistofafhængig cytotoxisk hypersensitivitet), der antages at have betydning ved immunologisk reaktion mod store fremmedlegemer, f.eks. parasitter, spiller en aktiv rolle i forbindelse med komælksallergi (Roitt 1977, Bahna 1985). Ligeledes hersker der stadig tvivl om betydningen af komplementaktivering ved type-III-hypersensitivitet (immunkompleks-medieret hypersensitivitet) (Savilahti 1981, Husby 1988). Paganella et al. (1979, 1983) har påvist tilstedeværelse af C1q-holdige immunkomplekser i sera fra komælksallergiske børn efter provokation med komælk, mens andre forskergrupper ikke har kunne påvise signifikant komplementaktivering i komælksallergiske patienter efter provokation med komælk (Savilahti 1981, Martin et al. 1984, Husby et al. 1988). Derimod er det generelt accepteret at type-I-hypersensitivitet (atopisk allergi) og type-IV-hypersensitivitet (T-lymfocytmedieret allergi) indgår i patogenesen af komælksallergi (Savilahti 1981, Balli et al. 1983, Bahna 1985). Komælksallergiske patienter udviser ofte reak-

tioner, der svarer til en kombination af flere af de fire typer (Savilahti 1981, Bahna 1985), og det er klinisk set vanskeligt at skelne mellem de forskellige typer. I stedet anvendes ofte en mere enkel inddeling i det kliniske arbejde (Roitt 1977, Firer et al. 1981, Savilahti 1981, Björkstén et al. 1983, Bahna & Gandhi 1983, Ford et al. 1983, Bahna 1985):

Straks allergireaktioner, hvor de kliniske manifestationer indtræder indenfor den første time efter provokation med komælk. De kliniske manifestationer, der typisk er opkastninger, diarre, urticaria, atopisk eksem, åndedrætsbesvær og anafylaksi (Savilahti 1981, Bahna & Gandhi 1983), er oftest et udtryk for en atopisk allergi (type-I-hypersensitivitet), hvor en reaktion mellem allergen og IgE på overfladen af mastceller eller basofile granulocytter fører til en degranulering af cellerne og frigørelse af mediatorer og enzymer.

Forsinkede allergireaktioner, hvor de kliniske manifestationer, væsentligst gastrointestinale (Savilahti 1981, Ford et al. 1983, Pearson et al. 1983), først indtræder flere timer efter provokation med komælk, og hvor den nødvendige provokationsdosis, der kan udløse reaktionerne, ofte er væsentligt højere end den dosis, der udløser straksreaktioner (Firer et al. 1981, Ford et al. 1983). Disse reaktioner kan være et udtryk for en T-lymfocytmedieret allergi (type-IV-hypersensitivitet).

Nogle allergologer anvender betegnelse allergi alene om straks reaktionerne (type-I-hypersensitivitet), mens de forsinkede reaktioner benævnes intolerance (Firer et al. 1981). Andre anvender imidlertid betegnelsen intolerance som synonym for allergi (Jacobsen & Lindberg 1979, Pearson et al. 1983). Denne terminologi har imidlertid ikke vundet generel hævd.

Jeg vil i det følgende anvende type-I-hypersensitivitet som betegnelse for atopisk allergi (straks allergi) og type-IV-hypersensitivitet som betegnelse for T-lymfocytmedieret allergi (forsinket allergi).

Komælksallergi er fortrinsvis en lidelse, der opstår indenfor det første leveår hos 2-5% af alle nyfødte (Jakobsen & Lindberg 1979, Cruikshank 1982, May et al. 1982, Bahna & Gandhi 1983, Østerballe 1983), for derefter ofte at af-

tage inden 3-års alderen (*Savilahti 1981, Bahna & Gandhi 1983*).

Komælksallergiske børn har imidlertid en udtalt tendens til både at udvikle samtidige allergier overfor andre levnedsmidler (æg, citrusfrugter, fisk etc.) og senere at udvikle andre allergier (*Spies 1973, Savilahti 1981, Vitoria et al. 1982, Østerballe 1983*). Det er derfor af afgørende betydning for patienternes senere trivsel, at komælksallergien behandles.

Behandlingen består væsentligst i at forhindre, at patienten udsættes for belastning med komælksprotein. Komælksallergi er genetisk betinget, og det er muligt med relativ stor sikkerhed at udpege en højrisikogruppe, hvor dobbeltdisponering fra forældrene og/eller søskendeallergi kendes. Risikogruppen andrager i Danmark mellem 6 og 10% af alle nyfødte (*Østerballe 1983*).

Diagnose af komælksallergi er ofte behæftet med stor usikkerhed, der er blevet yderligere forstærket ved erkendelsen af, at lidelser som kronisk mellemørebetændelse (*Lorenzen 1985*) og forstyrrelser i centralnervesystemet, f.eks. hovedpine og depression/aggressivitet, kan være fremherskende symptomer på allergi (*Savilahti 1981, Lorenzen 1985*). Der har således længe været interesse i at opnå biokemiske *in vitro* teknikker, der tillader en hurtig og præcis diagnose. Højfølsomme *in vitro* metoder (Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA), Radio-Allergo-Sorbent-Test (RAST) og krydset radioimmunoelktroforese (CRIE))

anvendes i dag til at måle indholdet af komælksproteinspecifikt IgE i patientsera. Et højt serumniveau af specifikt IgE kan indikere, at personen lider af type-I-hypersensitivitet (*Savilahti 1981, Taylor et al. 1982, Basuyau 1983, Björkstén et al. 1983, Bahna 1985, Gjesing et al. 1986*), men en væsentlig del af disse personer med forhøjet niveau af specifikt IgE viser ingen allergisymptomer (Tabel 4) (*Eriksson et al. 1976, Savilahti 1981, Björkstén et al. 1983, Bahna 1985*). Endvidere har en stor gruppe patienter med atopiske allergisymptomer ofte ikke et måleligt forhøjet serumniveau af komælksproteinspecifikt IgE (Tabel 4) (*Björkstén et al. 1983, Bahna 1985*).

IgE findes primært immobiliseret på mastcellernes overflader, og en lokal syntese af IgE, der er tilstrækkelig til at mætte mastcellerne, behøver ikke at give sig udtryk i et forhøjet serumniveau (*Shiner et al. 1975, Pearson et al. 1983*). Det har vist sig, at måling af specifikt IgE i tarmmucosa har en væsentlig bedre prædiktiv værdi end måling af serumniveau af specifikt IgE.

Priktest, hvor allergenekstrakter deponeres i patientens hud, anvendes ofte som diagnostisk redskab. Den diagnostiske værdi af priktest i forbindelse med komælksallergi er imidlertid begrænset (*Aas 1978, Bahna 1985*) og priktest med komælk er ofte positiv i ikke-allergiske personer (5%) samt i allergiske patienter, der ikke viser symptomer på komælksallergi (12%) (*Savilahti 1981*).

Tabel 4. Komælksallergi - Sammenligning af priktest og RAST med oralbelastning (*Bahna 1985*).

Test karakteristika	Priktest	RAST
Sensitivitet (ægte positiv test)	44%	56% (59%)
Specificitet (ægte negativ test)	67%	67% (64%)
Positiv prædiktiv pålidelighed	67%	71% (81%)
Negativ prædiktiv pålidelighed	44%	50% (54%)

Værdier i parentes er beregnet fra *Björkstén et al. (1983)*.

Sensitivitet = % af allergiske patienter med positiv test.

Specificitet = % af ikke-allergiske patienter med negativ test.

Positiv prædiktiv pålidelighed = % af positive med allergi.

Negativ prædiktiv pålidelighed = % af negative uden allergi.

I forbindelse med patienter, der udviste forsinkede allergireaktioner har måling af cirkulerende immunkomplekser, komplementaktivering og immuncytologiske tests været forsøgt anvendt som diagnostiske redskaber (Ford *et al.* 1983). Også i disse tilfælde begrænses den diagnostiske værdi af et højt antal falske negative.

Indenfor de senere år er cytologiske *in vitro* testmetoder, som histaminfrigørings-test (Skov *et al.* 1983, 1984), lymfocyt-migrations-inhibitions-test (Balli *et al.* 1983) og måling af suppressor T-lymfocytaktiviteten (Butler *et al.* 1982) blevet forsøgt anvendt som diagnostisk redskab. Disse metoder synes bedre korreleret med de kliniske iagttagelser end de førnævnte *in vitro* tests, men de isolerede cellelinier har ofte en ufysiologisk høj sensitivitet, der bl.a. bevirker, at f.eks. lymfocyt-migrations-inhibitions-test har en høj score af falske positive (Balli *et al.* 1983, Schambye 1985).

Det er således endnu ikke lykkedes at udforme tilstrækkelig pålidelige *in vitro* metoder til diagnose af komælksallergi, og den førnævnte eliminations-provokations-test er derfor stadig den mest valide og mest udbredte metode til identifikation af de allergener, der er specielt virksomme hos en given patient (Bahna 1985, Gjesing *et al.* 1986, Poulsen & Hau 1986, Husby 1988).

2.3. MÅLING AF KOMÆLKSPROTEINERS OG -PEPTIDERS ALLERGENICITET IN VITRO OG IN VIVO.

2.3.1. *In vitro* måling af komælksproteiners allergenicitet

Fælles for de mest anvendte *in vitro* metoder til måling af komælksproteiners allergenicitet er, at metoderne måler dannelsen af antigen-antistof-komplekser.

Et stort antal forskellige komælksproteiner er blevet identificeret ved immunoelektroforetiske teknikker, hvor kanin anti-bovin kasein antistoffer og kanin anti-bovin valleprotein antistoffer blev anvendt i den antistofholdige 2. dimensionel krydset immunoelektroforese (Løwenstein *et al.* 1977, Løwenstein 1978). Forfatterne konkluderede på baggrund af komælksproteinernes evne til at inducere IgG produk-

tion i kaniner (målt ved dannelsen af immunpræcipitater i immunoelektroforetiske assays), at disse proteiner var potentielle allergener. Dette synspunkt bygger på den antagelse, at proteinernes evne til at inducere IgG produktion ækvivalerer med en tilsvarende evne til under visse betingelser at inducere de humorale og cytologiske mekanismer, der indgår i allergireaktioner. Der sættes således lighedstegn mellem immunogenicitet (her defineret som proteinets evne til at inducere produktion af præcipiterende antistoffer) og allergenicitet, defineret som proteinets evne til både at sensibilisere disponerede patienter (f.eks. inducere persistent produktion af IgE) og efterfølgende at udløse de allergiske reaktioner (inducere degranulering af sensibiliserede mastceller/basofile granulocytter).

Hvis der sættes lighedstegn mellem immunogenicitet og allergenicitet, betyder det, at alle proteiner, der kan inducere antistofdannelse er potentielle allergener. Det er imidlertid kun ganske få proteiner, der med sikkerhed ved provokationstest er påvist at være involveret i humane allergireaktioner. Undersøgelser af komælksallergiske børn provokeret med forskellige oprensede mælkeproteiner viste, at de fleste børn reagerer mod beta-lactoglobulin og kaseiner, mens få børn reagerer mod alfa-lactalbumin og bovint serum albumin (Savilahti 1981). Det er endvidere tvivlsomt, om det er berettiget at sætte lighedstegn mellem immunogenicitet og allergenicitet, fordi de fleste mennesker har cirkulerende immunglobuliner med specificitet mod levnedsmiddelproteiner (Savilahti 1981, Paganelli *et al.* 1983). Hos ikke-allergiske personer tilhører disse immunglobuliner ofte klasserne IgA (Paganelli *et al.* 1983) eller IgG (Husby *et al.* 1985, 1986, Husby 1988), og det er muligt, at det specifikke IgG kan fungere som blokerende antistoffer, der forhindrer allergenets adgang til IgE på mastcellernes overflade (Husby 1988). Det har således ikke været muligt at påvise en sammenhæng mellem allergi og tilstedeværelse af specifikt IgG i blodcirkulationen (Savilahti 1981, Björkstén *et al.* 1983, Husby 1988). Endelig begrænses værdien af denne type assays af, at de ikke giver informationer om proteinernes styrke som aller-

gen f.eks. i form af dosis-respons sammenhæng.

Ved anvendelse af de ekstremt følsomme teknikker RAST og ELISA har det været muligt at påvise komælksproteinspecifikt IgE i sera fra adskillige veldokumenterede type-I-hypersensitive komælksallergiske patienter (Eriksson *et al.* 1976, Basuyau *et al.* 1983, Bahna 1985, Gjesing *et al.* 1986). Ved disse undersøgelser opnås en mere valid identifikation af de komælksproteiner, der kan være involveret i type-I-hypersensitivitetsreaktioner. Undersøgelserne har vist, at mere end 25 forskellige komælksproteiner potentielt kan fungere som allergener i type-I-hypersensitivitetsreaktioner (Bahna & Gandhi 1983, Gjesing *et al.* 1986). Mest hyppigt findes IgE med specificitet mod beta-lactoglobulin (62-80%), kasein (60%), alfa-lactalbumin (53%) og bovint serum albumin (52%) (Bahna & Gandhi 1983).

Målinger af IgE-specificitet mod komælksproteiner i patientsera kan ikke tillægges prædiktiv værdi m.h.t. allergenernes styrke, fordi undersøgelserne ikke har inddraget dosis-respons-sammenhænge.

Virkning af varmebehandling på komælksproteiner er blevet undersøgt ved anvendelse af immunoelektroforetiske teknikker (Bahna & Gandhi 1983), der viste, at kaseiner bevarer deres evne til at danne immunpræcipitater med antistoffer rejst mod native mælkeproteiner selv efter opvarmning til 120 grader Celsius i 15 min, mens valleproteinerne var labile. Bovint serum albumin og bovine immunoglobuliner mister deres immunpræcipiterende egenskaber ved opvarmning til 70-80 grader Celsius, mens lactalbumin og lactoglobulin tåler kortvarig kogning.

Dannelse af maillardreaktionsprodukter angives at føre til dannelse af nye antigendeterminanter, defineret primært ved reaktionsproduktets sukkerdel. Således fandt Matsuda *et al.* (1985), ved anvendelse af ELISA, at antistoffer rejst mod maillardreaktionsproduktet mellem beta-lactoglobulin og laktose ligeledes havde specificitet mod reaktionsproduktet mellem ovalbumin og laktose. Otani & Tokita (1982) viste tilsvarende, at maillardreaktionsproduktet mellem laktose og lactoglobulin fører til

dannelse af nye antigendeterminanter. Dannelsen af maillardreaktionsprodukter er imidlertid begrænset ved pasteurisering, og de kan derfor antages kun at have begrænset betydning i forbindelse med komælksallergi.

2.3.2. *In vitro* måling af peptiders allergenicitet.

Det blev allerede i 1962 vist, at enzymatisk hydrolyse af betalactoglobulin og alfa-lactalbumin fjernede proteinerne evne til at danne immunpræcipitater (Bengtsson *et al.* 1962). En iagttagelse, der senere er blevet bekræftet flere gange (Seban *et al.* 1977, Knights 1985, Gjesing *et al.* 1986). Præcipitin-inhibitions-test (Atassi 1977, Atassi & Habeeb 1977, Habeeb 1978) blev anvendt til at vise, at de antigene determinanter (epitoper) på myoglobin, lysozym og bovint serum albumin havde en udstrækning på 6-7 aminosyrerester, og syntetiske peptider med epitoperne aminosyresekvens kunne ligeledes fungere i den anvendte test. To oprensede peptider på henholdsvis 950 Da og 575 Da, fremstillet ud fra trypsinbehandlet beta-lactoglobulin, blev angivet at være aktive i hæmagglutination-inhibitions-test og præcipitin-inhibitions-test (Bing & Stavitsky 1968). Gennemsnitmolekylvægten for aminosyrerester er cirka 125 Da, hvorfor de to peptider ikke kan have haft mere end henholdsvis 8 og 5 aminosyrerester. Peptiderne kan således kun have repræsenteret en antigendeterminant. Nativt beta-lactoglobulin har imidlertid flere forskellige antigendeterminanter. Det forekommer umiddelbart uforståeligt, at et peptid, der alene repræsenterer en af disse determinanter, kan være i stand til fuldstændigt at inhibere hæmagglutination og immunpræcipitation i assays, der anvender polyklont, monospecifikt antistof med specificiteter mod en række forskellige antigendeterminanter på nativt beta-lactoglobulin.

Haddad *et al.* (1979) har vist tilstedeværelse af IgE antistoffer med specificitet mod pepsin-og/eller trypsinhydrolyseret beta-lactoglobulin, men ikke mod nativt beta-lactoglobulin i sera fra visse komælksallergiske patienter. Forfatterne antog på baggrund heraf, at mild hydrolyse af beta-lactoglobulin kan føre til en

ændret konfiguration og dermed til dannelse af nye antigendeterminanter, der ikke findes på uhydrolyseret bata-lactoglobulin. Forfatterne foreslog, at måling af IgE med specificitet for spaltningsprodukter af komælksproteiner kunne inddrages i *in vitro* diagnose af type-I-hypersensitivitet.

2.3.3. *In vivo* metoder.

Forsøgsdyrmodeller er blevet anvendt i vid udstrækning i allergiforskningen både ved undersøgelser af parametre, der har indflydelse på hypersensibilisering (*Hargis & Malkiel* 1970, *Levine & Vaz* 1970, *Dolezel & Bienenstock* 1971a,b, *Vaz et al.* 1971, *Andre et al.* 1973, *Jarrett & Steward* 1974, *Bazin & Platteau* 1976, *Jarrett et al.* 1976, *Jarrett* 1978), ved undersøgelser af tarmoptagelse af potentielle allergener (*Berenstein & Ovary* 1968, *Malo & Morin* 1986, *Koritz et al.* 1987a,b), ved målinger af levnedsmidlers allergenicitet (*Takase et al.* 1979, *McLaughlan et al.* 1981, *Heppell et al.* 1984, *Knights* 1985, publikation I-VI) og ved undersøgelser af mulige behandlingsformer (*Lewis et al.* 1986). Forsøgsdyrmodeller for både type-I-hypersensitivitet (inhalationsallergimodeller (*Clausen et al.* 1983) og levnedsmiddelallergimodeller (*McLaughlan et al.* 1981, *Heppell et al.* 1984, *Knights* 1985, publikation I-III)) og type-IV-hypersensitivitet (*Singh et al.* 1980) kendes.

Forsøgsdyrmodellerne inddrager i modsætning til *in vitro* metoderne både immunsystemets humorale og cytologiske mekanismer, og simulerer derfor i højere grad humane hypersensitivetsreaktioner (*Schambye* 1985, *Poulsen & Hau* 1986). Immunsystemet er uhyre konservativt, og indenfor mammalia er tilstedeværelse af de forskellige immunglobulin-klasser og subklasser dokumenteret i en række forskellige arter. Ligeledes findes de samme cellelinier (B- og T-lymfocytter, makrofager, granulocytter, mastceller etc.) i alle undersøgte pattedyrarter. Musens immunsystem har traditionelt været anvendt som modelsystem i basal immunologisk forskning (*Roitt* 1977, *Tizard* 1982, *Bendixen* 1986), og en overvejende del af vor viden i dag om interaktion mellem forskellige celler i immunsystemet (f.eks. B- og T-lym-

focytinteraktion), om mediatorers virkemåde og om B-lymfocytstimulering og syntese af immunglobuliner er baseret bl.a. på intensive studier af mus (*Tizard* 1982). Ligeledes har musens Major Histocompatibility Complex (MHC), der var det først kortlagte MHC-system, fungeret som modelsystem ved undersøgelser af dette systems betydning i forbindelse med transplantationsbiologi og reproduktionsbiologi.

Musens immunsystem er væsentligt bedre karakteriseret end de fleste andre dyrearters, og det er veldokumenteret, at musens immunsystem og MHC-system snævert modsvarer de tilsvarende humane systemer. Der er således grund til at antage, at en immunologisk iagttagelse gjort i mus (eller andre velkarakteriserede forsøgsdyr) også vil være gældende i mennesker.

Indenfor allergiforskningen har det vist sig, at forskellige forsøgsdyrarter udviser forskelle i deres anafylaktiske reaktioner (*Lewis* 1978). Disse forskelle er bl.a. et udtryk for, at de forskellige forsøgsdyr udviser forskelle i mastcelletæthed i de forskellige organer, samt at organerne responderer med forskellig styrke. Disse forskelle, der også repræsenterer afvigelser fra de kliniske manifestationer ved human atopisk allergi, gør det vanskeligt at sammenligne styrken af allergener i forskellige arter, men anvendelse af forsøgsdyr til test af den potentielle allergenicitet kan alligevel være vejledende for virkningen af disse forbindelser i mennesker, og forsøgsdyr kræves i vid udstrækning anvendt til test af f.eks. nye medikamenters allergenicitet (*Knights* 1985).

Det skal imidlertid fremhæves, at de allergiske reaktioner i forsøgsdyr ofte induceres eksperimentelt på måder (f.eks. intravenøs injektion af allergen), der ikke direkte kan sammenlignes med den spontane induktion af de humane hypersensitivetsreaktioner. I forbindelse med levnedsmiddelallergi er det en svaghed, at forsøgsdyrmodellerne ikke i tilstrækkelig grad simulerer de allergiske reaktioner i tarmvæggen, der ofte kan registreres i forbindelse med f.eks. human komælksallergi.

2.3.4. *In vivo* måling af komælksproteiners allergenicitet.

Anafylaktisk-shock-modeller med brug af marsvin (McLaughlan *et al.* 1981, Heppell *et al.* 1984, Knights 1985) har bl.a. været anvendt til at undersøge effekten af varmebehandling på komælksproteiners allergenicitet. Allergeniciteten af valleproteiner kunne reduceres effektivt ved stærk varmebehandling, mens kaseinerne i vid udstrækning bevarer deres allergenicitet (McLaughlan *et al.* 1981, Heppell *et al.* 1984). Et resultat, der er i overensstemmelse med, at kaseiner er væsentligt mere varmestabile end valleproteiner (Edelsten 1982, Bahna & Gandhi 1983).

2.3.5. *In vivo* måling af peptiders allergenicitet.

Undersøgelser af komælkspeptiders allergenicitet er overvejende blevet udført ved anvendelsen af passiv-kutan-anafylaksi-test (PCA) eller passiv-kutan-anafylaksi-inhibitions-test på marsvin, rotter og mus (Bengtsson *et al.* 1962, Lui *et al.* 1967, Bing & Stavinsky 1968, Takase *et al.* 1979, Kurisaki *et al.* 1982, Knights 1985, publikation IV, Poulsen & Hau 1987b, Poulsen & Hau 1988a,b).

I modsætning til *in vitro* inhibitionstest, skal peptider generelt være væsentlig større for at udløse reaktioner i PCA-inhibitions-tests. Kurisaki *et al.* (1982) fandt, at peptider mindre end 10000 Da, fremstillet ud fra enzymatisk hydrolyse af beta-lactoglobulin med trypsin, chymotrypsin eller pepsin, ikke var aktive i PCA-inhibitions-test på rotter. På baggrund af disse resultater konkluderedes, at peptider mindre end 10000 Da må anses for at være hypoallergene. Denne konklusion, der bygger på et spinkelt grundlag, er siden uden yderligere dokumentation blevet generelt accepteret (Tizard 1982). Tidligere undersøgelser (Lui *et al.* 1967) har imidlertid vist, at et 7200 Da peptid fra bovint serum albumin gav positiv reaktion i PCA-test, kvantitativ præcipitin-test og præcipitin-inhibitions-test. To peptider på henholdsvis 950 Da og 575 Da blev angivet at være virksomme i PCA-inhibitionstest (Bing & Stavitsky 1968). Sidstnævnte forfattere anvendte polyklonale antistoffer, og det er, som før nævnt,

vanskeligt at forestille sig, hvorledes et peptid, der højst kan repræsentere en antigendeterminant, kan have en generel inhibitorisk effekt i en test, hvor antistoffer med specificitet mod et større antal forskellige antigendeterminanter anvendes.

3. MURIN ANAFYLAKTISK SHOCK MODEL. VIRKNING AF HOMOGENISERING OG PASTEURISERING PÅ KOMÆLKS ALLERGENICITET.

Disse undersøgelser er beskrevet i detaljer i publikation I-III. Nærværende sammenfatning og diskussion inddrager endvidere præliminære undersøgelser, der ikke tidligere er blevet publiceret.

3.1. UDVIKLING OG OPTIMERING AF EN MURIN ANAFYLAKTISK SHOCK MODEL.

3.1.1. Formål

Nedenstående arbejder med den murine anafylaktisk shock model blev udført, for at undersøge om anvendelse af moderne mejeribrugsteknologi har en effekt på konsummælks allergenicitet, d.v.s. komælksens evne til at inducere en persistent reaginsyntese, og mælksens evne til at udløse anafylaktiske reaktioner i sensibiliserede dyr.

Som tidligere nævnt kan kraftig varmebehandling ændre mælks allergenicitet både ved denaturering af valleproteinerne, hvilket reducerer allergeniciteten, og ved dannelse af maillardreaktionsprodukter, der kan repræsentere nye antigendeterminanter.

Undersøgelser af en mulig virkning af homogenisering på mælks allergenicitet er ikke tidligere blevet publiceret af andre forskergrupper, men lægfolk har ofte hævdet, at deres komælksallergiske børn tåler ubehandlet mælk (Lorenzen 1985). Denne påstand har ikke kunne be- eller afkræftes entydigt ved kliniske undersøgelser (Hansen *et al.* 1987). Det har ligeledes været hævdet, at gedemælk, der blev markedsført uhomogeniseret, kan tåles af komælksallergiske patienter, men undersøgelser bl.a. i Finland har vist, at dette kun er tilfældet for cirka 13% af de veldokumenterede ko-

mælksallergiske børn (*Juntunen & Ali-yrkkö* 1983).

3.1.2. Valg af forsøgsdyr

Systemisk anafylaktisk shock test udføres traditionelt i marsvin (*McLaughlan et al.* 1981, *Heppell et al.* 1984, *Knights* 1985), og metoden kræves anvendt i USA i forbindelse med godkendelse og kvalitetskontrol af produkter til intravenøs brug (*Knights* 1985).

Både marsvin (*McLaughlan et al.* 1981, *Heppell et al.* 1984, *Knights* 1985), hamster (*Dolezel & Bienenstock* 1971a,b), rotter (*Bazin & Platteau* 1976, *Jarrett et al.* 1976, *Jarrett* 1978) og mus (*Hargis & Malkiel* 1970, *Andre et al.* 1973) kan sensibiliseres via den orale rute. En høj titer af IgE kan opnås ved oral sensibilisering af rotter med lave doser af antigen (*Jarrett et al.* 1976, *Jarrett* 1978). Mus har imidlertid væsentlige fordele frem for marsvin og rotter ved:

- Musens immunsystem er væsentligt bedre karakteriseret end immunsystemet hos f.eks. rotter eller marsvin (se afsnit 2.3.).
- Veldefinerede stammer, hvoraf nogle, der er karakteriseret ved en høj mastcelletæthed (*Levine & Vaz* 1970, *Vaz & Ovary* 1970), må forventes at have en høj følsomhed i systemisk anafylaktisk shock test. De forskellige musestammer er bedre karakteriseret end de forholdsvis fåtallige marsvinstammer. BALB/c mus blev anvendt, fordi en stor fraktion af denne stammes mastceller frigør histamin *in vitro*, når mastcellerne, der blev sensibiliseret med homologe antistoffer, belastes med antigenet (*Vaz & Ovary* 1970). Dette kan tages som udtryk for, at BALB/c mus er en high-responder stamme. Endvidere stillede dyrlæge H.-J. Skovgaard Jensen, Panum Institutet, indavlede BALB/c mus til rådighed i det omfang avlen resulterede i overskudsmus.
- Brugen af indavlede dyr minimerer den biologiske variation foranlediget af genetiske forskelle.
- Mus er væsentligt lettere at injicere intravenøst end marsvin.
- Anskaffelsesprisen og omkostningerne ved pasning af mus er væsentligt lavere end for marsvin.

Anvendelse af mus i stedet for marsvin tillader gennemførelse af større faktorielle forsøg inden for et afgrænset budget, ligesom det er lettere at tolke de opnåede resultater i lyset af den forhåndenværende viden om musens immunsystem.

3.1.3. Udvikling af model

Evaluerings af anafylaktiske reaktioner:

Traditionelt er anafylaktisk shock modeller blevet evalueret ved simpelthen at opgøre antallet af letale shock som fraktion af antallet af belastede dyr f.eks. 6 timer efter intravenøs belastning (*McLaughlan et al.* 1981, *Heppell et al.* 1984). Dette kriterium er uheldigt, vigtigst fordi anafylaktisk shock indebærer et betydeligt trauma for forsøgsdyret. Et trauma, der ikke kan imødegås ved anvendelse af bedøvelse. Endvidere viste indledende undersøgelser på oralt sensibiliserede mus både, at anafylaktisk shock i mus indtræder allerede 15-30 min efter intravenøs belastning med antigen, og, at nogle dyr faktisk overlever selv en voldsom anafylaktisk reaktion. Anvendelse af antallet af døde dyr, opgjort på et senere tidspunkt, vil derfor indebære en risiko for underestimering og samtidig påføre dyrene unødvendig lidelse. En mere nuanceret evaluering af de anafylaktiske reaktioner har været foreslået af *Treadwell et al.* (1960), der bl.a. evaluerede reaktioner som kløe, hyperventilering, mobilitetsændringer og kramper. Fysiologiske målinger af lungefunktioner, blodtryk og puls har ligeledes været anvendt i evaluering af anafylaktiske reaktioner (*Ufkes et al.* 1983).

Følgende anafylaktiske shock score blev anvendt i nærværende arbejde (publikation I-III):

- 0 dyret viser ingen reaktioner bortset fra en eventuel svag hyperventilering, der kan være en stressreaktion mod den intravenøse injektion.
- + dyret sidder ofte ubevægeligt, men bevæger sig langsomt ved provokation (berøring ved haleroden).
- ++ dyret er ubevægeligt og bevæger sig ikke ved provokation. Dyret har vanskeligt ved at rejse sig, hvis det lægges på siden.
- +++ dyret viser voldsomme krampeanfald, der berører hele kroppen.

De anafylaktiske reaktioner blev registreret i 30 min efter intravenøs belastning med mælk. Dyr der udviste anafylaktisk shock score +++ blev af etiske grunde øjeblikkeligt aflivet ved dislokation af halshvivlerne.

Ved statistisk behandling af resultaterne anvendtes Fishers Eksakte Test, idet antallet af dyr med anafylaktisk score 0 og + blev adderet og opfattet som udtryk for manglende eller svag reaktion, mens score ++ og +++ samlet blev opfattet som stærk anafylaktisk reaktion (publikation I).

Et indledende pilotforsøg (publikation I) blev udført for at undersøge følsomheden af BALB/cBom mus i anafylaktisk shock test ved anvendelse af

- forskellige sensibiliseringsmetoder (oral og intraperitoneal). De anvendte dyr var 5-6 uger gamle BALB/cBom mus avlet i mere end 5 generationer på komælksproteinfrifoder (Laboratorium for Forsøgsdyrkundskab, KVL). I den resterende del af afhandlingen vil BALB/cBom (KVL) angive, at musene har været avlet ved KVL på mælkefrifoder i flere generationer.
- belastning med ubehandlet komælk og homogeniseret-pasteuriseret sødmælk ved forskellige dosisniveauer. Begge mælketyper havde 3,5% fedtindhold, og var fremstillet ud fra samme batch mælk.

Oral sensibilisering.

Undersøgelser af mælks allergenicitet ved anafylaktisk shock test på marsvin kan udføres ved, at marsvinene sensibiliseres ved at drikke mælk *ad libitum* i 2 uger (McLaughlan *et al.* 1981, Heppell *et al.* 1984). I denne undersøgelse blev 70 BALB/cBom mus sensibiliseret ved *ad libitum* at æde foderpiller med 15% skummetmælkspulver. Efter 1 uge på en mælkeproteinfri diæt blev 15 mus aflødt, og en pool af sera fremstillet til senere titerbestemmelse af IgE ved murin PCA-test (se afsnit 4.2.1). Samme dag blev resten af musene belastet med intravenøs injektion af mælkeprøver.

Intraperitoneal sensibilisering.

Den alternative metode til intraperitoneal sensibilisering med lave doser af fysiologisk saltvand (kontrolgruppen 70 BALB/cBom (KVL)

mus), ubehandlet mælk (70 BALB/cBom (KVL) mus) eller homogeniseret-pasteuriseret sødmælk (70 BALB/cBom(KVL) mus) blev udført som beskrevet i afsnit 4.1.3. I de to sidstnævnte grupper indeholdt primærinjektionerne 10 mikrogram mælkeprotein/mus og boosterinjektionerne 1,0 mikrogram mælkeprotein/mus. 4 dage efter den sidste boosterinjektion blev 15 mus fra hver gruppe aflødt, og en pool af sera fremstillet til senere titerbestemmelse af IgE.

Dosis-respons undersøgelser i anafylaktisk shock test blev udført 4 dage efter sidste boosterinjektion ved at belaste sensibiliserede mus eller kontrolmus med enten ubehandlet mælk eller homogeniseret-pasteuriseret sødmælk i følgende doser:

- 2040 mikrogram mælkeprotein/mus
 - 1020 mikrogram mælkeprotein/mus
 - 340 mikrogram mælkeprotein/mus
 - 115 mikrogram mælkeprotein/mus
- 5 mus blev belastet ved hvert dosisniveau.

Pilotundersøgelserne viste, at mus sensibiliseret ved at æde foderpiller indeholdende 15% skummetmælksprotein, og mus sensibiliseret ved gentagne intraperitoneale injektioner med lave doser af ubehandlet mælk eller homogeniseret-pasteuriseret mælk opnåede stort set samme sensibiliseringsgrad målt ved den laveste dosis af konsummælk (340 mikrogram komælksprotein/mus), der ved intravenøs injektion kunne inducere anafylaktisk shock. Intraperitoneal sensibilisering resulterede derimod i en væsentlig højere PCA-titer af IgE end oral sensibilisering (se afsnit 4.2.1.), mens kontrolgruppen ikke viste målelige PCA-titre af mælkespecifikt IgE, og ingen kontrolmus viste anafylaktiske reaktioner ved belastning med ubehandlet mælk eller pasteuriseret-homogeniseret mælk i doser under 1020 mikrogram/dyr (publikation I).

Uafhængig af hvilken type mælk, der blev anvendt til sensibilisering af musene, kunne intravenøs belastning med ned til 340 mikrogram/mus af den homogeniserede-pasteuriserede konsummælk inducere systemisk anafylaktisk shock i sensibiliserede mus, mens cirka 2000 mikrogram mælkeprotein/mus af den ubehandlede mælk var nødvendigt for at opnå en

tilsvarende effekt. Ved denne koncentration viste kontrolmusene svage reaktioner ved belastning med begge typer mælk. Kontrolmusenes reaktioner hidrørte muligvis fra en generel patologisk effekt af intravenøs injektion af høje koncentrationer af fedtlegemer og kaseinmiceller. På baggrund af resultaterne fra pilotundersøgelsen blev modellen standardiseret inden udførelsen af det større faktorielle forsøg, hvor effekten af varmebehandling, fedtindhold og homogenisering på mælks evne til at udløse anafylaktisk shock i mus blev undersøgt (se afsnit 3.2.1.).

Følgende standardprocedure blev valgt:

- anvendelse af oral sensibiliseringsmetode. Denne metode, der var ligeså effektiv som intraperitoneal sensibilisering m.h.t. musenes anafylaktisk shock sensitivitet, blev foretrukket, væsentligst fordi oral sensibilisering ved anvendelse af mælkeproteinholdigt foder er mindre tidskrævende end intraperitoneal sensibilisering.
- anvendelse af belastningsdoser mindre end 1000 mikrogram protein/mus for at undgå uspecifikke reaktioner.

3.1.4. Behandling af anafylaktisk shock med adrenalin.

Det er velkendt, at adrenalin modvirker effekten af de mediatorer, der frigøres i forbindelse med mastcelledegranulering, og injektion af adrenalin anvendes i klinikken, hvis komælksallergiske patienter viser voldsomme type-I-hypersensitivitetsreaktioner ved provokation med mælk.

I nærværende pilotundersøgelse blev virkningen af injektion af adrenalin på anafylaktisk shock i den murine model undersøgt (ikke-publicerede resultater).

3 BALB/cBom mus blev oralt sensibiliseret som beskrevet i afsnit 3.1.3. Musene blev belastet med intravenøs injektion af homogeniseret sødmælk (900 mikrogram protein/mus). I løbet af 5 - 10 min udviklede musene anafylaktisk shock. Musene blev herefter behandlet med enten intraperitoneal injektion af adrenalin (50 mikrogram/kg, en mus) eller intravenøs injektion af adrenalin (50 mikrogram/kg, 2 mus). Intravenøs behandling med adrenalin bragte øjeblikkelig musene ud af den akutte anafylaktiske reaktion.

Derimod havde intraperitoneal injektion af adrenalin kun en begrænset effekt. Resultatet indikerer, at de iagttagede reaktioner hos belastede mus kunne bringes til ophør med adrenalin analogt med erfaringer fra den humane klinik.

3.1.5. Sammenligning af sensitivitet i anafylaktisk shock model udført på mus og marsvin.

Et pilotstudie af BALB/cBom(KVL) mus og marsvin (Hartley Crl:(HA)BR, Charles River, velvilligt doneret af Afdelingsleder, dyrlæge Hans Jørgen Skovgård-Jensen, Panum Institutet, Københavns Universitet) blev udført, for at sammenligne følsomheden af de to arter i anafylaktisk shock model. Begge stammer havde været avlet i flere generationer på mælkeproteinfrigt foder. 20 mus og 10 marsvin blev sensibiliseret via den orale rute ved *ad libitum* at æde foderpiller indeholdende 15% skummetmælkspulver i 14 dage. Herefter blev det mælkeproteinholdige foder erstattet med mælkeproteinfrigt foder i en uge. De sensibiliserede dyr blev belastet med intravenøs injektion af homogeniseret sødmælk.

Resultatet af undersøgelsen er summeret i Tabel 5 (ikke-publicerede resultater).

Tabel 5. Systemisk anafylaktisk shock test i mus og marsvin ved anvendelse af bovin mælk som antigen.

Fortyndingsgrad af sødmælk	mikrogram protein pr. ml	mikroliter I.V. pr. mus	mikroliter I.V. pr. marsvin
Ufortyndet	36000	250	1000
1:10	3600	250	1000
1:30	1200	250	n.d.
1:90	400	250	n.d.

3 dyr blev belastet ved hvert dosisniveau
n.d. = ikke undersøgt

Musene reagerede med anafylaktisk shock på homogeniseret mælk ned til fortynding 1:30. Marsvinene reagerede alene med anafylaktisk shock ved intravenøs injektion med ufortyndet homogeniseret mælk.

De anvendte mus vejede cirka 25 gram og marsvinene cirka 800 gram. Beregnes følsomheden i mg protein pr. kg legemesvægt fås en følsomhed på cirka 12 mg protein/kg mus og cirka 45 mg/kg marsvin.

3.2. APPLIKATION AF ANAFYLAKTISK SHOCK MODEL TIL STUDIER AF EFFEKTEN AF HOMOGENISERING OG PASTEURISERING PÅ BOVINE MÆLKEPROTEINERS ALLERGENICITET.

3.2.1. Sammenligning af ubehandlet mælks og homogeniseret-pasteuriseret mælks evne til at inducere anafylaktisk shock i sensibiliserede mus.

Som nævnt i afsnit 3.1.1. har lægfolk og enkelte speciallæger hævdet, at nogle komælksallergiske børn kan tåle ubehandlet mælk, men ikke konsummælk.

Nærværende faktorielle forsøgsrække, der er beskrevet i detaljer i publikation I-III, blev udført for at undersøge om moderne metoder til

fremstilling af konsummælk påfører mælken en ændret allergenicitet, der er målelig ved anvendelse af den murine anafylaktisk shock model. I forsøgsrækken blev kombinationen af varmebehandling (lavpasteurisering (73 grader Celsius i 15 s) og kogning (100 grader Celsius i 30 min), fedtindhold (0,05%, 1,5% og 3,5% mælkefedt) og homogenisering (175 kg/cm²) undersøgt. Alle de anvendte mælketyper blev fremstillet på Mejeriet Enigheden ud fra samme batch ubehandlet mælk (Tabel 6). Til eksperimentet blev anvendt BALB/cBom mus sensibiliseret ved *ad libitum* at æde foderpiller med 15% skummetmælksprotein. Den statistiske behandling af resultaterne fremgår af publikation I.

De vigtigste resultater af undersøgelserne var:

1. Alene de homogeniserede mælkeprøver var i stand til at inducere anafylaktisk shock i sensibiliserede mus ved doser lavere end 900 mikrogram/dyr.
2. De homogeniserede mælkeprøvers evne til at inducere systemisk anafylaktisk shock steg signifikant med stigende fedtindhold. Skummetmælk (0.05-175-LP) var alene i stand til at inducere anafylaktiske reaktioner ved en dosis på 900 mikrogram/dyr,

Tabel 6. Forskellige mælkeprøver fremstillet ved at variere fedtindhold, homogeniseringstryk og graden af varmebehandling (publikation I og III).

Nomenklatur	Fedtindhold (%)	Homogenisering (kg/cm ²)	Varmebehandling
0.05-0-0	0,05	0	ingen
0.05-0-LP	0,05	0	LP
0.05-0-B	0,05	0	B
0.05-175-LP+	0,05	175	LP
0.05-175-B	0,05	175	B
1.5-0-LP	1,5	0	LP
1.5-0-B	1,5	0	B
1.5-175-LP+	1,5	175	LP
1.5-175-B	1,5	175	B
3.5-0-LP	3,5	0	LP
3.5-0-B	3,5	0	B
3.5-175-LP+	3,5	175	LP
3.5-175-B	3,5	175	B

+ De tre mest solgte mælketyper i Danmark.

LP = Lavpasteuriseret, 73 grader Celsius i 15 s

B = Kogt i 30 min

mens lavpasteuriseret letmælk (1.5-175-LP) og sødmælk (3.5-175-LP) kunne inducere anafylaktiske reaktioner ved 300 mikrogram/dyr.

3. Lavpasteurisering havde ingen signifikant effekt på mælkeprøvernes evne til at inducere anafylaktisk shock, mens kogning reducerede denne evne specielt i homogeniserede mælkeprøver med lavt fedtindhold. Således kunne kogt skummetmælk (0.05-175-B) ikke udløse anafylaktiske reaktioner ved 900 mikrogram/dyr, kogt letmælk (1.5-175-B) kunne alene inducere anafylaktiske reaktioner ved 900 mikrogram/dyr, mens kogt sødmælk (3.5-175-B) kunne inducere anafylaktiske reaktioner ved 300 mikrogram/dyr.

Resultaterne demonstrerede, at homogenisering har en forstærkende virkning på mælks evne til at udløse anafylaktiske reaktioner i sensibiliserede mus. Ved bedømmelsen af resultaternes potentielle betydning for human komælksallergi skal der selvfølgelig tages forbehold overfor anvendelse af en forsøgsdyrmodel, hvor dyrene belastes med intravenøs injektion af mælk, hvilket er en væsentlig afvigelse fra den orale belastning, der bevirker udløsning af de kliniske manifestationer i komælksallergiske patienter. Som tidligere nævnt (afsnit 2.3.) er musens og menneskets immunsystem meget nært beslægtet, og det er således muligt, at homogenisering også vil have en forstærkende effekt på mælks evne til at udløse anafylaktiske reaktioner i type-I-hypersensitive komælksallergiske patienter. En uddybende diskussion heraf findes i afsnit 3.3.2. og 3.3.3.

3.2.2. Test af uhomogeniseret modernmælks-erstatning.

Generne ved komælksallergi er knyttet til styrken af de kliniske manifestationer, og anvendelse af produkter med nedsat evne til at udløse de allergiske reaktioner kan muligvis reducere generne.

Specielt modernmælks-erstatninger, der typisk har et fedtindhold på 3,5% og et proteinindhold på cirka 1,8% (Theuer 1983), fremstilles ved anvendelse af et højt homogeniseringsstryk, der er nødvendigt for at opnå et stabilt, tørret produkt.

Modernmælks-erstatninger anvendes oftest inden barnet er 12 mdr. gammelt, og det er teoretisk muligt, bedømt ud fra de førnævnte undersøgelser på mus og de efterfølgende undersøgelser på atopiske komælksallergiske børn (Høst & Samuelsson 1988), at konventionelle modernmælks-erstatninger resulterer i unødvendig stærke reaktioner i svagt atopiske børn, der muligvis ville kunne tolerere en modernmælks-erstatning med nedsat evne til at udløse disse reaktioner (Poulsen & Hau 1987a).

Firmaet Milco Export A.m.b.A., der er en dansk salgsorganisation for producenter af tørrede mælkeprodukter, forsøgte at fremstille en tørret modernmælks-erstatning ved anvendelse af en fremgangsmåde, der ikke involverer egentlig homogenisering. Denne modernmælks-erstatning og en konventionel modernmælks-erstatning blev undersøgt blindt i den murine anafylaktisk shock model. Uhomogeniseret og homogeniseret sødmælk blev anvendt som kontrolprøver. Resultatet af undersøgelsen fremgår af Tabel 7 (ikke-publicerede resultater). Musene blev sensibiliseret oralt ved at æde

Tabel 7. Sammenligning af uhomogeniseret og homogeniseret modernmælks-erstatninger i den murine anafylaktisk shock model.

Dosis (mikrogram protein/mus)	Homogen. modernmælks- erstatning	Uhomogen. modernmælks- erstatning	Homogen. sødmælk	Uhomogen. sødmælk
900	+++	+++	+++	0
600	+++	++	+++	0
300	+++	0+	+++	0

Tre sensibiliserede mus blev anvendt ved hvert dosisniveau. Den anvendte evaluering af de anafylaktiske reaktioner er beskrevet i afsnit 3.1.3.

komælksproteinholdige foderpiller *ad libitum* som beskrevet i afsnit 3.1.3.

Undersøgelserne viste, at den uhomogeniserede modernælkserstatning havde nedsat evne til at udløse anafylaktiske reaktioner i mus, sammenlignet med den konventionelle, homogeniserede modernælkserstatning. Den uhomogeniserede prøve viste imidlertid væsentlig større reaktivitet end uhomogeniseret sødmælk. Den efterfølgende mikroskopi af den uhomogeniserede modernælkserstatning viste, at fedtlegemerne var relativt mindre end fedtlegemerne i uhomogeniseret sødmælk. Det er sandsynligt, at pasteurisering og især spraytørring af modernælkserstatningen har haft en vis homogeniserende effekt. Eftersom kliniske undersøgelser har vist, at kun få komæksallergiske børns kan tolerere uhomogeniseret mælk (Hansen *et al.* 1987), er det næppe sandsynligt, at en uhomogeniserede modernælkserstatning, der svarer til den her undersøgte, vil have en praktisk anvendelighed som næringsmiddel til komæksallergiske børn.

3.2.3. Undersøgelse af emulsioner af olie og ovalbumin i anafylaktisk shock model.

Formål.

Undersøgelserne af homogeniseret mælk sammenlignet med uhomogeniseret mælk viste, at de ved homogeniseringen dannede lipid-protein-komplekser har en stærkt forøget evne til at udløse systemisk anafylaktisk shock i mus sammenlignet med mælkeproteinene alene. Ovalbumin er kendt som et stærkt allergen (Ovary 1964), og dette protein har været anvendt som modelallergen i et stort antal basalvidenskabelige undersøgelser i forskellige forsøgsdyrmodeller til simulering af human allergi (Vaz *et al.* 1971, Jarrett & Steward 1974, Bazin & Platteau 1976, Jarrett *et al.* 1976, Jarrett 1978, Clausen *et al.* 1983, Matsuda *et al.* 1985, Malo & Morin 1986). Nærværende arbejde blev udført for at analysere, om dannelse af lipid-protein-komplekser generelt kan forøge allergens reaktivitet i den anafylaktiske shock test. Emulsionen af olie og ovalbumin blev anvendt for at opnå et system, der kun indeholdt

et defineret allergen i modsætning til mælk, der indeholder mere end 25 potentielle allergener (publikation III).

Forsøgets udførelse og resultat.

40 BALB/c mus blev sensibiliseret for høj IgE-titer mod ovalbumin (Sigma) som beskrevet i afsnit 4.1.3. Ved primær injektionen blev anvendt 2 mikrogram protein pr. mus og ved de efterfølgende boosterinjektioner 0,2 mikrogram protein pr. mus. 10 sensibiliserede mus blev aflødt 4 dage efter sidste boosterinjektion og en pool af sera fremstillet. Homolog murin PCA-test (afsnit 4.1.3.) blev anvendt til at bestemme IgE-titer til 1:128. Emulsioner af 3,5% majsolie og 3,5% ovalbumin i 0,9% NaCl blev fremstillet. Halvdelen af emulsionerne blev homogeniseret på en French Press, hvor prøven presses igennem en smal dyse ved et tryk på 200 kg/cm². Hver homogenisering blev udført tre gange for at sikre en maksimal dannelse af lipid-protein-komplekser. De homogeniserede emulsioner var stabile ved henstand ved 5 grader Celsius i mindst 48 timer. Homogeniseret og ikke-homogeniseret emulsion af olie-ovalbumin blev fortyndet til et proteinindhold på henholdsvis 3600 mikrogram/ml, 1200 mikrogram/ml og 400 mikrogram/ml. De fortyndede prøver blev anvendt som antigenpræparationer til intravenøs belastning af sensibiliserede mus (250 mikroliter/mus). 5 mus blev belastet ved hvert dosisniveau.

Alle mus reagerede med anafylaktisk shock selv ved dosis på 100 mikrogram ovalbumin pr. dyr, og der kunne ikke iagttages forskel på de homogeniserede og ikke-homogeniserede prøvers evne til at inducere anafylaktisk shock m.h.t. tidsforløbet eller styrken af de anafylaktiske reaktioner.

Ikke-sensibiliserede kontrolmus viste ingen anafylaktiske reaktioner ved intravenøs belastning med homogeniseret eller uhomogeniseret olie-ovalbumin emulsion selv ved doser på 3000 mikrogram/mus (publikation I).

3.2.4. Effekt af oral indgift af ubehandlet og homogeniseret-pasteuriseret bovin mælk i sensibiliserede mus.

De i afsnit 3.2.1. beskrevne forsøg viste, at homogenisering af mælk forøger mælkens evne til at udløse anafylaktiske reaktioner i sensibiliserede mus. Validiteten af disse undersøgelser som modelstudium for human komælksallergi begrænses imidlertid af, at musene blev belastet intravenøst.

Nærværende undersøgelser blev derfor udført for at undersøge om mælkeproteinerne kan passere mere eller mindre ufordøjet ned i musens tarm og her inducere anafylaktiske reaktioner i tarmvæggen (se afsnit 3.4. for en nærmere diskussion).

3.2.4.1. Fordeling af kaseiner og valleproteiner i den murine tarm efter oral indgift af ubehandlet mælk og homogeniseret-pasteuriseret sødmælk

Formål.

Det har været hævdet (Koritz *et al.* 1987a,b), at rotter og mus er mindre egnede end marsvin som model for human komælksallergi, fordi kaseiner kunne detekteres i marsvins tarmlumen, men ikke i rotters tarm, efter oral indgift af ubehandlet mælk. Forfatterne udsatte tarmperfundererne for en kraftig centrifugering inden kaseinindholdet i supernatanten blev målt ved RIA. Hvis kaseinerne bliver præcipiteret i mavesækken ved indvirkning af løbeenzym og lavt pH, er det ikke sikkert, at den anvendte fremgangsmåde vil kunne anvendes til detektion af kasein i tarmlumen.

Nærværende ikke-publicerede undersøgelser skulle belyse, om andre metoder kunne anvendes til at detektere mælkeproteiner i den muri-

ne tarm efter oral indgift af homogeniseret mælk og ubehandlet mælk.

Forsøgets udførelse og resultat.

To BALB/c mus (hunner, 6 uger gamle) blev fastet i 24 timer. Herefter blev dyrene v.h.a. en sonde givet 1,0 ml af henholdsvis ubehandlet mælk og homogeniseret-pasteuriseret sødmælk. Begge mælkeprøver blev modtaget fra Mejeriet Enigheden samme dag, som forsøget blev udført.

Efter 30 min blev musene aflivet ved dislokation af halshvirvlerne, tarmen blev udtaget og segmenter af 5 cm blev perfunderet med 1,0 ml fysiologisk saltvand. Perfundererne blev umiddelbart efter perfundering placeret i et kogende vandbad i 10 min for at standse proteolytisk nedbrydning. De kogte perfunderprøver blev frysetørret og resuspenderet i 100 mikroliter prøvebuffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,6 tilsat 1,0% Sodium Dodecyl Sulfat (SDS) og 20% sukrose) ved kogning i 10 min.

Tarmperfundererne blev analyseret i denaturende polyacrylamid-gelelektroforese (SDS-PAGE, stackgel 7,5%, separationsgel 15%), som beskrevet af Poulsen & Petersen (1985). Prøver af natriumkaseinat og valleprotein-koncentrat blev anvendt som mælkeproteinmarkører (100 mikrogram protein/brønd). Polyacrylamidgelerne blev farvet med Coomassie Brilliant Blue.

Resultatet af undersøgelsen er summeret i Tabel 8.

Oral indgift af den homogeniserede mælkeprøve førte til et større tarmindehold af kaseiner

Tabel 8. Fordeling af kaseiner og valleproteiner i den murine tarm efter oral indgift af ubehandlet mælk og homogeniseret sødmælk.

Mælketype		segment 1	segment 2	segment 3	segment 4
Ubehandlet mælk	K	-	-	-	-
	V	+	(+)	-	-
Homogen. sødmælk	K	+	(+)	-	-
	V	+	(+)	-	-

Segment 1-4 fra ventrikel mod anus.

K = Kasein. V = Valleproteiner.

+ = tydelige proteinbånd. (+) = svage proteinbånd. - = ingen proteinbånd.

end oral indgift af den ubehandlede prøve. Homogenisering viste derimod ingen tydelig effekt på tarmfordelingen af valleproteiner. Undersøgelsen viste, at kaseiner i den murine tarm kan detekteres efter oral indgift, hvis tarminholdet solubiliseres med SDS og derefter analyseres i SDS-PAGE.

3.2.4.2. Tarmreaktioner i sensibiliserede mus efter oral indgift af ubehandlet mælk og homogeniseret-pasteuriseret sødmælk.

Formål

Lokale type-I-hypersensitivitetsreaktioner i tarmvæggen (atrofi af villi, mastcelledegranulering og forøget tæthed af eosinofile granulocytter, lymfocytter og IgE-plasma celler) er blevet beskrevet i forbindelse med human kønmælksallergi (Shiner *et al.* 1975, Eastman & Walker 1979, Pearson *et al.* 1983), og disse reaktioner kan muligvis forøge tarmens permeabilitet, og dermed bidrage til en forøget optagelse af ufordøjet allergen (Bahna and Gandhi 1983). Anafylaktiske tarmreaktioner er ligeledes blevet beskrevet i forsøgsdyrmodeller (Byars & Ferraresi 1976, Roberts *et al.* 1981, Carrick & Alexander 1982, Perdue *et al.* 1984). De her beskrevne præliminære ikke-publicerede undersøgelser blev udført, for at undersøge, om lignende anafylaktiske tarmreaktioner kunne iagttages i den murine tarm efter oral belastning af sensibiliserede mus med mælk, og, hvis dette er tilfældet, om homogenisering af mælk også i denne situation forøger mælkens evne til at udløse anafylaktiske reaktioner.

Forsøgets udførelse og resultat.

Forsøgsrækken blev udført på et tidspunkt, hvor avlen på mælkefrit foder af BALB/c-Bom(KVL) mus var blevet indstillet. I stedet anvendtes udavlede Pan:Thai mus fra Panum Institutet, Københavns Universitet.

Musene blev sensibiliseret ved at æde mælkeproteinholdigt foder *ad libitum* som beskrevet i afsnit 3.1.3.. Efter faste i 24 timer blev både de sensibiliserede mus og ikke-sensibiliserede kontrolmus belastet ved peroral indgift af 1,5 ml ubehandlet mælk eller 1,5 ml homogeniseret-pasteuriseret sødmælk.

30, 40 eller 50 min efter peroral belastning blev 3 mus fra begge belastningsgrupper aflivet ved dislokation af nakkehvirvlerne. Bugvægget blev klippet op og 5 cm af det proximale tarmsegment blev ligeret og udtaget. Tarmsegmentet blev herefter nedsænket i et prøveglas med 5,0 ml fysiologisk saltvand, og vægtforøgelse af prøveglasset blev bestemt. Undersøgelsen viste, at det proximale tarmsegment 40 min efter oral belastning af sensibiliserede mus med homogeniseret mælk havde et signifikant forøget tarmvolumen (0,56 ml +/- 0,07 ml, n = 3) sammenlignet med tarmvolumen af tarmsegmentet fra sensibiliserede mus belastet med ubehandlet mælk (0,32 ml +/- 0,06, n = 3). Forskellen i tarmvolumen var ikke signifikant 30 min eller 50 min efter oral belastning. De ikke-sensibiliserede kontrolmus viste ingen forøgelse af volumen af det proximale tarmsegment ved belastning med homogeniseret-pasteuriseret mælk sammenlignet med ubehandlet mælk.

Cytologiske undersøgelser af tarmens mucosa fra belastede mus viste mastcelledegranulering i mucosa af sensibiliserede mus belastet med homogeniseret mælk, mens mucosa fra sensibiliserede mus belastet med ubehandlet mælk og fra kontrolmus belastet med begge typer mælk ikke viste disse celleforandringer sammenlignet med ikke-belastede mus. De cytologiske undersøgelser blev udført ved anvendelse af konventionelle farvemetoder for mastceller. De her beskrevne undersøgelser er blevet gentaget i en større forsøgsrække, hvor udavlede Ico:MNRI mus (hanner, 5 uger) fra IFFA-CREDO, Frankrig blev anvendt. Denne stamme avles på et mælkeprotein frit foder. I disse undersøgelser blev musene sensibiliseret med enten ubehandlet mælk eller homogeniseret-pasteuriseret mælk dels ved anvendelse af den alternative sensibiliseringsmetode og dels ved oral sensibilisering. De udvidede undersøgelser er beskrevet i publikation VI.

3.3. DISKUSSION AF DEN MURINE ANAFYLAKTISK SHOCK MODEL

3.3.1. Den murine model sammenlignet med marsvinmodel

Det har været hævdet, at rotter og mus er mindre egnede end marsvin som model for human komælksallergi, fordi oral sensibilisering med specielt mælkskaseiner ikke kunne iagttages hos rotter, men derimod i marsvin (Koritz *et al.* 1987a,b). Denne påstand er baseret på, at forfatterne ikke var i stand til at måle tilstedeværelse af kaseinmolekyler i rottens tarm efter oral indgift af mælk. Tarmperfundaterne blev udsat for en kraftig centrifugering, hvorefter kaseinindholdet i supernatanten blev målt ved RIA (Koritz *et al.* 1987a,b). Den af Koritz *et al.* (1987a,b) anvendte mælkepræparation var pasteuriseret hel mælk. Ved en uhomogeniseret mælks passage af mavesækken udfældes kaseinerne både under indvirkning af mavesækkens proteinaser og ved indvirkning af det lave pH (Spur 1948a,b). Det er derfor tænkeligt, at kaseiner i rottens tarmkanal har været associeret i uopløselige komplekser, der ikke kan måles ved den af Koritz *et al.* (1987a,b) anvendte metode. I modsætning hertil beskriver nærværende afhandling (afsnit 3.2.4.1.) undersøgelser; der viste, at kaseinmolekyler fra perfundater af den murine tarm kan detekteres i SDS-PAGE, hvis tarmperfundaternes proteinindhold opløses ved SDS-behandling inden elektroforese. Ved undersøgelsen blev der fundet mere kasein i den murine tarm efter oral indgift af homogeniseret mælk sammenlignet med uhomogeniseret mælk.

Nærværende undersøgelser har vist (afsnit 4.1.3. og afsnit 3.1.5.), at mus såvel som marsvin kan sensibiliseres oralt ved *ad libitum* at indtage foderpiller indeholdende mælkeprotein (publikation I-III). Endvidere er det tidligere blevet beskrevet, at især ganske små mængder allergen givet oralt til rotter (Jarrett *et al.* 1976, Bazin & Platteau 1976, Jarrett 1978) eller mus (Hargis & Malkiel 1970) foranlediger en høj produktion af IgE. Undersøgelser ved Laboratorium for Forsøgsdyrkundskab, KVL, har dokumenteret, at dette også er tilfældet hos mus ved oral sensibilisering med

lave doser mælk (<10 mikrogram/mus) (publikation V-VI).

Rotter, der er sensibiliseret for høj IgE titer mod ovalbumin, viser ved oral belastning med ovalbumin ændringer i tarmens mucosa m.h.t. mastcelledegranulering, eosinofili og nedsat væske- og ionoptagelse (Perdue *et al.* 1984). Ændringerne svarer til de tarmreaktioner, der er karakteristiske ved humane allergireaktioner (Eastman & Walker 1979). De i nærværende afhandling beskrevne undersøgelser (afsnit 3.2.4.2., publikation VI) viste, at oral belastning af sensibiliserede mus med homogeniseret mælk i modsætning til ubehandlet bovin mælk førte til væskeophobning i tarmen, samt mastcelledegranulering i tarmens mucosa. Disse ændringer i mucosa er i overensstemmelse med de ændringer, der blev beskrevet i rotters tarm ved oral belastning med ovalbumin (Perdue *et al.* 1984). Selv om de beskrevne ændringer i musens tarmvæg ligner de tarmreaktioner, der er karakteristiske ved humane allergireaktioner, er det endnu uvist i hvor høj grad musen kan fungere som model for humane gastrointestinale allergireaktioner.

BALB/c mus udviste højere sensitivitet end en tilfældigt valgt marsvinstamme i anafylaktisk shock model ved belastning med homogeniseret mælk (afsnit 3.1.5.). Dosis af homogeniseret mælk, der var nødvendig for at inducere anafylaktisk shock i marsvin i nærværende undersøgelser (45 mg/kg) var noget højere end dosis af mælkeprodukter (30 mg/kg), der blev anvendt i undersøgelser af varmebehandlingsindflydelse på mælks allergenicitet (McLaughlan *et al.* 1981). De citerede undersøgelser på marsvin blev ikke udført som dosis-responsundersøgelser, og sensitiviteten (laveste dosis der kan inducere anafylaktisk shock) fremgår ikke af referencen (McLaughlan *et al.* 1981). Intravenøs injektion af høje koncentrationer af protein (f.eks. ufortyndet mælk) kan vanskeliggøres af prøvernes viskøsitet, og intravenøs injektion af ufortyndet mælk (McLaughlan *et al.* 1981) blev muligvis anvendt, fordi alene ufortyndet mælk var i stand til at inducere anafylaktisk shock i marsvin.

De i nærværende afhandling beskrevne under-

søgelse dokumenterede, at mus både m.h.t. anafylaktisk sensitivitet overfor homogeniseret og ubehandlet mælk (afsnit 3.2.1.), og m.h.t. de allergiske tarmreaktioner (afsnit 3.2.4.1. og 3.2.4.2.) kan udvise væsentlige ligheder med humane type-I-hypersensitivitetsreaktioner overfor komælk.

Der foreligger således ingen entydig grund til at antage, at den i nærværende afhandling beskrevne murine anafylaktisk shock model er mindre egnet end den marsvinmodel, der traditionelt vælges som model for human komælksallergi (Knights 1985).

Da en anafylaktisk shock test væsentligt lettere udføres på mus end på marsvin, tillader anvendelse af mus udførelse af større faktorielle forsøg, hvor dosis-respons-sammenhænge kan undersøges. Dette har især haft betydning ved belysning af homogeniserings indflydelse på komælkproteiners potentielle allergenicitet. Dosis-respons forsøg er ikke blevet udført i undersøgelser med anvendelse af marsvin (McLaughlan et al. 1981, Heppell et al. 1984, Knights 1985). Disse undersøgelser, hvor en relativ høj dosis af allergen er blevet anvendt, har alene været anvendelige til at påvise markante forskelle i allergenpræparationernes evne til at udløse anafylaktiske reaktioner.

3.3.2. Effekt af homogenisering på mælks allergenicitet - den kolloidkemiske model.

Tagttagelsen af, at homogenisering forøgede mælks evne til at udløse anafylaktisk shock i sensibiliserede mus, kan muligvis forklare ud fra en kolloidkemisk indfaldsvinkel (publikation III):

Homogenisering fører til dannelsen af lipid-protein-komplekser, der er karakteriseret ved, at især kaseinmolekyler indlejres i de små fedtlegerers overflade. Herved stiger eksponeringen af alfa- og beta-kaseinmolekylernes antigen-determinanter væsentligt sammenlignet med ubehandlet mælk, hvor størstedelen af kaseinmolekylernes antigen-determinanter ligger skjult i miceller.

Kaseinmicellerne er dækket af kappa-kasein på deres overflade, og det er rimeligt at antage, at micellerne stort set kun eksponerer kappakaseinmolekylernes antigen-determinanter. Ved

den intravenøse belastning af sensibiliserede mus vil homogeniseret mælk således eksponere et større antal forskellige antigen-determinanter end ubehandlet mælk. Homogeniseret mælk vil derfor lettere kunne reagere med antistoffer på mastcellernes overflade og inducere mastcelledegranulering.

Både ud fra resultaterne opnået ved undersøgelser af tarmreaktioner efter oral belastning af sensibiliserede mus med homogeniseret mælk (afsnit 3.2.4.2., publikation VI), og ud fra resultaterne opnået ved studier af ubehandlet og homogeniseret mælk i den murine anafylaktisk shock model (afsnit 3.2.1., publikation I-III og V), samt ud fra den udtalte lighed mellem det murine og humane immunsystem (afsnit 2.3) synes det umiddelbart rimeligt at antage, at homogeniseret mælk også i komælksallergiske patienter vil være mere effektiv til at udløse anafylaktiske reaktioner end ubehandlet mælk. Hvis dette er tilfældet, er det muligt, at opstille en hypotese for virkningen af homogeniseret mælk i forbindelse med human komælksallergi:

Homogeniseret mælks kaseiner vil i højere grad end ubehandlet mælks kaseiner kunne nå ned i tarmen og inducere allergiske reaktioner i den komælksallergiske patients tarmvæg. Reaktionen medfører atrofiering af tarmvilli og en stigende permeabilitet af tarmvæggen (Eastham & Walker 1979, Paganelli et al. 1979, Bahna & Gandhi 1983). Den stigende tarmpermeabilitet vil føre til en stigende optagelse af ufordøjet mælkeprotein, og systemiske allergi-reaktioner vil kunne induceres. Det skal dog bemærkes, at der stadig hersker tvivl om, hvorvidt atopiske tarmreaktioner fører til forøget allergenoptagelse (Husby 1988). Endvidere vil kaseinmolekylerne i homogeniseret mælk, hvis de optages i form af lipid-protein-komplekser, i følge den kolloid-kemiske model, kunne inducere en stærkere systemisk anafylaktisk reaktion end en tilsvarende koncentration af kaseinmolekyler i ubehandlet mælk. Ud fra denne hypotese må det derfor antages, at provokation af atopiske komælksallergiske patienter med homogeniseret mælk vil føre til mere voldsomme kliniske manifestationer end provokation med den samme mængde ubehandlet ko-

mælk. Følgelig må det forventes, at kliniske dosis-respons-undersøgelser kan demonstrere en forskel i homogeniseret mælks og ubehandlet mælks evne til at udløse anafylaktiske reaktioner. Denne hypotese blev senere bekræftet af overlæge A. Høst, der ved undersøgelse af 5 stærkt type-I-hypersensitive børn i en dosis-respons-undersøgelse viste, at homogeniseret mælk udløste de allergiske reaktioner ved lavere doser end uhomogeniseret mælk (Høst og Samuelsson 1988).

Hypotesen støttes også af andre sammenligninger af homogeniseret og ubehandlet mælk. Ved provokationstest af veldokumenterede komælksallergiske børn, der alle reagerede ved provokation med homogeniseret mælk (konventionel komælksbaseret modermælkserstatning), kunne omkring 16% af børnene tåle den ubehandlede mælk (Hansen *et al.* 1987). Resultatet er i overensstemmelse med, at cirka 13% af veldokumenterede komælksallergiske børn kunne tåle ubehandlet gedemælk (Juntunen & Ali-Yrkkö 1983). De to sidstnævnte undersøgelser blev ikke udført som egentlige dosis-respons-undersøgelser, og det er derfor ikke muligt at afgøre om større (eller mindre) forskelle på de to mælketypers evne til at udløse allergiske reaktioner ville kunne erkendes ved anvendelse af andre provokationsdoser. Resultater i de to sidstnævnte referencer er alene et udtryk for, at der for nogle patienters vedkommende var forskel mellem de to mælketypers evne til at udløse allergireaktioner ved de anvendte doser.

De i nærværende afhandling beskrevne undersøgelser viste en rimelig god overensstemmelse mellem resultaterne fra den murine model og de relativt sparsomme kliniske undersøgelser foretaget på veldokumenterede komælksallergiske patienter m.h.t. homogeniseringens effekt på komælks evne til at udløse allergireaktioner. Resultaterne fra den murine model og den heraf afledede kolloidkemiske model har vist sig at kunne forklare visse reaktionsmønstre i komælksallergiske patienter, og den murine anafylaktisk shock model har i denne sammenhæng vist sin anvendelighed. Undersøgelserne af olie-ovalbumin-emulsioner (afsnit 3.2.2., publikation III) viste, at dannelse af olie-pro-

tein-komplekser ikke forøgede ovalbumins evne til at udløse anafylaktiske reaktioner i sensibiliserede mus. Både homogeniserede og uhomogeniserede olie-ovalbumin-emulsioner kunne inducere anafylaktisk shock i mus ved en dosis på 100 mikrogram/dyr, og der blev ikke iagttaget forskelle i forløbet eller styrken af de anafylaktiske reaktioner. Nativt ovalbumin er fuldt vandopløseligt, og dannelse af lipid-protein-komplekser fører ikke, i modsætning til homogenisering af komælk, til eksponering af antigendeterminanter, der i den native form er skjult. Dannelse af olie-proteinkomplekser synes således ikke *per se* at repræsentere en særlig »aggressiv« konfiguration m.h.t. induktion af mastcelledegranulering.

I publikation III har jeg formuleret »den kolloidkemiske model:

The allergenicity of a protein, i.e. the lowest dose of the protein capable of inducing allergic reactions, is dependant both on the allergenic determinants of the protein and on the colloid chemical environment of the protein«.

Den kolloidkemiske model for et proteins allergicitet fremhæver den væsentligste konklusion, der kan drages af undersøgelserne af homogeniseringens betydning. Nemlig at allergitests med isolerede proteiner kan give mangelfulde oplysninger om proteinernes faktiske evne til at udløse allergireaktioner, specielt i situationer, hvor proteinerne naturligt forekommer i kolloide strukturer. Det er således muligt, at proteiner f.eks. på overfladen af pollenkorn, husdyrhår, mel eller husstøvmider vil udvise forskellig allergicitet afhængig af, om allergikeren provokeres med disse proteiner på deres naturlige overflader eller isoleret fra disse f.eks. i priktest.

Det skal understreges, at de kolloidkemiske forholds indflydelse på proteiners potentielle allergicitet alene kan undersøges i *in vivo* modeller. *In vitro* metoder som ELISA, RAST og immunoelektroforetiske teknikker kan kun anvendes ved analyser af isolerede proteinekstrakter, der er fri for større komplekser og partikler (publikation III).

3.3.3. Effekt af homogenisering på mælks allergenicitet - betydning for mejeribrugets fremstilling af mælkeprodukter.

Poulsen & Hau (1987a) har tidligere foreslået nogle mulige mejeribrugsmæssige konsekvenser af den påviste effekt af homogenisering på mælkenes evne til at udløse allergireaktioner i mus. Senere undersøgelser af fordelingen af kaseiner i den murine tarm efter oral indgift af ubehandlet og homogeniseret mælk (afsnit 3.2.4.1.) viste, at kaseinerne fra homogeniseret mælk når tarmen i højere koncentrationer end kaseinerne fra ubehandlet mælk.

Dette kan skyldes, at homogeniseret mælk i den murine ventrikel, som i den humane ventrikel, giver et løsere koagel end ubehandlet mælk (Spur 1948a,b). Det er tænkeligt, at det løse koagel, der dannes af homogeniseret mælk i mavesækken, overføres hurtigere til tarmen. I modsætning hertil, vil det tætte koagel, der dannes af ubehandlet mælk, fremstå som en fast masse, der alene bringes i opløsning ved en gennemgribende hydrolyse og dannelse af opløselige spaltningssprodukter. Oprindeligt var et væsentligt argument for at anvende homogenisering specielt ved fremstilling af modermælks-erstatninger, at homogeniseret mælk i mavesækken giver et løst koagel svarende til koagelet af human mælk (Spur 1948a,b). Alvorlige tilfælde af forstoppelse af mavesækken efter anvendelse af kogt, uhomogeniseret mælk til spædbørn udgjorde således et væsentligt argument for en generel brug af homogenisering.

Undersøgelser beskrevet i nærværende afhandling viste, at oral belastning af sensibiliserede mus med homogeniseret mælk førte til væskeudtrængning i tarmlumen, samt mastcelledegranulering i tarmmucosa, mens ubehandlet mælk ikke førte til disse ændringer i tarmvæggen (afsnit 3.2.4.2., publikation VI). Dette resultat kan være i overensstemmelse med kliniske undersøgelser, der viste, at visse komælksallergiske børn kan tåle ubehandlet mælk, selv om de reagerer på homogeniseret mælk (Hansen *et al.* 1987).

Endvidere er det for nyligt vist, at både subkutan (afsnit 4.2.2., publikation V-VI) og oral sensibilisering (publikation V-VI) af mus med

lave koncentrationer af homogeniseret mælk, i modsætning til ubehandlet mælk, førte til produktion af høje IgE-titre i serum. Disse resultater, der diskuteres mere detaljeret i afsnit 4.3.2., viste, sammenholdt med resultaterne fra afsnit 3.2.1 og afsnit 3.2.4.2., at homogenisering påfører mælk både en forøget evne til at sensibilisere mus og en forøget evne til at udløse systemiske og intestinale anafylaktiske reaktioner i sensibiliserede mus.

Der har endnu ikke været udført kliniske undersøgelser, der belyser i hvor høj grad homogenisering har betydning for komælks evne til at sensibilisere spædbørn med risiko for at udvikle komælksallergi, og det er endnu uvist, i hvor høj grad den murine model simulerer human type-I-hypersensitivitet på dette område. De i afhandlingen beskrevne undersøgelser af betydningen af homogenisering på komælks allergenicitet i mus udgør således ikke et tilstrækkeligt argument for et generelt stop for brug af homogenisering. Komælksallergi er en lidelse, der alene berører en begrænset del af befolkningen, og der findes ingen videnskabelige undersøgelser, der godtgør, at homogenisering af mælk kan udgøre en gene for resten af befolkningen. Endvidere kan flertallet af komælksallergiske patienter hverken tåle ubehandlet eller homogeniseret mælk, når først de er blevet overfølsomme. Undladelse af homogenisering vil således initialt kun være til gavn for meget få komælksallergiske patienter.

Hvis kliniske undersøgelser senere viser overensstemmelse med de her beskrevne undersøgelser på mus m.h.t. homogeniseringens betydning ved udvikling af komælksallergi, kan det imidlertid være hensigtsmæssigt at overveje, at udlade brug af homogeniserede modermælks-erstatninger til spædbørn prædisponeret for at udvikle komælksallergi.

3.4.4. Effekt af varmebehandling på mælks allergenicitet.

Nærværende undersøgelser viste, at varmebehandling ved 100 grader Celsius i 30 min kunne reducere mælkenes allergenicitet (afsnit 3.2.1., publikation I-III), sandsynligvis ved denaturering af antigendeterminanter på vallepoteinerne overflade, og ved dannelse af nonreaktive

komplekser mellem lactoglobulin og kappa-kasein. Dette resultat er i overensstemmelse med resultater opnået på marsvin, hvor stærk varmebehandling kunne reducere mælks allergenicitet (McLaughlan *et al.* 1981) og helt eliminere valleproteinernes allergenicitet (Heppell *et al.* 1984).

4. HOMOLOG MURIN PCA-TEST. MÅLING AF KOMÆLKSPROTEINERS OG PEPTIDERS ALLERGENICITET.

4.1. UDVIKLING OG OPTIMERING AF EN MURIN PCA-TEST.

4.1.1. Formål

Den murine PCA-test blev udviklet i forbindelse med det tidligere omtalte tværfaglige projekt, for at opnå en *in vivo* test, der tillader en relativ hurtig semikvantitativ screening af komælksprotein- og peptidpræparationers allergenicitet. I denne sammenhæng defineres allergiciteten dels ved:

- præparationens evne til at inducere dannelse af høje reagentitre i mus - og dels ved -
- præparationens evne til at inducere mastcelledegranulering, målt ved den laveste koncentration af allergenpræparationen, der kan udløse en positiv reaktion i den murine PCA-test.

4.1.2. Valg af forsøgsdyr

Marsvin (Lui *et al.* 1967, Bing & Stavitsky 1968) og rotter (Takase *et al.* 1979, Kurisaki *et al.* 1982) har traditionelt været de foretrukne dyrearter til PCA-test og PCA-inhibitions-test af peptidens potentielle allergenicitet. Marsvin og rotter er på grund af deres størrelse velegnede til titerbestemmelse af IgE og til udførelse af PCA-inhibitions-test. I begge tilfælde kan mindst 8 prøver analyseres på hvert dyr.

Resultater opnået ved PCA-inhibitions-test er generelt vanskelige at fortolke (jvf. afsnit 2.3.5.), og PCA-inhibitions-test blev af denne grund ikke anvendt.

Måling af peptidens potentielle allergenicitet ved direkte PCA-test, hvor peptidpræparationer injiceres intravenøst, tillader kun analyse af en prøve pr. dyr. I denne situation, hvor al-

lergeniciteten bør undersøges i en dosis-respons-sammenhæng, er forbruget af forsøgsdyr relativt stort. Mus er derfor et attraktivt alternativ til rotter og marsvin af de grunde, der er fremhævet i afsnit 2.3.1. og afsnit 3.1.2. (publikation IV, Poulsen & Hau 1988a,b). Endvidere er PCA-test på mus generelt velbeskrevet både m.h.t. sensibiliseringsmetoder for opnåelse af høj IgE-titer (Vaz *et al.* 1971), og m.h.t. forskellige stammers sensitivitet (Levine & Vaz 1970, Vaz & Ovary 1970, Ovary *et al.* 1975, Braga & Mota 1976). Mastcellerne fra BALB/c mus angives at have høj sensitivitet *in vitro* (Vaz & Ovary 1970), og denne stamme, der var umiddelbart tilgængelig fra Panum Institutet, Københavns Universitet, blev derfor foretrukket.

4.1.3. Udvikling af den murine PCA-test

PCA-test anvendes traditionelt til titerbestemmelse af IgE (Vaz *et al.* 1971, Jarrett & Steward 1974, Ovary *et al.* 1975, Bazin & Platteau 1976, Jarrett *et al.* 1976) og IgG1, der i mus kan sensibilisere mastceller (Levine & Vaz 1970, Vaz *et al.* 1971, Ovary *et al.* 1975, Braga & Mota 1976, Baeron *et al.* 1982). Ved titerbestemmelse af antistoffer injiceres ofte stærkt fortyndede antistofpræparationer i de kutane depoter. Ovary (1964) viste, at følsomheden af PCA-tests (udtrykt ved den laveste dosis af antigen, der kunne inducere positiv PCA-reaktion) steg med stigende koncentration af antigenspecifikt IgE i det kutane depot.

For at kunne anvende PCA-test som en relativ følsom *in vivo* test til bestemmelse af protein- og peptidpræparationens potentielle allergenicitet, var det således ønskeligt at injicere kutane depoter med højt indhold af specifikt IgE. En serie præliminære undersøgelser blev udført for at optimere den murine PCA-test (publikation IV, Poulsen & Hau 1988b). Undersøgelserne blev koncentreret om:

1. Produktion af allergenspecifikke antisera med høj IgE-titer.
2. Udvikling af metode til at opnå et velafgrænset depot af antiserum med høj IgE-titer.

PRODUKTION AF ALLERGENSPECIFIKKE ANTISERA MED HØJ IgE-TITER.

IgE-titeren i antisera fremstillet ved sensibilisering af BALB/cBom mus ved anvendelse af tre forskellige sensibiliseringsmetoder blev sammenlignet. Valleproteinkoncentrat blev anvendt som antigen (publikation IV). De tre sensibiliseringsmetoder var:

i. *Sensibilisering ved klassisk immuniseringsmetode for produktion af præcipiterende antistoffer.*

Primær injektion: 20 BALB/cBom hunmus (KVL, 5 uger) blev injiceret subkutan i nakken med 100 mikrogram valleprotein i 100 mikroliter Freund's Complete Adjuvant (FCA).

Boosterinjektioner: Efter 14 dage blev hver mus injiceret subkutan i nakken med 100 mikrogram valleprotein i 100 mikroliter Freund's Incomplete Adjuvant (FIA). Dette blev gentaget efter yderligere 14 dage.

Fire dage efter den sidste boosterinjektion blev musene afblødt, og en pool af sera blev fremstillet og opbevaret ved -20 grader Celsius.

ii. *Alternativ sensibiliseringsmetode for høj IgE-produktion.*

Det er velbeskrevet, at sensibilisering med lave doser af antigen får dette til at virke som allergen, og fører til produktion af et vedvarende højt niveau af IgE i serum hos rotter (Jarrett & Steward 1974, Jarrett *et al.* 1976, Jarrett 1978) og mus (Vaz *et al.* 1971, Braga & Mota 1976, Nielsen *et al.* 1989). Jarrett *et al.* (1976) anvendte intraperitoneal injektion af varme-dræbte pertussisbakterier samtidig med primærinjektionen af antigen (1.0 mikrogram ovalbumin intradermalt pr. rotte). Den intraperitoneale injektion af pertussisbakterier blev angivet at have en generel stimulerende effekt på IgE-produktionen. FCA indeholder varme-

dræbte tuberkelbakterier, der ligeledes giver en generel stimulering af immunsystemet, og den alternative sensibiliseringsmetode var således en modifikation af den af Jarrett *et al.* (1976) beskrevne. 20 BALB/cBom hunmus (KVL, 6 uger) blev sensibiliseret:

Primærinjektion: 1 mikrogram valleprotein subkutan i nakkeregionen og på samme dag intraperitoneal injektion af 100 mikroliter FCA.

Boosterinjektioner: 0.1 mikrogram valleprotein subkutan i nakken hver 10. dag. Hver mus modtog i alt 2 boosterinjektioner.

Fire dage efter den sidste boosterinjektion blev musene afblødt og en pool af sera fremstillet.

iii. *Oral sensibilisering.*

Undersøgelser af mælks allergenicitet ved systemisk anafylaktisk shock test på marsvin er traditionelt blevet udført ved, at marsvinene sensibiliseres ved at drikke mælk *ad libitum* i 2 uger (McLaughlan *et al.* 1981, Heppell *et al.* 1984). I nærværende undersøgelse blev 15 BALB/cBom mus sensibiliseret ved *ad libitum* at æde foderpiller indeholdende 15% skummetmælkspulver (publikation I og IV).

Titerbestemmelse af specifikt IgE blev udført ved homolog PCA-test (Ovary 1964, Brocklehurst 1973, Poulsen & Hau 1988a,b, publikation IV). Et felt på 3 x 4 cm blev barberet på ryggen af musene. På hver mus blev to intradermale depoter anbragt: Et antistofholdigt depot og et depot indeholdende 0,9% NaCl (kontrol). Efter en latensperiode på 3 timer blev musene belastet med intravenøs injektion af 100 mikrogram valleprotein i 250 mikroliter 1,0% Evans Blue (Sigma) i 0,9% NaCl. Dyrernes ryg blev undersøgt efter 15 min og 30 min (publikation IV).

Titer af reagine antistoffer i serum-pools frem-

Tabel 9. IgE-titer i murine sera fremstillet ved tre forskellige sensibiliseringsmetoder.

Sensibiliseringsmetode	PCA-titer	PCA-titer efter varmebehandling af sera (56 grader C; 60 min)
Klassisk	1:8	0
Alternativ	1:128	0
Oral	1:2	0

stillet ved de tre forskellige sensibiliseringsprocedurer fremgår af Tabel 9.

Varmebehandling af sera ved 56 grader Celsius i 60 min eliminerede antistoffernes evne til passivt at sensibilisere mus (publikation IV), hvilket indikerede, at de reagine antistoffer var varmelabile IgE-molekyler (*Vaz & Ovary 1970, Ovary et al. 1975, Braga & Mota 1976*).

Den alternative sensibiliseringsmetode gav den højeste titer af IgE, og denne sensibiliseringsmetode blev anvendt rutinemæssigt til fremstilling af sera til test af peptidpræparaters allergenicitet (se afsnit 4.2.3.). Den klassiske sensibiliseringsmetode resulterede i en lav titer af varmelabile PCA-reaktive antistoffer, hvilket er i overensstemmelse med IgE-produktionen i visse rottestammer sensibiliseret med høje doser af allergen (*Jarrett 1978*). I modsætning hertil fandt *Vaz et al. (1970)*, at sensibilisering af mus med høje doser ovalbumin i aluminiumhydroxid førte til produktion af sera med høj IgG1-titer og lav IgE-titer. Denne forskel kan hidrøre både fra forskelle i de anvendte musestammer og fra forskelle i det anvendte adjuvans.

Aluminiumhydroxid er blevet fremhævet som et adjuvans, der kan være særligt velegnet til at stimulere IgE-produktionen (*Osebold 1982*). I en præliminær undersøgelse blev BALB/cBom mus (KVL) sensibiliseret med valleprotein ved anvendelse af den alternative metode og ved brug af henholdsvis FCA og aluminiumhydroxid som adjuvans (ikke-publicerede resultater). Undersøgelsen viste ingen signifikant forskel i produktionen af reagine antistoffer målt ved murin PCA-test. I en senere undersøgelse, hvor både lave og høje doser ovalbumin blev anvendt ved sensibilisering af mus, blev svagt højere reagin-titre opnået med FCA sammenlignet med aluminiumhydroxid (Alhydrogel) (*Nielsen et al. 1989*). Sidstnævnte resultater var i al væsentlighed i overensstemmelse med undersøgelserne på rotter, hvor dosis af antigen, men ikke typen af adjuvans, viste sig at være af betydning for den resulterende IgE-produktion (*Jarrett 1978*).

UDVIKLING AF METODE TIL FREMSTILLING AF VELAFGRÆNSET DEPOT AF UFORTYNDT ANTISERUM MED HØJ IgE-TITER.

IgE-titer i murine sera kan skelnes fra IgG1-titer i homolog PCA-test ved at anvende lange latensperioder (48 timer eller derover), fordi IgE i modsætning til IgG1 fører til en persistent sensibilisering af mastcellerne (*Ovary et al. 1975*).

Ved anvendelse af ufortyndet antiserum med høj IgE-titer og latensperioder på 24 timer eller mere blev antistofferne imidlertid spredt ud over et stort område af recipientmusenes ryg, og den positive PCA-reaktion fremstod i disse tilfælde som en diffus blåfarvning af hele dyrets ryg (publikation IV). Det var altså nødvendigt at finde en metode, der kunne give en lokaliseret reaktion selv ved anvendelse af høje antistofkoncentrationer i depotet. Et veldefineret depot og dermed en lokaliseret, afgrænset PCA-reaktion kunne opnås ved at blande ufortyndet antiserum med FIA (1:1) og anbringe depotet intrakutant (publikation IV). En del af depotet fandtes i dette tilfælde subkutant, men antistofferne kunne diffundere op i huden og give en lokaliseret sensibilisering af mastcellerne. Ved denne modifikation blev latensperioder på 1 time, 2 timer, 3 timer, 6 timer og 24 timer sammenlignet. En latensperiode på 3 timer blev fundet optimal m.h.t. reaktionszonens størrelse og farveintensitet (publikation IV).

Sensitiviteten af den optimerede murine PCA-test blev undersøgt m.h.t. den laveste koncentration af valleprotein, der kunne udløse en positiv PCA-reaktion i mus passivt sensibiliseret med enten murint antistof mod valleprotein (den alternative sensibiliseringsmetode for høj IgE-titer) eller kanin antistof mod valleprotein (klassisk immuniseringsmetode for høj IgG-titer).

Undersøgelsen indeholdt endvidere en sammenligning af sensitiviteten på indavlede BALB/cBom mus avlet i flere generationer på henholdsvis mælkeproteinfrifrit foder (Tabel 10,

Tabel 10. Sensitivitet af PCA-test ved brug af antistof fra kanin eller mus.

Antistof præparation	Type af mus		
	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C
Kanin	2.0 mikrogram	10 mikrogram	40 mikrogram
Mus	0.1 mikrogram	2.0 mikrogram	10 mikrogram

Værdierne angiver den laveste koncentration af valleprotein, der ved intravenøs injektion kunne udløse positiv PCA-reaktion. Nærmere beskrivelse af grupperne fremgår af nedenstående tekst.

gruppe A) og mælkeproteinholdigt foder (Tabel 10, gruppe B), samt udavlede BALB/c mus avlet på mælkeproteinholdigt foder (Tabel 10, gruppe C). De anvendte metoder er detaljeret beskrevet i publikation IV.

På baggrund af de præliminære undersøgelser blev en optimeret murin PCA-test formuleret til brug ved de senere rutinemæssige undersøgelser af peptidpræparationers allergenicitet:

1. Fremstilling af murine sera med høj IgE-titer ved anvendelse af den alternative sensibiliseringsmetode.
2. Murint antistof med høj IgE-titer blev fortyndet 1:4 eller 1:8 og blandet (1:1) med FIA inden intrakutan deponering.
3. Anvendelse af indavlede BALB/cBom (KVL) mus avlet på mælkeproteinfrit foder i mere end 5 generationer ved Laboratorium for Forsøgsdyrskundskab.

Der blev ikke i den rutinemæssige anvendelse af PCA-testen skelnet mellem IgG1- og IgE-re-

spons, men derimod anvendt betegnelsen PCA-reaktive antistoffer som fællesbetegnelse for alle antistoffer, der kan sensibilisere murine mastceller.

4.2. APPLIKATION AF MURIN PCA-TEST TIL BESTEMMELSE AF KOMÆLKSPROTEINERS OG -PEPTIDERS ALLERGENICITET.

4.2.1. Allergenicitet af komælk.

Den murine PCA-test blev anvendt til at bestemme titer af komælksspecifikt PCA-reaktivt antistof i murine sera fremstillet ved anvendelse af forskellige sensibiliseringsmetoder (afsnit 3.2.1 og publikation I-III).

Tabel 11 viser, at sensibilisering med små doser ubehandlet mælk og homogeniseret-pasteuriseret mælk i kombination med adjuvans gav en væsentlig højere titer af PCA-reaktive antistoffer end oral sensibilisering med høje doser af skummetmælkspulver. De fremstillede sera

Tabel 11. Titer af sera fremstillet ved forskellige sensibiliseringsmetoder målt ved homolog PCA-test.

Mælketype brugt ved intravenøs belastning	Serum anvendt i PCA-test			
	Gruppe A1 titer	Gruppe A2 titer	Gruppe A3 titer	Gruppe B titer
Rå, ubehandlet mælk	0	128	128	2
1.5-175-LP	0	128	128	2

1.5-175-LP = Lavpasteuriseret, homogeniseret letmælk.

Sensibiliseringsmetoderne er detaljeret beskrevet i publikation I. Gruppe A1 - A3 blev sensibiliseret ved anvendelse af den alternative metode (afsnit 3.1.3. og afsnit 4.1.3.). A1 var kontrolgruppen placebosensibiliseret med 0,9% NaCl, A2 blev sensibiliseret med ubehandlet mælk og A3 med homogeniseret-pasteuriseret mælk. Gruppe B blev sensibiliseret via den orale rute (afsnit 3.1.3.).

viste ingen forskel i specificitet afhængig af typen af mælk, der blev anvendt i sensibiliseringen. Homogenisering af mælk førte således ikke til opståen af nye determinanter, der ikke er til stede på mælkeproteinerne i ubehandlet mælk.

4.2.2. Sammenligning af ubehandlet mælks og homogeniseret-pasteuriseret mælks evne til at sensibilisere mus.

De i afsnit 3.2.1. beskrevne forsøg var den første demonstration af, at homogenisering forøger bovin mælks evne til at udløse anafylaktiske reaktioner i sensibiliserede mus.

Kun meget få kliniske undersøgelser af homogeniseringens betydning ved human komælksallergi er blevet udført (*Hansen et al. 1987, Høst & Samuelsson 1987*), og undersøgelser af homogeniseringens eventuelle effekt ved sensibilisering er ikke tidligere blevet beskrevet. *Jarrett (1978)* har vist, at en persistent høj IgE-titer i rotter opnås, når lave doser af allergen (ovalbumin) anvendes i kombination med et vilkårlig valgt adjuvans.

Homogenisering af mælk fører til dannelse af stabile lipid-protein-komplekser, med betydelig lighed med komplekserne i et olie-i-vand-adjuvans, der vides at give 10-fold højere titre af præcipiterende antistoffer i mus end de traditionelle vand-i-olie-adjuvanter (*Herbert 1965*). På denne baggrund, var det teoretisk muligt, at de ved homogenisering etablerede lipid-protein-komplekser har en forøget evne til at sensibilisere modtagelige individer. Denne mulighed blev studeret i en række undersøgelser beskrevet i detaljer i publikation V.

Effekten af ubehandlet mælk og homogenise-

ret-pasteuriseret sødmælk på sensibilisering af mus blev undersøgt uden anvendelse af adjuvans, for herved at undersøge om homogenisering i sig selv kunne påvirke mælks evne til at inducere reaginproduktion.

Forsøgenes udførelse og resultat

Fire grupper af udavlede Bom:NMRI mus (hunner, 8-10 uger) blev sensibiliseret ved subkutane injektioner af ubehandlet mælk eller homogeniseret-pasteuriseret sødmælk, anvendt som beskrevet i Tabel 12.

Boosterinjektionerne blev givet 10 dage efter primærinjektionerne. 4 dage efter boosterinjektionen blev musene afblødt, og en pool af sera fra hver gruppe fremstillet. De opnåede pools af sera blev testet for titer af reagine antistoffer ved anvendelse af den murine PCA-test, som beskrevet i afsnit 4.1.3.

Sensibilisering med høje doser af ubehandlet bovine mælk førte ikke til dannelse af målelige titre af PCA-reaktive antistoffer. Mus sensibiliseret med lave doser af ubehandlet mælk gav en lav titer (1:4), mens mus sensibiliseret med homogeniseret mælk producerede højere titre af PCA-reaktive antistoffer, henholdsvis 1:16 ved højdosis sensibilisering og 1:64 ved lavdosis sensibilisering (publikation V).

Disse undersøgelser demonstrerede, at sensibilisering af mus med homogeniseret mælk uden tilstedeværelse af adjuvans førte til dannelse af relativt høje serumniveauer af murine PCA-reaktive antistoffer. Denne egenskab ved homogeniseret mælk forstærkedes, hvis sensibiliseringen blev udført med lave doser af antigen. Derimod viste ubehandlet mælk en ringe eller manglende evne til at inducere dannelse af

Tabel 12. Lav- og højdosis sensibilisering af mus med rå, ubehandlet komælk og homogeniseret-pasteuriseret sødmælk.

Type af mælk	Dosis af komælksprotein (mikrogram/mus)	
	Primær injektion	Booster injektion
Rå, ubehandlet mælk		
Lav dosis sens.	10	1
Høj dosis sens.	100	100
Homogen.-pasteur. mælk		
Lav dosis sens.	10	1
Høj dosis sens.	100	100

PCA-reaktive antistoffer i mus, hvis sensibiliseringen blev udført uden adjuvans.

Resultaterne kan være i overensstemmelse med de af Jarrett (1978) beskrevne, hvis det antages, at homogenisering af mælk i sig selv påfører mælken adjuvansegenskaber.

4.2.3. Allergenicitet af valleproteiner, valleproteinhydrolysater og peptider heraf.

Publikation IV beskriver en detaljeret undersøgelse af allergeniciteten af peptider som funktion af deres størrelse (se endvidere Poulsen & Hau 1988a,b).

Peptiderne blev fremstillet ved enzymatisk hydrolyse af valleproteiner efterfulgt af søjlechromatografisk adskillelse af peptiderne i fem grupper med faldende molekylvægt (Tabel 13).

Tabel 13. Præparationer anvendt ved analyse af effekten af enzymatisk hydrolyse på allergeniciteten af bovine valleproteiner (publikation IV).

Nomenklatur	Præparation
CWP	Koncentreret valleprotein
CWP-hydrolysat	Intensiv hydrolyse af CWP - Hydrolysegrad 17,5%
Peptidpool I-V	Mild hydrolyse af CWP og separation af peptider ved gelfiltrering

Peptidpool I-V blev fremstillet ved gelfiltrering af hydrolyseret CWP (»Concentrated Whey Protein«) på Biogel P-30 og Biogel P-6 søjler (publikation IV). Pool I indeholdt uhydrolyse-

ret valleprotein, mens pool II-V indeholdt peptider med faldende molekylvægt (Tabel 14).

Tabel 14. Molekylvægtsfordeling af peptider i pool I-V.

Pool	Molekylvægt
I	> 14000
II	14000 - 11000
III	11000 - 6500
IV	6500 - 3400
V	< 3400

Allergeniciteten af de forskellige præparationer blev undersøgt i en dosis-respons analyse ved anvendelse af murin PCA-test.

Resultatet af undersøgelsen er summeret i Tabel 15 (publikation IV, Poulsen & Hau 1988a,b).

De mest lavmolekylære peptider (MW mindre end cirka 3400 Da) kunne ikke inducere positiv PCA-reaktion i den murine PCA-test ved anvendelse af murine antistoffer mod valleproteiner. Peptiderne i molekylvægtsområdet 6500-3400 Da viste svag evne til at inducere PCA-reaktion ved en dosis på 100 mikrogram/mus, hvilket svarer til en reduktion af allergeniciteten på cirka 1000 gange sammenlignet med native valleproteiner (publikation IV). Peptiderne i pool I-III viste ingen reduktion i allergeniciteten ved de anvendte dosisniveauer.

CWP-hydrolysatet viste en lav allergenicitet ved 100 mikrogram/mus. I modsætning til

Tabel 15. Allergenicitet af hydrolyserede valleproteiner og peptider separeret ved gelfiltrering.

Intradermal injektion	Intravenøs injektion Antigen	PCA-reaktion dosis (mikrogram/dyr)		
		25	100	400
Ab	CWP	+++	+++	+++
Ab	CWP-hydrolysat	ingen	+	+
Ab	Pool I	+++	+++	+++
Ab	Pool II	+++	+++	+++
Ab	Pool III	+++	+++	+++
Ab	Pool IV	ingen	+	+++
Ab	Pool V	ingen	ingen	ingen
Ab	Saline	ingen	ingen	ingen
Saline	CWP	ingen	ingen	ingen

Ab = antistoffer. +++ = stærk PCA-reaktion (10 mm).

+ = svag PCA-reaktion (<3 mm) visualiseret på undersiden af huden.

peptid pool IV viste CWP-hydrolysatet ikke en normal dosis-respons sammenhæng ved forøgelse af dosis af antigen. Forklaringen herpå kan være, at hydrolysatet har et højt indhold af peptider med blot en antigendeterminant. Disse peptider, der ikke i sig selv kan inducere mastcelledegranulering, kan tænkes at binde til IgE på mastcellernes overflade, og herved inhibere mastcelledegranulering ved at forhindre bindingen af større peptider eller valleproteiner (Poulsen & Hau 1988b) - se endvidere afsnit 4.3.3. Peptidpool IV havde ikke et indhold af mindre peptider med potentielt PCA-inhiberende egenskaber, og muligvis derfor viste peptidpool IV den normale dosis-respons sammenhæng. Undersøgelsen tydede på, at dosis-respons analyser af allergeniciteten både kunne anvendes til at opnå et semikvantitativt mål for styrken af allergeniciteten, og samtidig give informationer om tilstedeværelse af PCA-inhiberende komponenter i den testede prøve (Poulsen & Hau 1988b).

4.2.4. Allergenicitet af hypoallergene modermælkserstatninger.

4.2.4.1. Allergenicitet af hypoallergene valleproteinprodukter fremstillet i forbindelse med projektet.

Den murine PCA-test blev anvendt rutinemæssigt til kvalitetskontrol af fremstillede peptidpræparater inden deres afprøvning på klinisk veldokumenterede komælksallergiske børn. Forskellige peptidpræparater blev fremstillet i forbindelse med projektet »udvikling af et hypoallergent levnedsmiddel« ud fra enzymatisk hydrolyse af skummetmælksprotein, natriumkaseinat eller valleproteinkoncentrater. Peptidpræparaterne blev allergenicitetstestet ved PCA, ELISA og provokationstest på klinisk veldokumenteret komælksallergiske børn. Peptider mindre end cirka 6000 Da, isoleret ved ultrafiltrering gennem 6000 Da cut off membraner, blev fundet at være hypoallergene, d.v.s. ude af stand til at inducere positiv PCA-reaktion i mus og tilsvarende ude af stand til at udløse allergireaktioner ved provokationstest af komælksallergiske børn. ELISA blev anvendt til at vise, at disse præparater havde en antistofbinding, der var 10.000 -

100.000 gange lavere end antistofbindingen af uhydrolyseret valleprotein. Dette arbejde, der væsentligst bestod i udvælgelse af egnede enzymsystemer til hydrolyse af mælkeproteiner, samt i optimering af procesparametre med henblik på at opnå et højt udbytte af hypoallergene peptider uden bittersmag, er mere udførligt beskrevet i dansk patentansøgning nr. 5897/85 (Samuelsson & Poulsen).

De proces teknologiske undersøgelser resulterede i udvikling af en metode til fremstilling af hypoallergene peptider i semiindustriel skala. Peptiderne blev, blandet i Nutramigen, anvendt i en 5-ugers pilotafprøvning på 10 klinisk veldokumenteret komælksallergiske børn. Den kliniske undersøgelse blev forestået af overlæge Arne Høst, Sønderborg Sygehus, mens han var ansat som 1. reservelæge ved Odense Universitetshospital. Flere af disse børn i alderen 1 - 2 år var type-I-hypersensitive, og udviste meget voldsomme allergireaktioner selv ved provokation med små mængder komælk. Før afprøvningen viste flere af disse børn ofte milde kroniske reaktioner, diarre og allergisk eksem, selv om deres ernæring bestod af en mælkeproteinfri diæt, væsentligst den hypoallergene modermælkserstatning Nutramigen (Bristol Myers). Disse symptomer blev sædvanligvis tilskrevet diætbrud, der i praksis er meget vanskeligt at undgå, idet komælksproteiner anvendes som additiv i en lang række forskellige nærings- og nydelsesmidler. Det kan dog ikke udelukkes, at disse børn reagerede direkte mod komponenter i Nutramigen (se afsnit 4.2.4.2. og 4.2.4.3.).

Afprøvningen viste, at børnene ikke blot tolererede de fremstillede vallepeptider, men også at børnene med hensyn til de kroniske symptomer udviste en betydelig bedring i tilstanden, hvor især den allergiske eksem forsvandt eller bedredes betydeligt. Efter afprøvningsperiodens ophør genopstod de kroniske symptomer indenfor få uger. Resultatet tydede på, at de fremstillede peptider havde en terapeutisk effekt, der muligvis hidrørte fra tilstedeværelsen af peptider, der kunne blokere patienternes komælks-specifikke IgE-antistoffer, og herved forhindre induktion af mastcelledegranulering ved belastning med små mængder af komælks-

protein f.eks. i forbindelse med diætbrud. Denne observation og den førnævnte manglende dosis-respons sammenhæng ved PCA-test af CWP-hydrolysatet (afsnit 4.2.3.) indikerede, at det er muligt at fremstille peptider, der ved deres inhiberende egenskaber har potentielle terapeutiske egenskaber. En lignende observation blev beskrevet af Stefanovic et al. (1974), der viste, at hydrolyseret human serum albumin (HSA) kunne inhibere anafylaktiske reaktioner mod HSA i passivt sensibiliserede marsvin, mens HSA-hydrolysatet ikke selv kunne inducere anafylaktiske reaktioner.

Peptidpræparatet, der blev anvendt i den kliniske pilotafprøvning, blev forinden testet for dets evne til at inducere produktion af PCA-reaktive antistoffer i mus, da mild enzymatisk hydrolyse af komælksproteiner (f.eks. betalactoglobulin) kan føre til dannelse af nye antigen-determinanter, der ikke findes på de native proteiner (Spies 1973, Haddad et al. 1979).

To grupper af BALB/cBom hammus (KVL, 6 uger) blev sensibiliseret ved anvendelse af den alternative sensibiliseringsmetode (afsnit 3.1.3. og afsnit 4.1.3.). To dosisniveauer blev anvendt for at forøge muligheden for antistof-dannelse mod den ukendte mængde af potentielt allergene peptider (Tabel 16).

Ingen af de to grupper mus viste produktion af specifikke PCA-reaktive antistoffer ved den efterfølgende PCA-test, hvor både peptidpræparationen (500 mikrogram/mus) og valleproteinkoncentrat (100 mikrogram/mus) blev anvendt som allergen.

4.2.4.2. Højmolekylære allergene komponenter i Nutramigen.

De to kommercielt tilgængelige hypoallergene modermælkserstatninger Nutramigen og Pregestimil (Bristol Myers) anbefales af allergologer som en specialdiæt til komælksallergiske

spædbørn (Østerballe 1983). Komælksallergiske børn trives ofte på Nutramigen, men enkelte af disse børn udviste allergisymptomer ved provokation med Pregestimil (Seban et al. 1977). Tidligere undersøgelser på forsøgsdyr har vist, at Pregestimil indeholdt højmolekylære allergene komponenter, der kunne inducere produktion af specifikke præcipiterende antistoffer i kaniner og marsvin (Seban et al. 1977). Selv om Nutramigen ligeledes blev påvist at have et indhold af højmolekylære komponenter, lykkedes det ikke, at inducere produktion af antistoffer med specificitet mod komælksproteiner ved immunisering med Nutramigen (Seban et al. 1977).

Komælksallergiske spædbørn, der fik Nutramigen som det eneste næringsmiddel, viste imidlertid ofte kronisk diarre, der muligvis kunne skyldes svage allergireaktioner lokalt i tarmmucosa (Seban et al. 1977).

Nærværende undersøgelse blev gennemført for at undersøge, om de højmolekylære komponenter i Nutramigen kunne inducere dannelse af murine PCA-reaktive antistoffer ved anvendelse af den alternative immuniseringsmetode (Poulsen & Hau 1987b).

Isolering af højmolekylære komponenter fra Nutramigen.

15 gram Nutramigen blev opløst i 100 ml deioniseret vand ved omrøring i 2 timer ved stuetemperatur. Herefter blev prøven centrifugeret (4500 rpm i 30 min ved 20 grader Celsius, radius 14 cm) for at fjerne lipid og sedimentere uopløseligt materiale, bl.a. kolloidalt fosfat. Prøver af 10 ml af supernatanten blev gelfiltreret på Biogel P-6, som beskrevet i publikation V, med 0,1 M ammoniumhydrogencarbonat som elueringsbuffer. Fraktioner af 5,0 ml blev opsamlet. Fraktioner med indhold af ekskluderede komponenter (molekylvægt større end

Tabel 16. Sensibilisering af mus med hypoallergen vallepeptidpræparation.

Gruppe (10 mus)	Primær injektion (FCA)	1. Booster injektion (FIA)	2. Booster injektion (FIA)
1	20 mikrogram	2 mikrogram	2 mikrogram
2	200 mikrogram	20 mikrogram	20 mikrogram

6000 Da) blev blandet og frysetørret. Den frysetørrede høj molekylære fraktion blev resuspenderet i 0,9% NaCl til et proteinindhold på cirka 1,0 mg/ml (målt ved absorbans ved 280 nm med Bovin Serum Albumin som standard).

Sensibilisering med den høj molekylære fraktion.

10 BALB/cBom hanmus (KVL, 5 uger) blev sensibiliseret ved anvendelse af en modifikation af den alternative sensibiliseringsmetode (afsnit 3.1.3. og afsnit 4.1.3.):

Primær injektion: 40 mikrogram høj molekylær fraktion/mus i FCA.

Booster injektion: 5 mikrogram høj molekylær fraktion/mus i FIA. To boosterinjektioner blev givet med 10 dages mellemrum. 4 dage efter sidste boosterinjektion blev musene aflødt og en serumpool fremstillet.

Resultat

PCA-test blev udført som beskrevet i afsnit 4.1.3. og publikation IV med anvendelse af 100 mikrogram høj molekylær fraktion/mus som antigen. Den fremstillede serumpool viste et højt indhold af PCA-reaktivt antistof med specificitet mod den høj molekylære fraktion af Nutramigen (reagintiter 1:64 - 1:128). Undersøgelsen viste således, at den undersøgte batch Nutramigen havde et indhold af høj molekylære komponenter, der var i stand til både at inducere murin IgE-produktion, og efterfølgende at inducere mastcelledegranulering i den murine PCA-test (Poulsen & Hau 1987b).

4.2.4.3. Murint IgE og IgG og humant IgG mod høj molekylære komponenter ekstraheret fra Nutramigen og Alfare.

Formål.

Det blev ved anvendelse af den murine PCA-test demonstreret, at Nutramigen har et indhold af allergene komponenter med molekylvægt større end 6000 Da (afsnit 4.2.4.2., Poulsen & Hau 1987b).

Nærværende arbejde, der ikke tidligere har været publiceret, blev udført for at undersøge, om Nutramigen på tilsvarende måde kan inducere dannelse af specifikke antistoffer i børn.

Alfare (Nestle) blev inddraget i undersøgelserne efter aftale med overlæge Arne Høst, der ønskede en test af dette nye produkts allergenicitet.

Isolering af høj molekylære komponenter fra Nutramigen og Alfare

Isolering af høj molekylære komponenter fra Nutramigen og Alfare blev udført som beskrevet i afsnit 4.2.4.2.

Fraktioner, der indeholdt peptider elueret i void volume (større end 6000 Dalton) blev blandet. Disse pools af høj molekylære peptidfraktioner fra henholdsvis Nutramigen og Alfare blev fordelt i portioner af 2.0 ml og opbevaret ved -20 grader Celsius.

Sensibilisering af mus.

BALB/cBom mus (KVL) blev sensibiliseret med en af de to høj molekylære peptidfraktioner som beskrevet i afsnit 4.2.4.2. Primærinjektion indeholdt 25 mikrogram peptid/mus og boosterinjektionerne 5 mikrogram peptid/mus.

Humane sera.

Humane sera fra komælksallergiske børn og raske børn blev indsamlet på Odense Sygehus af læge Arne Høst. Karakteristik af patientmateriale og sera fremgår af Tabel 17.

ELISA-test af antistofspecificitet.

Mikrotiterbakker (Nunc) blev koblet over nat (18 timer) ved 5 grader Celsius med henholdsvis den høj molekylære peptidfraktion fra Nutramigen og Alfare fortyndet 1:2 i buffer A (fosfatbuffer pH 7,2).

Mikrotiterbakkerne blev herefter vasket fire gange med buffer B (buffer A + 0,1% Tween 20), og 100 mikroliter murint serum eller humant serum blev appliceret i prøvebrøndene. Alle sera blev undersøgt i fortyndingsserie 1:100, 1:200 og 1:500. Efter inkubation i 2 timer ved stuetemperatur blev mikrotiterbakkerne vasket 10 gange i buffer B.

Til prøvebrønde med murine sera blev tilsat 100 mikroliter peroxidasekonjugeret kanin-anti-murint-IgG (1:100 i buffer B). Til prøvebrønde med humane sera blev tilsat kanin-anti-

Tabel 17. Sera fra komælksallergiske og raske børn. IgG mod højmolekylære komponenter i Nutramigen.

Serum nr.	køn	Symptomer	Nutramigen i kost	IgG mod Nutramigen
111185	hun	-	-	-
120186	han	i	-	-
110785	han	a	+	-
131285	han	a	+	-
070186	hun	a	?	-
071185	hun	i	-	-
050785	han	i	+	-
030986	han	-	-	-
020586	han	-	-	-
010186-1	hun	a	+	-
010186-2	hun	a	+	-
281085a	han	i	+	+
281085b	han	i	+	-
151185	han	i	+	-
031085	han	a	-	-
080385-1	han	a	+	+
080385-2	han	a	+	+
221085	hun	-	-	-
090186	hun	i	-	-
250686	han	-	-	-
091085-1	hun	a	+	+
091085-2	hun	a	+	+
041185	hun	a	-	-
300786	hun	a	+	-
301086	hun	a	-	-

Symptomer: i = forsinket allergireaktioner.
a = Type-I-hypersensitivitet.

humant IgE eller kanin-anti-humant IgG. Efter inkubation i 2 timer blev mikrotiterbakkerne vasket 10 gange med buffer B. Herefter blev peroxidasekonjugeret svin-anti-kanin-Ig (1:100 i buffer B) tilsat til prøvebrønde med humane antisera og kontrolbrønde. Efter 2 timers inkubation blev mikrotiterbakkerne vasket 12 gange og 100 mikroliter farvereagens tilsat til hver brønd (Farvereagens: 12 ml 0,1 M citronsyre/fosfatbuffer pH 5,0 + 12 mg 1.2.phenylenediamine dihydrochloride (Dakopatts) + 5 mikroliter 30% hydrogenperoxid). Mikrotiterbakkerne blev inkuberet 15 min ved stuetemperatur og enzymreaktionen stoppet ved tilsætning af 150 mikroliter 1,0 M svovlsyre. Farvereaktionen blev aflæst på en EAR400 ELISA reader ved 492 nm.

Prøver, der viste et udslag, der var mindst 100% større end gennemsnitsværdien af 11

kontrolprøver, blev opfattet som signifikant positive.

Resultater.

PCA-titer af murine sera:

Titer af PCA-reaktive antistoffer i sera fra mus sensibiliseret med den højmolekylære fraktion af henholdsvis Nutramigen og Alfare blev bestemt ved homolog PCA-test.

Mus sensibiliseret med Nutramigen: titer 1:64

Mus sensibiliseret med Alfare: titer 1:32

Påvisning af Nutramigen- og Alfarespecifikke antistoffer i murine og humane sera ved ELISA:

Det anvendte ELISA-system kunne ikke detektere tilstedeværelse af IgE med specificitet mod peptider i Alfare eller Nutramigen i patientsera. Undersøgelserne viste derimod tilste-

deværelse af IgG med specificitet for peptider i Nutramigen, men ikke Alfare, i sera fra nogle af patienterne (Tabel 17). Fælles for de sera, der gav positive udslag var, at patienterne alle havde fået Nutramigen som en væsentlig del af deres kost.

Murint IgG mod peptider fra Nutramigen og Alfare kunne påvises i sera fra mus sensibiliseret med henholdsvis Nutramigen og Alfare. Murine kontrolsera fra ikke-sensibiliserede dyr viste ingen positiv IgG reaktion i ELISA.

4.3. DISKUSSION AF DEN MURINE PCA-TEST.

4.3.1. Udvikling af murin PCA-test - Valg af forsøgsdyr og metode.

Et stort antal indavlede musestammer er immunologisk velkarakteriserede, og en række murine »high responder« stammer med høj IgE-produktion og høj PCA-sensitivitet er beskrevet (Vaz & Ovary 1970, Jarrett 1978). I modsætning hertil er antallet af velkarakteriserede, indavlede »high responder« stammer af rotter (Jarrett 1978) og marsvin (Clausen *et al.* 1983) lille. Udviklingen af en praktisk anvendelig PCA-test til måling af proteiners og peptiders allergenicitet blev derfor baseret på en velkarakteriseret murin stamme, der ud fra mastcellernes sensitivitet *in vitro* blev antaget at være en »high responder« stamme.

Ved PCA-test af allergenicitet var det ønskeligt at kunne producere sera med høj IgE-titer. Veldefinerede sensibiliseringsprocedurer for fremstilling af sera med høj IgE-titer er kendt for så vidt angår mus (Vaz *et al.* 1971, Braga & Mota 1976, Chiorazzi *et al.* 1977) og rotter (Jarrett & Steward 1974, Jarrett *et al.* 1976, Jarrett 1978), mens effekten af disse procedurer på marsvin er utilstrækkeligt karakteriseret. Den i nærværende afhandling beskrevne alternative sensibiliseringsmetode (afsnit 4.1.3., publikation IV) blev udviklet på basis af kendt viden om, at høj IgE-produktion i rotter kan opnås ved sensibilisering med lave doser af antigen i kombination med adjuvans (Jarrett 1978).

Jarrett (1978) undersøgte effekten af en række forskellige adjuvanstyper, heriblandt FCA, i forbindelse med IgE-produktion i rotter. Konklusionen på disse undersøgelser var, at typen

af adjuvans var uden betydning for IgE-produktionen, men brug af adjuvans i forbindelse med primærinjektionerne var nødvendig for at inducere IgE-produktion. Høj IgE-titer blev opnået ved at anvende lave doser af allergen i forbindelse med et vilkårligt valgt adjuvans.

I forbindelse med den alternative sensibiliseringsmetode blev FCA rutinemæssigt anvendt i den primære injektion og eventuelt FIA i boosterinjektionerne. (se afsnit 4.2.1., 4.2.3. og 4.2.4.) Præliminære undersøgelser af den alternative sensibiliseringsmetode viste i overensstemmelse med Jarrett (1978) ingen signifikant forskel på anvendelse af FCA/FIA eller aluminiumhydroxid. Dette resultat blev senere bekræftet i en større komparativ undersøgelse af reaginproduktion og produktion af præcipiterende antistoffer ved anvendelse af forskellige adjuvans og forskellige doser af ovalbumin (Nielsen *et al.* 1989).

I modsætning hertil har andre fundet at FCA, i modsætning til aluminiumhydroxid, havde en inhiberende effekt på IgE-produktionen. Den inhiberende effekt skulle virke ved, at FCA i højere grad end aluminiumhydroxid stimulerer T-suppressor lymfocytterne (Osebold 1982). Det er sandsynligt, at denne uoverensstemmelse skyldes forskelle i de anvendte forsøgsdyrstammer, idet »high responder« og »low responder« stammer har vist sig at være forskellige specielt i deres T-suppressor aktivitet (Chiorazzi *et al.* 1977, Jarrett 1978).

Ved den anvendte direkte PCA-test af allergenicitet kunne kun et antigen testes pr. mus, og et relativt stort antal dyr blev derfor forbrugt ved dosis-respons undersøgelse af allergeniciteten. I denne sammenhæng blev mus foretrukket frem for marsvin og rotter, dels fordi PCA-tests lettest udføres på mus, og dels fordi omkostningerne ved brug af mus er lavere end omkostningerne ved brug af rotter eller marsvin. Den modificerede murine PCA-test til undersøgelse af peptiders potentielle allergenicitet (afsnit 4.2.3. og 4.2.3., publikation IV, Poulsen & Hau 1988a,b) viste en sensitivitet (mindste dosis valleprotein, der kunne inducere positiv PCA-reaktion, 0,1 mikrogram/dyr), der svarede til sensitiviteten af PCA-test på marsvin (Ovary 1964).

På baggrund af de resultater, der blev opnået i forbindelse med udviklingen og applikationen af den murine PCA-test, må mus opfattes som et attraktivt alternativ til rotter og marsvin både m.h.t. sensitivitet og m.h.t. den praktiske udførelse af PCA-test.

I forbindelse med udviklingen af den murine PCA-test blev det vist, at de PCA-reaktive antistoffer, der produceres ved anvendelse af den alternative immuniseringsmetode, var varme-labile (IgE). Murint IgG1 (Ovary *et al.* 1975, Braga & Mota 1976, Baeron *et al.* 1982, Maekawa & Ovary 1984) og murint IgG2a (Baeron *et al.* 1982, Maekawa & Ovary 1984) kan imidlertid også sensibilisere murine mastceller og fungere i den murine PCA-test. Det er endnu uafklaret i hvor høj grad IgG-molekyler er involveret i human type-I-hypersensitivitet, fordi det endnu er uvist om humant IgG4, der angives at kunne sensibilisere mastceller *in vitro*, er involveret i de anafylaktiske reaktioner *in vivo* (Bahna 1985, Husby 1988). Det er således endnu uafklaret om mus m.h.t. PCA-reaktive IgG-antistoffer simulerer human type-I-hypersensitivitet.

4.3.2. Murin PCA-test anvendt til undersøgelse af homogeniseret komælks evne til at inducere reaginproduktion

Publikation V og VI påviser for første gang, at homogenisering kan have en forstærkende effekt på mælksens evne til at sensibilisere mus. Kliniske undersøgelser, der belyser dette forholds betydning ved human komælksallergi, er endnu ikke blevet udført.

Jarrett (1978) viste, at en persistent høj IgE-titer i rotter blev opnået, når lave doser af allergen (ovalbumin) blev anvendt i kombination med et adjuvans. Advendelse af adjuvans blev vist at være nødvendig for opnåelse af høje titre af IgE, mens typen af adjuvans var af mindre betydning. Således førte sensibilisering med lave doser af ovalbumin (< 1 mikrogram) i traditionelle oliebaseerede adjuvanser til en fuldt tilstrækkelig adjuvanseffekt med induktion af høje IgE-titre.

Homogenisering af mælk fører til dannelse af stabile lipid-protein-komplekser, hvor lipid-dråberne ligger indlejret i et proteinlag, overve-

jende bestående af kasein (afsnit 2.1. og 3.3.2., publikation I-III). Denne struktur har en betydelig lighed med et olie-i-vand-adjuvans, der gav 10-fold højere titre af præcipiterende antistoffer i mus end de traditionelle vand-i-olie-adjuvanser (Herbert 1965). De i nærværende afhandling beskrevne undersøgelser (afsnit 4.2.2., publikation V) demonstrerede, at sensibilisering af mus med homogeniseret mælk uden tilstedeværelse af adjuvans førte til dannelse af relativt høje serumniveauer af murine reaginer. Derimod viste ubehandlet mælk en ringe eller manglende evne til at inducere reaginproduktion i mus. Undersøgelserne demonstrerede således, at homogenisering påførte mælken en forøget evne til at sensibilisere mus, og det er tænkeligt, at denne effekt opnås ved, at mælken ved homogenisering påføres adjuvansegenskaber, der svarer til egenskaberne af en olie-i-vand-adjuvans (publikation V).

Kliniske undersøgelser viste for nylig en statistisk signifikant sammenhæng mellem udvikling af komælksallergi hos spædbørn og indtagelse af konventionelle moder-mælkserstatninger på fødselsafdelingerne indenfor børnenes første levedøgn (Høst *et al.* 1988). Konventionelle moder-mælkserstatninger fremstilles ved anvendelse af et særligt højt homogeniseringstryk, og alle proteinerne findes lokaliseret i lipid-protein-komplekser.

Det er endnu uvist, om den beskrevne adjuvansegenskab af homogeniseret mælk har betydning ved udvikling af human komælksallergi. Det kan imidlertid ikke udelukkes, at homogenisering i forbindelse med fremstilling af moder-mælkserstatninger, kan forstærke mælksens evne til at sensibilisere prædisponerede spædbørn, så flere børn udvikler allergi end tilfældet ville være, hvis uhomogeniserede moder-mælkserstatninger (eller hypoallergene moder-mælkserstatninger) blev anvendt på fødselsafdelingerne i stedet for de konventionelle moder-mælkserstatninger.

4.3.3. Murin PCA-test af vallepeptiders allergicitet.

Undersøgelserne af peptiders allergicitet ved anvendelse af den murine PCA-test (publikation IV, Poulsen & Hau 1988a,b) viste over-

ensstemmelse med resultater opnået af *Lui et al.* (1967), der viste, at et peptid på 7200 Da fremstillet ved enzymatisk hydrolyse af bovin serum albumin kunne udløse positiv PCA-reaktion. *Kurisaki et al.* (1982) fandt i modsætning hertil, at peptider mindre end 10000 Da fremstillet ved hydrolyse af betalactoglobulin ikke var i stand til at inducere positiv reaktion i PCA-inhibitionstest. Uoverensstemmelsen mellem de opnåede og de citerede resultater kan skyldes

- anvendelse af forskellige testmetoder. *Kurisaki et al.* (1982) anvendte PCA-inhibitionstest til bestemmelse af peptidernes allergenicitet. Som det fremgår af afsnit 2.3. er resultater fra den direkte PCA-test og PCA-inhibitionstest ikke altid overensstemmende.
- forskel i følsomhed. *Kurisaki et al.* (1982) anvendte en heterolog PCA-test, hvor murine antistoffer blev anvendt til passiv sensibilisering af rotter. Det er almindeligt kendt, at sensitiviteten af heterolog PCA-test er lavere end sensitiviteten af homolog PCA-test, hvor recipientdyrene, der passivt sensibiliseres, tilhører samme art, som de dyr, der har produceret antistofferne (*Ovary 1964, Brocklehurst 1973, Braga & Mota 1976, Maekawa & Ovary 1984*).
- anvendelse af dosis-respons-analyser. Det fremgår ikke klart om *Kurisaki et al.* (1982) forsøgte at udføre inhibitionstesten ved forskellige koncentrationer af peptider med molekylvægt under 10000 Da. Ved PCA-inhibitionstest vil graden af inhibition være afhængig af koncentrationsforholdet mellem PCA-reaktive antistoffer og inhiberende peptid, og manglende inhibition kan opstå ved anvendelse af for lave koncentrationer af peptid.
- anvendelse af valleproteinhydrolysater i nærværende undersøgelse i stedet for rent lactoglobulinhydrolysat, der blev anvendt af *Kurisaki et al.* (1982). Valleproteinhydrolysatet havde et indhold af peptider fra en lang række proteiner, heriblandt peptider, der muligvis svarede til det af *Lui et al.* (1967) beskrevne.

I forbindelse med projektets proces teknologiske del blev det vist, at enzymatisk hydrolyse af

valleproteiner efterfulgt af separation af peptider mindre end 6000 Da, førte til et hypoallergent peptidprodukt, der hverken gav positiv PCA-reaktion i den murine model eller allergiske reaktioner ved provokation af klinisk vel-dokumenteret komælksallergiske patienter (afsnit 4.2.4.1.). Visse af de børn, der indgik i den kliniske afprøvning, viste kroniske allergiske reaktioner, og den fremstillede peptidpræparation kunne tilsyneladende inhibere disse reaktioner, idet børnene i afprøvningsperioden viste en tydelig bedring i deres kroniske reaktioner, vigtigst eksem. Dette forhold er tidligere beskrevet af *Stefanovic et al.* (1974), der viste, at Cathepsin D hydrolyset humant serum albumin (HSA) gav en peptidpræparation, der kunne inhibere anafylaktiske reaktioner mod uhydrolyseret HSA. HSA-hydrolysatet kunne derimod ikke inducere anafylaktiske reaktioner i en passiv systemisk anafylaktisk shock model. Den fremstillede peptidpræparation, der blev anvendt i den kliniske afprøvning, viste en meget svag antistofbinding i ELISA. Ultrafiltrering gennem 6000 Da cut off membraner tillader passage af små mængder mere højmolekylære peptider, og den ved ELISA målte antistofbinding hidrørte muligvis fra tilstedeværelse af meget små mængder højmolekylært peptid (større end 6000 Da).

4.3.4. PCA-test af hypoallergene modermælkserstatninger.

I nærværende afhandling (afsnit 4.2.4.2. og 4.2.4.3., *Poulsen & Hau 1987b*) beskrives fremstilling af murine PCA-reaktive antistoffer med specificitet mod højmolekylære komponenter i Nutramigen og Alfare, der begge forhandles som hypoallergene modermælkserstatninger. *Seban et al.* (1977) viste tidligere tilstedeværelse af højmolekylære komponenter i både Pregestimil og Nutramigen. Pregestimil kunne i kaniner og marsvin inducere dannelse af præcipiterende antistoffer med specificitet mod forskellige komælksproteiner. I modsætning hertil kunne Nutramigen ikke inducere dannelse af præcipiterende antistoffer mod mælkeproteiner. Den manglende erkendelse af tilstedeværelsen af allergene komponenter i Nutramigen kan skyldes den af *Seban et al.*

(1977) valgte metode. Det er på ingen måde givet, at antistoffer rejst mod Nutramigen vil kunne præcipitere native komælksproteiner. Dette kræver en høj grad af immunologisk identitet mellem komponenter i Nutramigen og native komælksproteiner. Nutramigen fremstilles ved enzymatisk hydrolyse af komælksproteiner (kasein), og denne hydrolyse kan have resulteret i dannelse af nye antigendeterminanter (Spies 1973, Haddad *et al.* 1979).

Ligeledes kan varmebehandlingen af Nutramigen ændre konfigurationen af antigendeterminanter og føre til nyes opståen (afsnit 2.3.1.). Den i afhandlingen beskrevne homologe murine PCA-test, der målte peptidernes evne til at inducere reaginproduktion mod peptiderne selv, blev vist, at være en mere egnet metode til præliminær screening af peptiders potentielle allergenicitet.

Nærværende afhandling beskriver tilstedeværelsen af antistoffer mod den højmolekylære fraktion af Nutramigen i sera fra enkelte komælksallergiske patienter, der har fået Nutramigen gennem længere tid som en væsentlig del af deres ernæring (afsnit 4.2.4.3). Tilstedeværelse af specifikt IgG i serum er imidlertid ikke ensbetydende med, at de højmolekylære komponenter i Nutramigen fungerer som allergener i komælksallergiske patienter (jvf. afsnit 2.3.1.). Dette kan kun entydigt vises ved provokationstest af patienter med den højmolekylære fraktion af Nutramigen. De specifikke antistoffer mod Nutramigen i patientsera er imidlertid en indikation for, at Nutramigen kan inducere antistofdannelse i komælksallergiske patienter, og det kan ikke udelukkes, at nogle af disse patienter tillige producerer IgE med specificitet mod de højmolekylære komponenter i Nutramigen. Der er således en mulighed for, at de gastrointestinale reaktioner, der kan forekomme ved belastning med Nutramigen (Seban *et al.* 1977), kan skyldes en lokal allergi-reaktion i tarmmucosa.

5. DANSK SAMMENDRAG.

Nærværende afhandling beskriver udvikling og applikation af to forsøgsdyrmodeller til måling af komælkproteiners og -peptiders allergenicitet. Formålet var initialt at opnå *in vivo* me-

toder, der kunne anvendes som supplement til *in vitro* metoder ved test af allergenicitet. Den praktiske anvendelighed af metoderne blev derfor prioriteret højt.

Indavlede mus blev foretrukket dels for at minimere den genetiske variation, dels fordi det murine immunsystem er bedre karakteriseret end andre forsøgsdyrarter, dels fordi high-responder stammer af indavlede mus er kendte (f.eks. den anvendte BALB/cBom stamme), og endelig fordi anvendelse af mus ved semi-kvantitative dosis-respons tests af allergenicitet er mindre tids- og omkostningskrævende end anvendelse af rotter eller marsvin.

Undersøgelserne viste, at sensitiviteten af indavlede BALB/cBom mus både i anafylaktisk shock test (laveste dosis af mælkeprotein eller ovalbumin, der kan inducere anafylaktiske shock i sensibiliserede mus) og i PCA-test (laveste dosis af valleproteiner, der kan udløse positiv PCA-reaktion, 0,1 mikrogram/mus) svarede til sensitiviteten af marsvin, der ofte p.g.a. en høj sensitivitet anbefales til disse tests.

Den murine anafylaktisk shock test blev anvendt til at undersøge effekten af varmebehandling og homogenisering på mælks allergenicitet (publikation I-III).

Homogenisering resulterede i en markant forøgelse af mælks evne til at udløse anafylaktiske reaktioner i sensibiliserede mus. De homogeniserede mælkeprøver med et fedtindhold på 1,5% (letmælk) eller 3,5% (sødmælk) kunne inducere anafylaktiske reaktioner ved en dosis på 300 mikrogram/dyr, mens de tilsvarende uhomogeniserede mælkeprøver kun kunne udløse anafylaktiske reaktioner ved dosis over 2000 mikrogram/dyr. Effekten af homogenisering steg signifikant med stigende fedtindhold i mælkeprøverne. Homogeniseret, lavpasteuriseret skummetmælk kunne inducere anafylaktiske reaktioner ved en dosis på 900 mikrogram/dyr, mens homogeniseret, lavpasteuriseret letmælk og sødmælk kunne inducere anafylaktiske reaktioner ved 300 mikrogram/dyr. I overensstemmelse med de opnåede resultater blev det senere vist, at homogeniseret mælk udløser anafylaktiske reaktioner i type-I-hypersensitive børn ved lavere doser end ube-

handlet mælk (*Høst and Samuelsson 1988*). Lavpasteurisering havde ingen signifikant effekt på mælkeprøvernes evne til at inducere anafylaktisk shock, mens kogning reducerede denne evne specielt i homogeniserede mælkeprøver med lavt fedtindhold. Således kunne kogt homogeniseret skummetmælk ikke udløse anafylaktiske reaktioner ved 900 mikrogram/dyr, kogt homogeniseret letmælk kunne alene inducere anafylaktiske reaktioner ved 900 mikrogram/dyr, mens kogt homogeniseret sødmælk kunne inducere anafylaktiske reaktioner ved 300 mikrogram/dyr.

Et kontrolforsøg med homogeniseret majsolie-ovalbumin viste, at dannelse af lipid-protein-komplekser ikke i sig selv har en forøgende effekt på allergens evne til at udløse anafylaktiske reaktioner (publikation III). Den forøgende effekt af homogenisering på specielt mælkeproteinernes evne til at udløse anafylaktiske reaktioner kan muligvis forklare ved, at homogeniseringen fører til en eksponering af kaseinernes antigendeterminanter. I ubehandlet mælk findes alfa- og betakaseinmolekylerne skjult i kaseinmiceller, der på overfladen er dækket med kappakasein.

Homogenisering forøger overfladearealet af fedtlegemerne adskillige gange, og de nye overflader stabiliseres ved, at kaseinmolekyler adsorberes til overfladerne ved hydrofob interaktion. I homogeniseret mælk findes således et stort antal alfa- og betakaseinmolekyler eksponeret på fedtlegemernes overflade, og kaseinmolekylernes antigene determinanter kan frit reagere med specifikke antistoffer på mastcellernes overflader.

I publikation III formuleres »den kolloidkemiske model«, der fastslår, at allergeniciteten af et protein (d.v.s. den laveste dosis af proteinet, der er i stand til at udløse allergiske reaktioner), både er afhængig af proteinets antigendeterminanter og af proteinets kolloidkemiske omgivelser.

Den kolloidkemiske model blev vist at have relevans i forbindelse med komælsallergi, og det er muligt, at modellen er tilsvarende relevant ved undersøgelser af allergener, der er involveret i pollenallergi, allergi overfor dyrehår, husstøv, mel etc.

Undersøgelser af mælks evne til ved oral belastning at inducere anafylaktiske reaktioner i tarmen af sensibiliserede mus viste både, at kaseinmolekylerne i homogeniseret mælk når ufordøjet ned i tarmen i højere koncentration end kaseinmolekylerne i ubehandlet mælk, og at homogeniseret mælk mere effektivt udløser anafylaktiske tarmreaktioner (væskeophobning i tarmvæggen og mastcelledegranulering i tarmmucosa) end oral belastning med ubehandlet mælk (publikation VI). Dette resultat kan til dels forklare kliniske undersøgelser, der viser, at en mindre andel af veldokumenterede komælsallergiske børn kan tolerere ubehandlet mælk, selv om de reagerer ved provokation med homogeniseret mælk (*Hansen et al. 1987*). Selv om der endnu kun er blevet udført meget få kliniske undersøgelser af betydningen af homogenisering på mælks evne til at udløse humanallergiske reaktioner, tyder de forhåndenværende undersøgelser på, at der er god overensstemmelse mellem de kliniske observationer og de resultater, der opnås ved anvendelse af den murine anafylaktisk shock model.

Den murine PCA-test blev anvendt rutinemæssigt som en simpel *in vivo* test af allergeniciteten af mælkeprotein- og peptidpræparationer. Den murine PCA-test blev blandt andet anvendt til at måle serumniveau af murine PCA-reaktive antistoffer (reagine antistoffer) produceret ved sensibilisering med forskellige mælkeprodukter og ved anvendelse af forskellige sensibiliseringsprocedurer (publikation I-III). Undersøgelserne viste, i overensstemmelse med resultater opnået af *Jarrett (1978)* ved undersøgelser på rotter, at høje titre af PCA-reaktive antistoffer opnås ved sensibilisering med lave doser af mælkeprotein i kombination med et adjuvans. En alternativ sensibiliseringsprocedure, der involverer intraperitoneal primærinjektion af mælkeprotein (10 mikrogram/mus) i Friends Complete Adjuvant og intraperitoneale boosterinjektioner af mælkeprotein (1 mikrogram/mus) i Friends Incomplete Adjuvant, blev udviklet og anvendt rutinemæssigt til fremstilling af sera med høj titer af PCA-reaktive antistoffer.

Undersøgelserne viste endvidere (publikation V-VI), at sensibilisering med lave doser af ho-

mogeniseret mælk uden anvendelse af adjuvans førte til dannelse af høje titre af PCA-reaktive antistoffer, mens sensibilisering med ubehandlet mælk førte til meget lave eller ikke-målelige serumtitre af PCA-reaktive antistoffer. Disse undersøgelser er de første, der beskriver, at homogenisering kan forøge mælkeproteinernes evne til at sensibilisere mus. Forklaringen herpå kan muligvis være, at homogenisering fører til dannelse af lipid-proteinkomplekser, der i sig selv har adjuvansegenskaber, der svarer til egenskaberne af en olie-i-vand-adjuvans (Herbert 1965). Det er endnu uvist, om homogenisering på samme måde forøger mælkens evne til at sensibilisere komælksallergidisponerede børn.

De mest lavmolekylære peptider (molekylvægt < 3400 Da), fremstillet ved enzymatisk hydrolyse af valleproteiner efterfulgt af størrelseskromatografisk separation af peptiderne, kunne ikke inducere positiv PCA-reaktioner i den murine PCA-test ved anvendelse af murine antistoffer mod valleproteiner (publikation IV, Poulsen & Hau 1988a,b). Peptiderne i molekylvægtområdet 6500-3400 Da viste svag evne til at inducere PCA-reaktion ved en dosis på 100 mikrogram/mus, hvilket svarer til en reduktion af allergeniciteten på cirka 1000 gange sammenlignet med native valleproteiner. Peptider med molekylvægt større end 6500 Da viste ingen reduktion i allergeniciteten ved de anvendte dosisniveauer.

Resultaterne, der er i overensstemmelse med undersøgelser af Lui *et al.* (1967), viste at peptider mindre end cirka 10000 Da kan være potentielt allergene. Det har tidligere været antaget, at peptider mindre end 10000 Da var ude af stand til at udløse allergireaktioner (Tizard 1982).

På baggrund af de indledende undersøgelser, hvor den murine PCA-test blev anvendt til at screene peptidpræparationers potentielle allergenicitet, blev peptidpræparationer fremstillet i semiindustriell skala ved enzymatisk hydrolyse af valleproteiner efterfulgt af isolering af peptider med molekylvægt under 6000 Da (ultrafiltrering gennem 6000 Da cut off membraner). Disse peptidpræparationer kunne hverken ud-

løse positiv PCA-reaktioner i mus eller allergiske reaktioner i komælksallergiske børn. Den murine PCA-test viste således god overensstemmelse med de kliniske resultater (Samuelsson & Poulsen 1985), og den murine PCA-test har sandsynligvis en god prædiktiv værdi m.h.t. bedømmelse af peptiders potentielle allergenicitet i mennesker.

Dosis-respons PCA-tests blev vist at være anvendelige både til at opnå et semikvantitativt mål for proteiners og peptiders allergenicitet, og samtidig til at vise tilstedeværelsen af PCA-inhiberende peptider i hydrolysater af valleprotein (Poulsen & Hau 1988b). De industrielt fremstillede peptidpræparationer, der blev anvendt i den klinisk afprøvning, viste en tilsvarende dæmpende effekt på patienternes allergireaktioner, og den udviklede PCA-test kan således også på dette område have en prædiktiv værdi.

PCA-testen kunne anvendes til at påvise tilstedeværelsen af allergene komponenter i de hypoallergene modermælkserstatninger Nutramigen (Poulsen & Hau 1987b) og Alfare. I overensstemmelse hermed blev antistoffer med specificitet mod allergene komponenter i Nutramigen påvist i sera fra komælksallergiske patienter, der havde fået Nutramigen som en væsentlig del af deres kost.

Nærværende afhandling har således dokumenteret, at den udviklede homologe murine PCA-test anvendt i dosis-respons undersøgelser er et attraktivt alternativ til andre *in vivo* metoder til bedømmelse af peptiders allergenicitet, f.eks. heterolog PCA-inhibitionstest (Kurisaki *et al.* 1982) eller måling af produktion af præcipiterende antistoffer i kaniner (Seban *et al.* 1977).

6. SUMMARY IN ENGLISH.

The present thesis describes the development and application of two experimental animal models for the assessment of allergenicity of bovine milk proteins and peptides. Initially, the aim was to obtain *in vivo* methods, which could be used as supplement to *in vitro* methods for measurements of allergenicity. Thus, the applicability of the methods had a high priority.

Inbred mice were preferred for several reasons. The use of inbred mice minimizes genetic variation, high responder strains of inbred mice are well known (e.g. the employed strain BALB/cBOM), and finally the expenditure of using inbred mice in semiquantitative dose-response tests of allergenicity is less than when using rats or guinea pigs.

Guinea pigs are often recommended for tests of allergenicity due to their high sensitivity. The present studies showed, however, that the sensitivity of inbred BALB/cBom mice in both anaphylactic shock test (lowest dose of milk proteins or ovalbumin capable of inducing anaphylactic shock) and in PCA-test (lowest dose of whey proteins capable of inducing positive PCA-reaction) was equal to the sensitivity of guinea pigs.

The murine anaphylactic shock test was employed in the study of effects of heat treatment and homogenization on the allergenicity of bovine milk.

Homogenization resulted in a marked increase in the ability of milk to induce anaphylactic reactions in sensitized mice. The homogenized milk samples containing 1.5% or 3.5% milk fat could induce anaphylactic reactions at doses of 300 microgram/mouse, whereas the corresponding unhomogenized milk samples were capable of inducing anaphylactic reactions at doses larger than 2000 microgram/mouse, only. This effect of homogenization increased significantly with increasing fat content of the milk samples. Homogenized, lowpasteurized skimmed milk (0.05% fat content) could induce anaphylactic reactions at a dose of 900 microgram/ animal, whereas lowpasteurized, homogenized milk samples with a fat content of 1.5% or 3.5% could induce the reactions at a dose of 300 microgram/animal. In agreement with these results, it was later shown, that homogenized milk induces anaphylactic reactions in type-I-hypersensitive children at lower doses than untreated milk (*Høst and Samuelsson 1988*).

Lowpasteurization had no significant effect on the ability of bovine milk to induce anaphylactic reactions. By contrast, boiling reduced this

ability particularly in the milk samples with low fat content. Boiled homogenized skimmed milk could not induce anaphylactic reactions at a dose of 900 microgram/animal. Boiled homogenized milk with 1.5% fat content could induce reactions at a dose of 900 microgram/animal, only. By contrast, boiled homogenized milk with 3.5% fat content could induce the reactions at a dose of 300 microgram/animal. A control experiment with homogenized ovalbumin revealed, that the formation of lipid-protein complexes by it self has no increasing effect on the ability of ovalbumin to induce anaphylactic reactions. Consequently, the effect of homogenization on the ability of milk to induce anaphylactic reactions must be linked to the exposure of antigenic determinants on the casein molecules. The alpha- and beta-caseins of untreated milk are hidden in the casein micelles, which are covered with kappa-casein molecules on the surface.

Homogenization increases the surface area of the fat bodies tremendously, and casein molecules are adsorbed to the newly formed surfaces by hydrophobic interaction. Thus, in homogenized milk a large number of alpha- and beta-casein molecules are exposed on the surface of the fat bodies, and the antigenic determinants of the caseins are free to react with specific antibodies on the mast cell surfaces.

In publication III I present »the colloid chemical model« stating, that the allergenicity of a protein, i.e. the lowest dose of the protein capable of inducing allergic reactions, is dependant both on the antigenic determinants of the protein and on the colloid chemical environment of the protein.

The colloid chemical model is shown to be relevant in the study of the allergenicity of bovine milk, and it seems possible that the model is equally relevant in studies of allergens involved in allergy against pollen, animal hair, house dust, flour etc.

Analysis of the distribution of bovine milk proteins and induction of anaphylactic reactions in the murine gut after oral challenge with bovine milk has shown, that more undegraded casein molecules reached the proximal part of the in-

testine when homogenized bovine milk is applied as compared with challenge with untreated bovine milk. Furthermore, oral challenge with homogenized milk induces anaphylactic reactions in the murine gut (accumulation of liquid in the intestinal wall and degranulation of mast cells in the gut mucosa) more efficiently than oral challenge with untreated bovine milk. These results may in part explain why some clinically well documented cows milk allergic children tolerate challenge with untreated milk but react upon challenge with homogenized milk (Hansen *et al.* 1987). Even though only a few clinical studies have been published on the effects of homogenization on the ability of milk to induce human allergic reactions, the current knowledge indicates a correlation between the clinical observations and the presented results obtained by using the murine anaphylactic shock model.

The murine PCA-test was used routinely as a simple *in vivo* test for assessment of the allergenicity of bovine milk protein and peptide preparations.

In one series of experiments the murine PCA-test was used for measurements of serum titres of murine PCA-reactive antibodies (reagin titres) produced by sensitization with different milk products and employing different schemes of sensitization (publications I-III). In agreement with the results of Jarrett (1978) on rats, the results of the present work demonstrate, that high titres of PCA-reactive antibodies are obtained by sensitization with low dose of milk proteins injected in combination with an adjuvant. An alternative scheme of sensitization, which involves intraperitoneal primary injections of milk proteins (10 microgram per mouse) in Freund's Complete Adjuvant and intraperitoneal booster injections of milk proteins (1 microgram per mouse) in Freund's Incomplete Adjuvant was developed and used routinely for the production of sera with high titres of PCA-reactive antibodies. Furthermore, the present studies showed (publications V-VI), that sensitization with low doses of homogenized milk without addition of a traditional

adjuvant lead to production of high titres of PCA-reactive antibodies, whereas untreated bovine milk resulted in very low or lacking titres of PCA-reactive antibodies when untreated milk was used without adjuvant in the alternative scheme of sensitization. These experiments are the first to demonstrate, that homogenization can increase the ability of the milk proteins to sensitize mice. The explanation of these results may be, that homogenization leads to the formation of lipid-protein complexes, which by them selves possess adjuvant properties comparable to the properties of oil-in-water adjuvants (Herbert 1965). It is still unknown if homogenization increases the ability of bovine milk to sensitize susceptible children in the same manner as demonstrated for mice.

The most low molecular weight peptides (molecular weight < 3400 Da), produced by enzymatic hydrolysis of bovine whey proteins and separation of the peptides according to size, could not induce positive PCA-reactions in the murine PCA-test using murine antibodies against whey proteins (publication IV, Poulsen & Hau 1988a,b).

Peptides in the molecular weight range 3400 - 6500 Da showed a weak ability to induce positive PCA-reactions, an ability equivalent to a 1000-fold reduction of the allergenicity as compared with native whey proteins. Peptides larger than 6500 Da showed no reduction of allergenicity at the dose levels employed.

The results, which are in agreement with the findings of Lui *et al.* (1968) showed, that peptides with molecular weight less than 10000 Da can be potentially allergenic. Early studies suggested that peptides smaller than 10000 Da were unable to induce allergic reactions (Tizard 1982).

Based on the results of preliminary experiments in which the murine PCA-test was used for screening the allergenicity of peptide preparations, peptide preparations were produced in semiindustrial scale using enzymatic hydrolysis of whey proteins and isolation of peptides with molecular weight less than 6000 Da (ultrafiltration through 6000 Da cut off membranes).

These peptide preparations could neither induce positive PCA-reactions in mice nor allergic reactions in cow's milk allergic children.

Thus, the murine PCA-test showed good agreement with clinical experience (Samuelsson & Poulsen 1985), and the murine PCA-test seems to have a good predictive value with respect to evaluation of the potential allergenicity of peptides in humans.

Dose-response tests were shown to be useful in obtaining semiquantitative measurements of protein or peptide allergenicity, and at the same time to demonstrate the presence of PCA-inhibitory peptides in hydrolysates of whey proteins (Poulsen & Hau 1988b). The peptide preparations, which were used in the clinical tests, showed a similar inhibitory effect on the allergic reactions of the patients, and, consequently, the PCA-test developed also had a predictive value in this context.

The PCA-test could be used for demonstrating the presence of allergenic components in the hypoallergenic infant formulae Nutramigen and Alfare. In agreement, antibodies with specificity against allergenic components in Nutramigen were demonstrated in sera of cow's milk allergic children, who were fed Nutramigen as an essential part of their diet.

The present work has demonstrated, that the murine PCA-test developed using homologous antibodies and measurements of dose-response relationship is an attractive alternative to other *in vivo* methods for assessment of peptide allergenicity, e.g. heterologous PCA-inhibition test (Kurisaki *et al.* 1982) or measurements of production of precipitating antibodies in rabbits (Seban *et al.* 1977).

7. REFERENCCELISTE.

- Aas, K. (1978) »The diagnosis of hypersensitivity to ingested foods. Reliability of skin prick testing and the radioallergosorbent test with different materials«. CLINICAL ALLERGY 8: 39.
- Andre, C., Bazin, H., Heremans, J.F. (1973). »Influence of repeated administration of antigen by the oral route on specific antibody-producing cells in the mouse spleen«. DIGESTION 9: 166.
- Atassi, M.Z. »The complete antigenic structure of myoglobin: Approaches and conclusions for antigenic structure of proteins«. Cap. 3 In IMMUNOCHEMISTRY OF PROTEINS, VOL. 2. (M.Z. Atassi, ed.) Plenum Press, New York and London, 1977.
- Atassi, M.Z., Habeeb, A.F.S.A. »The antigenic structure of hen egg-white lysozyme: A model for disulphide-containing proteins«. Cap. 4 in IMMUNOCHEMISTRY OF PROTEINS, VOL. 2. (M.Z. Atassi, ed.) Plenum Press, New York and London, 1977.
- Baeron, M., Couderc, J., Ventura, M., Liacopoulos, P., Voisin, G.A. (1982). »Anaphylactic properties of mouse monoclonal IgG2a antibodies«. CELLULAR IMMUNOLOGY 70: 27.
- Bahna, S.L. (1985). »Pathogenesis of milk hypersensitivity«. IMMUNOLOGY TODAY 6(5): 153.
- Bahna, S.L. and Gandhi, M.D. (1983) »Milk hypersensitivity. I. Pathogenesis and symptomatology«. ANN. ALLERGY 50(4): 218.
- Balli, F., Venuta, A., Bertolani, P., Forese, S., Rivas, P., Benassi, G., Olivi, O. (1983). »Leucocyte migration inhibition factor test as a diagnostic tool for cow's milk allergy«. NUTRITION RESEARCH 3: 198.
- Basuyau, J.P., Mallet, E., Brunelle, Ph., de Menibus, C.H. (1983). »Les intolerances au lait de vache«. LA PRESS MEDICALE 12(33):2041.
- Bazin H. and Platteau, B. (1976). »Production of circulating reaginic (IgE) antibodies by oral administration of ovalbumin to rats«. IMMUNOLOGY 30: 679.
- Bengtsson, C., Hanson, L.Å., Johansson, B.G. (1962). »Immunological studies of modified and enzymatic degraded betalactoglobulin and alfa-lactalbumin«. ACTA CHEM. SCAND. 16: 127.
- Berenstein, I.D. and Ovary, Z. (1968). »Absorption of antigens from the gastrointestinal tract«. INT. ARCH. ALLERGY 33: 521.
- Bing, D.H. and Stavitsky, A.B. (1968). »Isolation and characterization of two antigenically active peptides from bovine beta-lactoglobulin A«. IMMUNOLOGY 15: 305.
- Björkstén, B., Ahlstedt, S., Björkstén, F., Carlsson, B., Fallström, S.P., Juntunen, K., Kajosaari, M., Kober, A. (1983). »Immunoglobulin E and immunoglobulin G4 antibodies to cow's milk in children with cow's milk allergy«. ALLERGY 38: 119.
- Braga, F. and Mota, I. (1976). »Homologous passive cutaneous anaphylaxis (PCA) in mice and heterologous PCA induced in rats with mouse IgE«. IMMUNOLOGY 30: 655.
- Brocklehurst, W.E. (1973). »Passive Cutaneous anaphylaxis«. In HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY (D.M. Weir, ed.). Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- BULLETIN OF THE INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION No. 191/1985 »Protective proteins in milk. Biological significance and exploi-

- tation. Lysozyme, Lactoferrin, Lactoperoxidase, Xanthine oxidase.
- Butler, M., Atherton, D., Levinsky R.J. (1982). »Quantitative and functional deficit of suppressor T cells in children with atopic eczema«. CLIN. EXP. IMMUNOL. 50:92.
- Byars, N.E., Ferraresi, R.W. (1976). »Intestinal anaphylaxis in the rat as a model of food allergy«. CLIN. EXP. IMMUNOL. 24:352.
- Carrick, B.M., Alexander, M.D. (1982). »The effect of milk feeding on specific intestinal protein permeability in the guinea-pig«. NUTRITIONAL RESEARCH 2: 603.
- Chiorazzi, N., Fox, D.A., Katz, D.H. (1977). »Hapten specific IgE responses in mice. VII. Conversion of IgE »non responder« strains to IgE »responders« by elimination of Suppressor T Cell activity«. J. IMMUNOL. 111:48.
- Clausen, J.T., Lundberg, L., Sparck, J.V. (1983). »Characterization of two strains of selectively bred guinea-pigs«. ACTA. PATH. MICROBIOL. IMMUNOL. SCAND. SECT. C. 91: 377.
- Cryskay, F.L. (1982) »Comparison of breast, cow, and soy feedings in the prevention of allergic disease. A 15-years prospective study«. CLIN. PEDIATRICS 21: 486.
- Dolezel, J. and Bienenstock, J. (1971a) »Immune response of the hamster to oral and parenteral immunization«. CELLULAR IMMUNOLOGY 2: 326.
- Dolezel, J. and Bienenstock, J. (1971b). »Gamma-A and non-Gamma-A immune response after oral and parenteral immunization of the hamster«. CELLULAR IMMUNOLOGY 2: 458.
- Eastham, E.J. & Walker, W.A. (1979) »Adverse effects of milk formula ingestion on the gastrointestinal tract. An update«. GASTROENT. 76: 365.
- Edelsten, D. (1982) »Composition of milk«. KOMPENDIUM. Mejeri brugsinstituttet, KVL.
- Eigel, W.N., Butler, J.E., Ernstrom, C.A., Farrall Jr., H.M., Harwalkar, V.R., Jenness, R., Whitney, R. McL. (1984) »Nomenclature of proteins of cow's milk, fifth revision«. J. DAIRY SCI. 67. 1599.
- Eriksson, N.E., Ahlstedt, S., Belin, L. (1976). »Diagnosis of reaginic allergy with house dust, animal dander and pollen allergens in adult patients. I. Comparison between RAST, skin tests and provocation tests«. INT. ARCH. ALLERGY APPL. IMMUN. 52: 335.
- Firer, M.A., Hosking C.S., Hill, D.J. (1981). »Effects of antigen load on development of milk antibodies in infants allergic to milk«. BR. MED. J. 283: 693.
- Ford, R.P.K., Hill, D.J., Hosking, C.S. (1983). »Cow's milk hypersensitivity: immediate and delayed onset clinical patterns«. ARCH. DISEASE CHILDHOOD 58: 856.
- Gjesing, B., Østerballe, O., Schwartz, B., Wahn, U., Løwenstein, H. (1986) »IgE antibodies against antigenic components in cow's milk and milk substitutes«. ALLERGY 41: 51.
- Habeeb, A.F.S.A. »Immunochemistry of bovine serum albumin«. In IMMUNOBIOLOGY OF PROTEINS AND PEPTIDES, VOL. I, pp. 101-107. Ed. M.Z. Atassi and A.B. Stavitsky. Plenum Press, New York and London, 1978.
- Haddad, Z.H., Kalra, V., Verma, S. (1979). »IgE antibodies to peptic and peptic-tryptic digests of betalactoglobulin: Significance in food hypersensitivity«. ANNALS OF ALLERGY 42: 368.
- Hambraeus, L. (1982) » Nutritional aspects of milk proteins«. DEVELOPMENT IN DAIRY CHEMISTRY 1: 289.
- Hansen, L.G. Høst, A, Østerballe, O. (1987): »Allergiske reaktioner på uhomogeniseret mælk og råmælk«. UGESKRIFT FOR LÆGER 149:909.
- Hargis, B.J. and Malkiel, S. (1970). »Production of hypersensitivity in the neonatal mouse«. J. IMMUNOL. 104(4): 942.
- Heppell, L.M., Cant, A.J., Kilshaw, P.J. (1984). »Reduction in the antigenicity of whey proteins by heat treatment: a possible strategy for producing a hypoallergenic infant formula«. BRITISH J. NUTRITION 51: 29.
- Herbert, B.J. (1965). »Multiple emulsions. A new form of mineral oil adjuvant«. THE LANCET 2(2):771.
- Hidalgo, J. and Gamper, E. (1977) »Solubility and heat stability of whey protein concentrates«. J. DAIRY SCI. 60: 1515.
- Husby, S. (1988). »Dietary antigens: Uptake and humoral immunity in man«. ACTA. PATH. MICROBIOL. IMMUNOL. SCAND. 96,SUPPL. 1.
- Husby, S., Svehag, S.-E., Jensenius, J.C. (1986). »Passage of dietary antigens in man: Kinetics of appearance in serum and characterization of free and antibody-bound antigen«. PROCEEDINGS EXP. BIOL. MED. (eds. Bienenstock, McGhee, Mestecy, Ogra).
- Husby, S., Jensenius, J.C., Svehag, S.-E. (1985). »Passage of undegraded dietary antigen into the blood of healthy adults. Quantification, Estimation of size distribution, and relation of uptake to levels of Specific Antibodies«. SCAND. J. IMMUNOL. 22: 83.
- Høst, A. and Samuelsson, E.-G. (1988) »Allergic reactions to raw, pasteurized, and homogenized and pasteurized cows milk. A comparison. A double blind placebo control study in milk allergic children«. ALLERGY in press.
- Høst, A., Husby, S., Østerballe, O. (1988). »Cow's milk allergy in exclusively breast fed infants. Incidence, Pathogenesis, Characterization of bovine milk in human milk«. ACTA PÆD. SCAND. 77: 663.
- Jakobsen, I. and Lindberg, T. (1979) »A prospective study of cow's milk protein intolerance in Swedish infants«. ACTA PÆDRIATR. SCAND. 68: 853.

- Jarrett, E.E.E. (1978). »Stimuli for the production and control of IgE in rats«. IMMUNOL. REV. 41:52.
- Jarrett, E.E.E. and Steward, D.C. (1974). »Rat IgE production. I. Effect of dose of antigen on primary and secondary reaginic antibody response«. IMMUNOLOGY 27: 365.
- Jarrett, E.E.E., Haig, D.M., McDougall, W., McNulty, E. (1976). »Rat IgE production. II. Primary and booster reaginic antibody responses following intradermal or oral immunization«. IMMUNOLOGY 30: 671.
- Jenness, R. and Patton, S. (editors). 1976. PRINCIPLES OF DAIRY CHEMISTRY. Robert E. Krieger Publishing Company, Huntington, New York. pp. 346-349.
- Juntunen, K. and Ali-yrkkö, S. (1983). »Goat's milk for children allergic to cow's milk«. SHORT COMM., Symposium on role of milk proteins in human nutrition, Kiel 1983.
- Kilara, A. (1985). »Enzyme-modified protein food ingredients«. PROCESS BIOCHEM, October: 149.
- Knights, R.J. »Processing and Evaluation of the antigenicity of protein hydrolysates«. Cap. 8 in CLINICAL DISORDERS IN PEDIATRIC NUTRITION VOL. 4: NUTRITION FOR SPECIAL NEEDS IN INFANCY - PROTEIN HYDROLYSATES. F. Lifshitz (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York and Basel, 1985.
- Koritz, T.N., Suzuki, S., Coombs, R.R.A. (1987a) »Antigenic stimulation of cow's milk via the oral route in guinea pigs and rats - 1. Measurement of antigenically intact beta-lactoglobulin and casein in the gastrointestinal contents of duodenum, jejunum and ileum«. INT. ARCHS. ALLERGY. APPL. IMMUN. 82: 72.
- Koritz, T.N., Suzuki, S., Coombs, R.R.A. (1987b). »Antigenic stimulation with cow's milk via the oral route in guinea pigs and rats - 2. Antibodies to beta-lactoglobulin secreted into the alimentary canal and serum«. INT. ARCHS. ALLERGY APPL. IMMUN. 82: 76.
- Kurisaki, J.-I., Nakamura, S., Kaminogawa, S., Yamauchi, K. (1982). »The antigenic properties of beta-lactoglobulin examined with mouse IgE-antibody«. AGRIC. BIOL. CHEM. 46(8): 2069.
- Levine, B.B. and Vaz, N.M. (1970). »Effect of combination of inbred strain antigen and antigen dose on immune responsiveness and reagin production in the mouse«. INT. ARCH. ALLERGY 39: 156.
- Lewis, A.J., Carlson, R.P., Foster, T.J., Chang, J., Hand, J.M., Uden, B.J., Buckner, C.K., Tio, C., Sisenwine, S.F., Daniel, W.C. (1986) »The development of Wy-41.195, an orally effective antiallergic drug in animal models«. AGENTS AND ACTIONS T8, 3/4: 306.
- Lewis, R.M. (1978). »Immunopathology«. in PATHOLOGY OF LABORATORY ANIMALS (Eds. K. Benirschke, F.M. Garner, T.C. Jones), Kap. 21: 1948-1949.
- Lorenzen, J. (1985). »Allergi, homogenisering - og råmælk«. ØKONOMAEN 5:11.
- Lui, C.T., Das, B.R. and Maurer, P.H. (1967). »Immunochemical studies of the tryptic, chymotryptic and peptic peptides of heat denatured bovine serum albumin«. IMMUNOCHEMISTRY 4:1.
- Løwenstein, H., Krasilnikoff, P.A., Bjerrum, O.J., Gudmund-Høyer, E. (1977). »Occurrence of specific precipitins against bovine whey proteins in serum from children with gastrointestinal disorders«. INT. ARCH. ALLERGY. APPL. IMMUNOL. 55: 514.
- Løwenstein, H. (1978). »Quantitative immunoelectrophoretic methods as tools for the analysis and isolation of allergens«. PROG. ALLERGY 25: 1.
- Maekawa, S. and Ovary, Z. (1984). »Correlation of Murine anti-Dinitrophenyl Antibody content as determined by ELISA, Passive Cutaneous Anaphylaxis and Passive Hemolysis«. J. IMMUNOL. METH. 71:229.
- Malo, C. and Morin, C.L. (1986). »Establishment of an animal model of ovalbumin sensitised mouse to study protein induced enteropathy«. GUT 27(11): 1298.
- Martin, M.E., Guthrie, L.A., Bock, S.A. (1984). »Serum complement changes during double-blind food challenges in children with a history of food sensitivity«. PEDIATRICS 73: 532.
- Matsuda, T., Kato, Y., Watanabe, K., Nakamura, R. (1985). »Immunochemical properties of proteins glycosylated through Maillard reaction: beta-lactoglobulin-lactose and ovalbumin-glucose systems«. J. FOOD. SCIENCE 50: 618.
- Matthews, T.S. and Soothill, J.F. (1970). »Complement activation after milk feeding in children with cows milk allergy«. THE LANCET, II:893.
- May, C.D., Fomon, S.J., Remigio, L. (1982) »Immunologic consequences of feeding infant with cow milk and soy products«. ACTA PÆDIATR. SCAND. 71: 43.
- McCaskill, A.C., Hosking, C.S., Hill, D.J. (1984). »Anaphylaxis following intranasal challenge of mice sensitized with ovalbumin«. IMMUNOLOGY 51: 669.
- McLaughlan, P., Anderson, K.J., Widdowson, E.M., Coombs, R.R.A. (1981). »Effect of heat on the anaphylactic-sensitising capacity of cows milk, goats milk, and various infant formulae fed to guinea-pigs«. ACH. DISEASE CHILDHOOD 56(3): 165. 171.
- McKenzie, H.A. (ed). »Milk proteins, chemistry and molecular biology«. 1970. Blackwell Scientific Publishers, Oxford.
- Nielsen, B.R., Tams, J.W., Poulsen, O.M., Hau, J. (1988). »Sensitivity of a murine anaphylactic shock model. Influence of precipitating antibodies«. Submitted 1989 to LAB. ANIMALS.

- Osebold, J.W.* (1982). »Mechanisms of action by immunological adjuvants«. *JAVMA* 181(10): 983.
- Otani, H. and Tokita, F.* (1982). »Contribution of the sugar moiety in the browning product between betalactoglobulin and lactose as an antigenic determinant«. *JPN. J. ZOOTECH. SCI.* 53: 344.
- Ovary, Z.* (1964). »Passive Cutaneous Anaphylaxis«. in *IMMUNOLOGICAL METHODS. CIOMS SYMPOSIUM* (J.F. Ackroyd, ed.). Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Ovary, Z., Caiazza, S.S., Kojima, S.* (1975). »PCA reactions with mouse antibodies in mice and rats«. *INT. ARCH. ALLERGY APPL. IMMUN.* 1975: 16.
- Paganelli, R., Levinsky, R.J., Brostoff, J., Wraith D.G.* (1979). »Immune complexes containing food proteins in normal and atopic subjects after oral challenge and effect of sodium cromoglycate on antigen absorption«. *THE LANCET*, JUNE 16: 1270.
- Paganelli, R., Atherton, D.J. and Levinsky, R.J.* (1983). »Differences between normal and milk allergic subjects in their immune responses after milk ingestion«. *ARCH. DISEASE CHILDHOOD* 58: 201.
- Pearson, J.R., Kingston, D. and Shiner, M.* (1983). »Antibody production to milk proteins in the jejunal mucosa of children with cow's milk protein intolerance«. *PEDIATR. RES.* 17: 406.
- Perdue, M.H., Chung, M., Gall D.G.* (1984). »Effect of intestinal anaphylaxis on gut function in the rat«. *GASTROENTEROLOGY*. 86: 391.
- Poulsen, O.M. and Hau, J.* (1986). »Laboratory Animals are Presently not Replaceable in the Study of Allergy«. *ICLAS Bulletin*, 59: 16-18.
- Poulsen, O.M. and Hau, J.* (1987a). »Homogenization and Allergenicity of Milk - some possible Implications for the Processing of Infant Formulae«. *North Eur. Food and Dairy J.* 53(7):239-242.
- Poulsen, O.M. and Hau, J.* (1987b). »Letter to the Editor«. *Allergy* 42:158.
- Poulsen, O.M. and Hau, J.* (1988a). »Murine passive cutaneous anaphylaxis test (PCA) for the »all or none« determination of allergenicity of bovine whey proteins and peptides«. In »new Developments in Biosciences: Their Implications for Laboratory Animal Science« (A.C. Beynen & H.A. Solleveld, eds.). Proceedings 3rd FELASA SYMPOSIUM Amsterdam, June 1-5, 1987, pg.87-92.
- Poulsen, O.M. and Hau, J.* (1988b). »Dose response assessment of peptide allergenicity using a murine passive cutaneous anaphylaxis test (PCA)«. Proceedings of the IX ICLAS symposium, Bangkok January 12-14, 1988, in press.
- Poulsen, O.M. and Petersen, L.W.* (1987). »Purification of an extracellular cellulose-binding endoglucanase of *Cellulomonas* sp. ATCC 21399 by affinity chromatography on H₃PO₄-swollen cellulose«. *BIOTECH. BIOENG.* XXIX: 799.
- Proceedings of the NIZO/IDF Symposium on the chemistry and physics of casein. Ede, The Netherlands August 28 - September 1, 1972. *NETH. MILK DAIRY JOURNAL* 27 (2/3), 1973.
- Roitt, I.M.* »Essential immunology«. 3th edition. Blackwell Scientific Publications, 1977.
- Roberts, S.A., Reinhardt, M.C., Paganelli, R., Levinsky, R.J.* (1981). »Specific antigen exclusion and non-specific facilitation of antigen entry across the gut in rats allergic to food proteins«. *CLIN. EXP. IMMUNOL.* 45: 131.
- Samuelsson, E.-G. and Poulsen, O.M.* (1985). »Peptidpræparat, fremgangsmåde til fremstilling deraf samt anvendelse af peptidpræparat«. *DANSK PATENTANSØGNING NR.* 5897/85.
- Savilahti, E.* (1981). »Cow's milk allergy«. *ALLERGY* 36: 73.
- Schambye, P.* (1985). »Celletoksikologi - et alternativ til dyreforsøg?«. *SCAN. J. LAB. ANIMAL SCI.* 12(4): 115
- Seban, A., Konijn, A.M. and Freier, S.* (1977). »Chemical and immunological properties of a protein hydrolysate formula«. *AM. J. CLIN. NUTR.* 30: 840.
- Shiner, M., Ballard, J., Smith M.E.* (1975). »The small-intestinal mucosa in cow's milk allergy«. *THE LANCET*, JANUARY 18: 136.
- Singh, B., Lee, K.-C., Fraga, E., Wilkinson, A., Wong, M., Barton, M.A.* (1980). »Minimum peptide sequences necessary for priming and triggering of humoral and cell-mediated immune responses in mice: use of synthetic peptide antigens of defined structure«. *J. IMMUNOL.* 124(3): 1336.
- Skov, P.S., Norn, S., Weeke, B.* (1983). »A rapid basophil histamin release method«. *EUR. J. RESPIR. DIS.* 64: SUPPL. 128, PART II. 387.
- Skov, P.S., Norn, S., Weeke, B.* (1984). »A new method for detecting histamin release«. *AGENTS AND ACTIONS* 14:414.
- Spies, J.R.* (1973). »Milk allergy«. *J. MILK FOOD TECHNOL.* 36(4): 225.
- Spur, B.* (1948a). »Begrebet »blødt koagulerende« (sorf curd) Mælk og dens Fordøjelighed«. *NORDISK MEJERI-TIDSSKRIFT*, 14(1): 3.
- Spur, B.* (1948b). »Metoder til fremstilling af »blødt koagulerende« (sorf curd) mælk, med særlig henblik på homogenisering af konsummælk«. *NORDISK MEJERI-TIDSSKRIFT*, 14(2): 3.
- Stefanovic, J., Kotulova, D., Bergendi, L., Huzulakova, I.* (1974). »The passive anaphylactic reaction in guinea pigs elicited by whole and Cathepsin D-degraded antigen«. *FOLIA MICROBIOL.* 19:71.
- Takase, M., Fukuwatari, Y., Kawase, K., Kiyosawa, I., Ogasa, K., Suzuki, S., Kuroume, T.* (1979). »Antigenicity of casein enzymatic hydrolysate«. *J. DAIRY SCI.* 62: 1570.

- Taylor, B., Fergusson, D.M., Mahoney, G.N., Hartley, W.A., Abbott, J.* (1982). »Specific IgA and IgE in childhood asthma, eczema and food allergy«. *CLINICAL ALLERGY* 12: 499.
- Theuer, R.C.* (1983). »Milk protein in infant nutrition: Development and manufacture of infant formula«. *SHORT COMMUNICATION, SYMPOSIUM ON ROLE OF MILK PROTEINS IN HUMAN NUTRITION*. Kiel 1983.
- Tizard, I.* (1982). »Antigen structure and immunogenicity«. *JAVMA* 181(10): 987.
- Treadwell, P.E., Wistar, R., Rasmussen Jr., A.F.* (1960). »Passive anaphylaxis in mice with homologous antiserum - I. Some quantitative aspects«. *J. IMMUNOL.* 84: 539.
- Ufkes, J.G.R., Ottenhof, M., Allberse, R.C.* (1983). »A new method for inducing fatal, IgE-mediated, Bronchial and Cardiovascular Anaphylaxis in the rat«. *J. PHARM. METH.* 9(3): 175.
- Vaz, N.M. and Ovary, Z.*, (1970). »Passive cutaneous anaphylaxis in mice with yG antibodies. IV. Strain differences in susceptibility to mast cell sensitization *in vitro*«. *J. IMMUNOLOGY* 104: 896.
- Vaz, E.M., Vaz, N.M., Levine, B.B.* (1971). »Persistent formation of reagins in mice injected with low doses of ovalbumin«. *IMMUNOLOGY* 21: 11.
- Visser, S.* (1981). »Proteolytic enzymes and their action on milk proteins. A review.«. *NETH. MILK DAIRY J.* 35: 65.
- Vitoria, J.C., Camarero, C., Sojo, A., Ruiz, A., Rodriguez-Soriano, J.* (1982). »Enteropathy related to fish, rice and chicken«. *ARCH. DISEASE CHILDHOOD* 57: 44.
- Østerballe, O.* (1983) »Allergiprofylakse«. *ALLERGOLOGEN* 4:1.

SCANTAINER



Scantainer type D med plads til 12 bure type IV.

Transportskab med indbygget luftfiltrering:
Specielt sandwich partikelfilter Klasse EU10, som er monteret på ind- og udblæsning og således beskytter både mennesker og dyr. Filterets effektivitet er $> 98,5\%$ DOP (fjerner $> 98,5\%$ af partikler $> 0,3 \mu\text{m}$). Opererer med undertryk. Aktivt kulfilter kan fås som ekstra tilbehør. Leveres i 3 udførelser. (Specielle størrelser efter ønske).

1. Reducerer allergirisikoen.
 2. Beskytter dyrene ved transport i og mellem dyrerummene.
 3. Til hold af dyr i karantæne.
 4. Tillader flere forsøg i samme dyrerum. (GLP).
 5. Til opbevaring af dyr under forsøg i laboratoriet.
- Kan tilsluttes eksisterende ventilationsanlæg.



SCANBUR A/S

Eneforhandler i Skandinavien for:
TECNIPLAST, ISOTEC, SPECIAL DIETS SERVICES,
ALCIDE ABQ, FOGMASTER, VETBED

Gl. Lellingegård
Bakkeleddet 9, Lellinge
DK-4600 Køge, Danmark

Tel: +45 53 82 02 21
Fax: +45 53 82 14 05
Telex: 9135301 scanbu dk
Teletex: 2381 - 135301=ScanbuDK

8. INDEX	SIDE
Adjuvans	27-28, 36
Aluminiumhydroxid	28
Freunds Complete Adjuvant	27, 28
Freunds Incomplete Adjuvant	27, 36
»Olie-i-vand« adjuvans	30
Adrenalin	16
Allergener i bovin mælk	11, 24
Allergenicitet	
Definition	10
Komælk <i>in vitro</i>	9
<i>in vivo</i>	15, 17-18, 22-25
Allergi Definition:	7-8
straks allergi (atopisk allergi)	8
forsinket allergi (T-lymfocyt-medieret allergi)	8, 10
Diagnose:	
elimination/provokation	7, 10, 32
priktest	9
<i>in vitro</i> IgE	9, 11
IgG	10
cytologiske	10
Hyppighed	8
Risikogruppe	9
Symptomer	8, 9, 21, 22, 32, 33
Anafylaktisk shock model	12, 13-25
Dosis-respons undersøgelser	15, 23
Evaluering	12, 14-15
Sensitivitet	16-17, 22
Validitet	22-26
Antigendeterminant	11
Atopisk allergi se type-I-hypersensitivitet	
Blokerende antistoffer	10
Chymosin	6
Diagnose se allergi	
ELISA	9, 11, 24, 32, 35
Epitop	11
Forsøgsdyrmodeller	12
Definition	1
High/low responder stammer:	
marsvin	36
mus	14, 36
rotter	36
Type-I-hypersensitivitet	
se anafylaktisk shock model	
se PCA-test	
Type-IV-hypersensitivitet	12
Validitet	12, 23, 24, 38
Gelfiltrering	31, 33
Granulocyter	8
Basofile	10
Eosinofile	21
Hamster	14
Histaminfrigørelsestest	10

	Side
Homogenisering	7, 17, 19, 23
Effekt på mælk allergenicitet.....	15, 18, 22-23, 25, 30-31, 37
Hypersensibilisering se sensibilisering	
Hypersensitivitet	
Type-I.....	8
Type-II.....	8
Type-III.....	8
Type-IV.....	8
Hæmagglutination-inhibitions-test.....	11
Immunelektroforese	9, 10, 24
Immunkomplekser	9
Immunogenicitet.....	10
Inhiberende peptider	
Anafylaktisk shock model.....	33, 38
Klinisk indikation.....	32, 38
PCA-test	32, 38
Intolerance (laktose).....	8
Kasein.....	5-6, 11, 23
Bovin.....	5, 6
alfa-	6
beta-	6
kappa	6
Human	6
Miceller.....	6
Koagel.....	5-6, 23
Chymosinfældet kasein.....	6
pI - syrefældet kasein.....	6
Ventriklen.....	20, 25
Kolloidkemiske model.....	24
Komplement	8
Komælksallergi - se Allergi	
Lymfocytter.....	8, 36
Lymfocyt-migration-inhibitions-test	10
Maillardreaktionsprodukter.....	7, 11
Makrofager	8
Marsvin	14, 16
Mastceller	8, 16, 21, 22
Moderermælkserstatning	
Homogeniseret.....	18-19, 25
Uhomogeniseret	18-19, 25
Hypoallergen:.....	32-35, 39
Alfare.....	34-36, 38-39
Nutramigen.....	32, 33-36, 38-39
Pregestimil.....	33, 38
Mucosa, atopiske reaktioner.....	21, 25
Mus	
Anvendte stammer: BALB/c.....	14-15, 20, 26
ico:MNRI.....	21
pan:THAI.....	21
Immunsystem.....	12
MHC.....	12
Mælk	
Enzymer.....	6
Sammensætning: bovin.....	5-7
human.....	5-7

	Side
Ovalbumin allergenicitet	
<i>In vitro</i>	11
<i>In vivo</i>	19, 22, 29, 37
Lipid-protein-komplekser.....	19, 24
Passiv kutan anafylaksi test (PCA)	
Dosis-respons-undersøgelser.....	26
Evaluering.....	28
Forsøgsdyr: marsvin.....	26
mus.....	28, 32-36
rotte.....	26
Homolog/heterolog PCA-test.....	38
Komælksproteiner.....	27-28, 29-30
Peptider.....	13, 26, 31, 34-35, 38
Sensitivitet.....	29, 36, 38
PCA-inhibitions test.....	13, 26, 38
Pasteurisering.....	7, 18
Peptider.....	11-12, 13
Hypoallergene.....	13, 31
Allergene.....	13, 31
Polyacrylamid-gelelektroforese (PAGE).....	20
Priktest.....	9
Præcipitin-inhibitions-test.....	11
RAST.....	9, 11, 24
Reagine antistoffer.....	27, 29, 37
IgE.....	27-29, 37
IgG.....	27-29, 37
RIA.....	20, 21
SDS-PAGE se polyacrylamid gelelektroforese	
Sensibilisering	
Forsøgsdyr: marsvin.....	15, 22, 27
mus.....	14, 17, 22, 27-28, 30, 34
rotte.....	14, 22, 27, 30
Oral sensibilisering.....	15, 17, 22, 27
Intraperitoneal sens.:	
klassisk metode.....	27, 28, 30
alternativ metode.....	15, 28, 30, 34, 36
Statistik (Fishers Eksakte Test).....	14
Tarmfordeling af mælkeproteiner.....	20-21
Tarmreaktioner: human.....	21, 22
mus.....	21, 22
rotte.....	20, 22
T-lymfocyt (suppressor).....	36
T-lymfocytmedieret allergi se Type-IV-hypersensitivitet	
Valleproteiner	
Bovine.....	6, 7
beta-lactoglobulin.....	7, 11
alfa-lactalbumin.....	7, 11
bovine serum albumin.....	7, 11
hydrolysater.....	31-32, 38
Humane.....	7
Varmestabilitet	
Kaseiner.....	6, 11, 13, 25-26
Valleproteiner.....	6, 7, 11, 13, 25-26