

Aus der Abteilung für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin  
(Leiter Univ. - Prof. Dr. Matthias Heckmann)  
der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin  
(Direktor: Univ.- Prof. Dr. Holger Lode)  
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

**Individualisierte Targetfortifizierung von Muttermilch: Optimierung des Nährstoffgehaltes  
in Fortifiern und Auswirkung verschiedener Poolingstrategien**

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin  
(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Universität Greifswald

2023

vorgelegt von:  
Stephanie Franziska Fusch  
geb. am: 17.08.1991  
in: Bern (CH)

Dekan: Prof. Dr. Karlhans Endlich

1. Gutachter: Prof. Dr. Matthias Heckmann

2. Gutachter: Prof. Dr. Christoph Härtel

Tag der Disputation: 12.03.2024

Ort, Raum: Universitätsmedizin Greifswald, in der Klinik für Frauenheilkunde und  
Geburtshilfe, Seminarraum N0.03

# Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis.....	5
II.	Tabellenverzeichnis.....	6
III.	Abbildungsverzeichnis.....	7
1.	Einleitung.....	8
1.1.	Bedeutung der Ernährung mit Muttermilch für termin- und frühgeborene Kinder.....	8
1.2.	Zusammensetzung von Muttermilch.....	8
1.1	Optimaler Makronährstoffgehalt der Muttermilch für Frühgeborene.....	9
1.3.	Fortifizierung von Muttermilch.....	10
1.4.	Bedeutung von adäquatem Wachstum und Body Composition.....	11
1.5.	Fragestellung.....	12
2.	Methoden.....	13
2.1.	Studiendesign und Studienpopulation.....	13
2.2.	Probensammlung.....	14
2.3.	Deskriptive Muttermilchanalyse.....	14
2.4.	Ziele der Makronährstoffkonzentration nach Targetfortifizierung.....	14
2.5.	Verwendete Pulverfortifier und Standardfortifizierung.....	15
2.6.	Frequenzen der Muttermilchanalysen bei Targetfortifizierung.....	17
2.7.	Durchführung der Targetfortifizierung.....	17
2.8.	Flüssigfortifier.....	17
2.8.1	Anwendung für angepasste Standardfortifizierung und Targetfortifizierung.....	17
2.8.2	Off-Label Anwendung.....	18
2.9.	Tatsächliche Makronährstoffaufnahme und Konsequenz für das Wachstum.....	18
2.10.	Analysen und Berechnungen mit nativer Muttermilch zur Optimierung der Makronährstoffzusammensetzung und Reduktion der Variation.....	20
2.11.	Makronährstoffoptimierung mit Gefriertrocknung.....	20
2.12.	Statistik.....	21
3.	Ergebnisse.....	21
3.1.	Ergebnisse der Muttermilchanalyse.....	21
3.2.	Fortifizierung.....	23
3.2.1.	Standardfortifizierung mit Fortifier #1 bis #7 und #11.....	23

3.2.2. Standardfortifizierung mit dem optimierten Standardfortifier #8, #9 und #10.....	24
3.2.3. Targetfortifizierung.....	24
3.3. Einfluss der Makronährstoffzufuhr auf die Wachstumsraten .....	27
3.4. Optimierung der Makronährstoffreduktion und Reduktion der Variation in nativer Muttermilch.....	28
3.5. Simulation einer Milchbank mit Pooling der nativen Muttermilchproben.....	28
3.6. Optimierung der Makronährstoffkonzentration durch Gefriertrocknung.....	28
4. Diskussion.....	29
5. Limitationen und Stärken.....	35
6. Schlussfolgerung.....	35
7. Zusammenfassung.....	36
8. Literaturverzeichnis.....	37
9. Anhang.....	43
9.1. Wissenschaftliche Arbeit.....	43
9.2. Tabellen.....	61
9.3. Abbildungen.....	65
10. Eidesstattliche Erklärung.....	69
11. Danksagung.....	70

## **I. Abkürzungsverzeichnis**

Abb	Abbildung
BW	Body weight (Geburtsgewicht)
EI	Energy intake (Energiezufuhr)
ESPGHAN	European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition
IQR	Interquartilabstand
KH	Kohlenhydrate
KH/NP-E	Verhältnis Kohlenhydrate- zu Nichtproteinenergie
Max	Maximum
Mean	Mittelwert
MF	Metabolischer Faktor (metabolic factor)
Min	Minimum
MM	Muttermilch
P:E	Verhältnis Protein-zu-Energie
PI	Protein intake (Proteinzufuhr)
PMW	postmenstruelle Wochen
Q <sub>0,1</sub>	10% Quantil
Q <sub>0,25</sub>	25% Quantil
Q <sub>0,75</sub>	75% Quantil
Q <sub>0,9</sub>	90% Quantil
RCT	randomisierte kontrollierte klinische Studie
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SF	Standardfortifier
SSW	Schwangerschaftswochen
Tab	Tabelle
TFO	Targetfortifizierung

## II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zuordnung der verwendeten Fortifier.....	61
Tabelle 2: Übersicht über die Zusammensetzung der Fortifier.....	16
Tabelle 3: Frequenzen der Muttermilchanalyse für die Targetfortifizierung.....	62
Tabelle 4: Ergebnisse der nativen Muttermilchanalyse.....	62
Tabelle 5: Inter- und intraindividuelle Variabilität der Zusammensetzung der Muttermilch.....	63
Tabelle 6: Optimierung der Muttermilch: Variation der Makronährstoffkonzentrationen und des Energiegehaltes .....	63
Tabelle 7: Optimierung der Muttermilch: Makronährstoffkonzentrationen und Energiegehalt.....	64
Tabelle 8: Makronährstoffkonzentrationen nach Lyophilisation.....	64

### **III. Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Ablauf der Standard- und Targetfortifizierung.....	65
Abbildung 2: Prinzip der Off-Label Anwendung des Flüssigfortifiers.....	66
Abbildung 3: Deskriptive Statistik.....	66
Abbildung 4: Makronährstoffkonzentrationen, Energiegehalt, P:E und KH/NP-E der nativen Muttermilch.....	22
Abbildung 5: Makronährstoffkonzentrationen, Energiegehalt, P:E und KH/NP-E der fortifizierten Muttermilch.....	26
Abbildung 6: Variation der Makronährstoffkonzentrationen, Energiegehalt, P:E und KH/NP-E der fortifizierten Muttermilch.....	67
Abbildung 7: Prozentualer Anteil der Proben, die zu adäquatem Wachstum führen.....	27
Abbildung 8: Optimierung der Muttermilch: Milchbankpooling.....	68

# **1 Einleitung**

## **1.1 Bedeutung der Ernährung mit Muttermilch für termin- und frühgeborene Kinder**

Für termingeborene Kinder stellt Muttermilch in den ersten Lebensmonaten die optimale Ernährung dar. Für diese Kinder sind dort in ausreichenden Mengen Protein, Fett und Kohlenhydrate enthalten, so dass ein adäquates Wachstum und eine altersentsprechende Entwicklung ermöglicht wird. In vielen Studien konnten die positiven Effekte der Ernährung mit Muttermilch gezeigt werden. So ist die Häufigkeit von Infektionen wie z.B. der Atemwege, Otitis media oder des Magen-Darm-Traktes reduziert [1-4]. Positive Effekte sind für verschiedene immunmodulatorische Proteine wie Zytokine, Immunglobuline und Wachstumsfaktoren beschrieben [5, 6]. Probiotische und positive immunmodulatorische Effekte werden den Oligosacchariden und den Mikroorganismen zugesprochen, die in der Muttermilch enthalten sind. Insgesamt ergibt sich dadurch ein immunstimulierender und immunmodulatorischer Effekt, der den kindlichen Organismus vor Infektionen schützt [5, 6]. Für Erkrankungen aus dem allergischen Formenkreis wie Asthma bronchiale oder atopische Dermatitis gibt es Hinweise, dass diese unter und auch nach Muttermilchernährung verringert auftreten [7]. Weiterhin werden andere Langzeiteffekte durch Muttermilchernährung beschrieben, so sinkt z.B. das Risiko für Übergewicht und Herz-Kreislaufkrankungen [8].

Für frühgeborene Kinder unter Ernährung mit Muttermilch konnten zu den bereits beschriebenen positiven Effekten noch weitere Vorteile gezeigt werden. Das Risiko für das vorzeitige Auftreten von Krankheiten des Erwachsenenalters wie kardiovaskuläre, neurologische und metabolische Erkrankungen sind verringert [9, 10]. Zudem wird die Wahrscheinlichkeit, an neonatalen Infektionen sowie an nekrotisierender Enterokolitis, einer sehr schweren, manchmal tödlich verlaufenden Darmerkrankung, zu erkranken, reduziert [11-13]. Im Vergleich zu Formula-Ernährung ist auch die neurologische Entwicklung unter Ernährung mit Muttermilch besser [14, 15]. In Zusammenschau der bisherigen Daten ist daher eine Ernährung mit Muttermilch auch für Frühgeborene anzustreben.

## **1.2 Zusammensetzung von Muttermilch**

Muttermilch enthält Makro- und Mikronährstoffe sowie immunmodulatorische Zusätze [5, 6]. Ihre Makronährstoffzusammensetzung variiert und hängt von Gestationsalter und Laktationsalter ab. Die Milch verändert sich physiologischerweise bereits kurz nach dem Laktationsbeginn über die kommenden Wochen. Auch zwischen Müttern frühgeborener und termingeborener Kinder gibt es Unterschiede beim Gehalt aller Makronährstoffe. Die größten Unterschiede gibt es beim Proteingehalt. Zu Beginn der Laktation ist der Proteingehalt der Muttermilch für frühgeborene Kinder



mit 2.7 ( $\pm 1.5$ ) g/100ml am höchsten und sinkt nach einer Woche auf 1.5 ( $\pm 0.4$ ) g/100ml, während bei termingeborenen Kindern der Proteingehalt 2.0 ( $\pm 0.9$ ) g/100ml beträgt und in der zweiten Woche auf 1.3 ( $\pm 0.2$ ) g/100ml sinkt. Ab der zehnten Woche liegt die Proteinkonzentration für beide Gruppen bei 1.0 g/100ml ( $\pm 0.2$  g bzw. 0.1 g/100ml für Frühgeborene bzw. für Termingeborene) [16]. Der Fettgehalt ist zu Beginn niedriger und steigt im Verlauf an. Die Milch der frühgeborenen Kinder enthält in den ersten Lebenstagen 2.2 ( $\pm 0.9$ ) g Fett /100ml und für termingeborene Kinder 1.8 ( $\pm 0.7$ ) g/100ml. Bereits ab der zweiten Lebenswoche steigt dieser auf durchschnittlich 3.5 ( $\pm 1.1$ ) g/100ml für frühgeborene und 3.0 ( $\pm 0.9$ ) g/100ml für termingeborene Kinder an. Die Fettkonzentration steigt in der zehnten Woche noch um weitere 0.2 bis 0.4 g/100ml (Früh- und Termingeborene) an [16]. Für Laktose wird ein Anstieg von den ersten Lebenstagen bis in die zweite Lebenswoche von 5.1 ( $\pm 0.7$ ) g/100ml auf 5.7 ( $\pm 0.8$ ) g/100ml für frühgeborene Kinder verzeichnet und beträgt ab der achten Woche 6.3 ( $\pm 0.4$ ) g/100ml. Im Vergleich dazu ist die Laktosekonzentration bei Termingeborenen zu Beginn um ca. 0.5 g/100ml höher, steigt ab der zweiten Woche auf 6.2 ( $\pm 0.6$ ) g/100ml an und stabilisiert sich ab der zehnten Woche auf 6.7 ( $\pm 0.7$ ) g/100ml [16]. Direkt abhängig von Protein, Fett und Laktose ändert sich auch der Energiegehalt.

Zusätzlich ist eine hohe Variabilität der Milchezusammensetzung zwischen den einzelnen Müttern (interindividuelle Variation) sowie zwischen den einzelnen Muttermilchproben der gleichen Mutter (intraindividuelle Variation) bekannt. Beschrieben sind hohe Spannweiten von 0.7 bis 10 g/100ml für Fett, von 0.7 bis 3.2 g/100ml für Protein und von 4 bis 8.8 g/100ml für Laktose sowie einem daraus resultierenden wechselnden Energiegehalt [17]. Neben der natürlichen Variation beeinflussen auch Faktoren wie Nikotinabusus, Alter und Body Mass Index der Mutter die Zusammensetzung der Muttermilch [18]. Die beschriebene Veränderung der Muttermilch über die Laktationszeit, das Gestationsalter sowie die hohe und unvorhersagbare Variation der individuellen Muttermilch verdeutlichen die Schwierigkeit einer bilanzierten Ernährung durch Muttermilch für diese Kinder, die eine definierte Zufuhr gemäß internationaler Empfehlungen benötigen. Außerdem enthält Muttermilch Mikronährstoffe wie Vitamine und Mineralien, auf die in dieser Arbeit aber nicht weiter eingegangen wird.

### **1.3 Optimaler Makronährstoffgehalt der Muttermilch für Frühgeborene**

Die European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) empfiehlt in der 2010 veröffentlichten Guideline für die enterale Ernährung von Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht <1800g eine Flüssigkeitszufuhr von 135 bis 200 ml/kg/d und eine Energiezufuhr von 110 bis 135 kcal/kg/d. Die empfohlene Zufuhr der Makronährstoffe beträgt

4.8 bis 6.6 g/kg/d für Fett und 11.6 bis 13.2 g/kg/d für Kohlenhydrate. Bezüglich der Proteinzufuhr werden 4.0 bis 4.5 g/kg/d für Kinder <1000g und 3.5 bis 4.0 g/kg/d für Kinder >1000 g empfohlen [19]. Damit müsste eine für die Ernährung von Frühgeborenen geeignete Muttermilch im Mittel 3 g Protein, 4,4 g Fett und 8,8 g Kohlenhydrate pro 100 ml enthalten.

Diese ESPGHAN Guidelines sind im Jahr 2022 überarbeitet und in einigen Punkten leicht modifiziert worden. Da die Fassung von 2010 zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Studie gültig war, wird diese auch in dieser Abhandlung verwendet. Die neuen Guidelines sind unverändert für die unteren Grenzen der Makronährstoffeinträge, empfehlen sogar noch höhere Einträge an Fett (4.8 bis 8.1 g/kg/d) und Kohlenhydraten (11 bis 15 g/kg/d) [20]. Die Modifikationen ändern an der Grundaussage und Aktualität der Studie nichts.

#### **1.4 Fortifizierung von Muttermilch**

Um im klinischen Alltag die empfohlene Makronährstoffzufuhr für Frühgeborene <1800 g zu erreichen, wird Muttermilch fortifiziert [21]. Dabei gibt es unterschiedliche Vorgehensweisen, diese durchzuführen.

Für die Standardfortifizierung werden Durchschnittswerte für die Makronährstoffkonzentrationen von Muttermilch angenommen. Um das Defizit zu den ESPGHAN-Empfehlungen auszugleichen, wird der Muttermilch eine empfohlene Menge eines Standardfortifiers mit einer definierten Menge an Makronährstoffen hinzugefügt. Dies geschieht, ohne die genaue Zusammensetzung der jeweiligen Milch zu kennen. Aufgrund der hohen intra- und interindividuellen Variation der Muttermilch führt dies zwangsläufig zu einer schwankenden Nährstoffzufuhr, die im Einzelfall auch unzureichend sein kann [17, 22, 23]. Dies kann zu einem unzureichenden Wachstum führen. Der Effekt der insuffizienten Ernährung auf das Wachstum wird im klinischen Alltag jedoch erst mit einer Verzögerung von mehreren Tagen bemerkt, so dass die Ernährung ebenfalls nur mit Verzögerung angepasst werden kann.

Die adjustierte Fortifizierung ist eine Methode, in der zur Muttermilch ein Standardfortifier hinzugegeben wird und als weiterer Parameter über die Messung der Harnstoffkonzentration im Serum auf die Quantität der Proteinzufuhr geschlossen wird. Anhand des Ergebnisses wird die Menge eines proteinhaltigen Produktes stufenweise modifiziert und zur standardfortifizierten Muttermilch hinzugegeben und so die Proteinzufuhr angepasst. Bei dieser Methode wird lediglich die Proteinzufuhr betrachtet. Da die Harnstoffkonzentration auf Änderungen der Proteinzufuhr aber verzögert reagiert, kann ebenfalls nur mit einer Verzögerung auf eine inadäquate Nährstoffzufuhr reagiert werden, die gegebenenfalls zuvor schon zu einem unzureichenden Wachstum geführt hat [21, 24].

Eine weitere Methode ist die Targetfortifizierung. Hier wird der aktuelle Gehalt der Makronährstoffe in der nativen Muttermilch zuerst gemessen und der Gehalt berechnet, der nach Standardfortifizierung erzielt wird. Anschließend werden individuell und gezielt zusätzlich die Makronährstoffe hinzugefügt, um die Zielwerte laut ESPGHAN zu erreichen. Diese Methode erlaubt eine personalisierte und präzise Ernährung nach den aktuellen Empfehlungen. Es ist jedoch auch die bisher zeitaufwändigste Methode [25-27]. Zudem können durch den Standardfortifier bereits überfortifizierte Makronährstoffe nicht reduziert werden (Abb. 1).

### **1.5 Bedeutung von adäquatem Wachstum und Body Composition**

Gesunde termingeborene Kinder haben postnatal einen Gewichtsverlust von fünf bis zehn Prozent ihres Geburtsgewichtes. Unter normalen Umständen wachsen sie nach adäquatem initialen Gewichtsverlust auf ihrer Perzentile weiter [28, 29]. Dabei nimmt ihr Gewicht täglich ca. 8 bis 10 g/kg/d, entsprechend etwa 25 bis 30 g pro Tag, zu [30, 35]. Frühgeborene Kinder können postnatal bis 15 % ihres Gewichtes verlieren und sollten wie das in utero verbliebene Termingeborene so weiterwachsen, dass sie idealerweise dessen Perzentile mit 44 bis 48 PMW erreichen [28, 30, 31]. Es ist bekannt, dass Frühgeborene dieses „perzentilengerechte“ Wachstum häufig nicht erreichen und 43 bis 97 % der Frühgeborenen unter postnataler Wachstumsretardierung leiden [32, 33].

Wenn Kinder zu früh auf die Welt kommen, sind je nach Gestationsalter die Organe noch unterschiedlich unreif und es bedarf der adäquaten Nährstoffzufuhr, um das weitere Organwachstum extrauterin fortführen zu können. Idealerweise gleicht das postnatale Wachstum der Frühgeborenen dem intrauterinen. Die postnatale Wachstumsrate bei gleichem postkonzeptionellen Alter scheint unabhängig vom Gestationsalter bei Geburt, Geschlecht und ethnischer Herkunft zu sein [34]. Studien ergaben, dass frühgeborene Kinder im Vergleich zum gleichen Gestationsalter des Fetus ähnliche Wachstumsraten zwischen der 32. und 36. Schwangerschaftswoche (SSW) erreichen und zwischen der 36. und 42. SSW ein Aufholwachstum zeigen. Weiterhin zeigen die Wachstumsraten unabhängig vom Gestationsalter des frühgeborenen Kindes einen ähnlichen Verlauf, das heißt, es besteht kein Unterschied, ob ein Kind in der 24. oder 30. SSW geboren ist, ihre postnatalen Wachstumskurven sollte ähnlich sein [28, 30]. Allerdings verändern sich die Wachstumsraten abhängig vom Gestationsalter: Untersuchungen ergaben, dass die Wachstumsraten von der 24. bis 33. SSW von 30 bis auf 15 g/kg/d sinken. Ab der 34. SSW sind Wachstumsraten von 15 bis 10 g/kg/d beschrieben worden [30, 35].

In Studien war die neurologische Entwicklung mit dem Wachstum korreliert. Höhere Wachstumsraten (21.2 g/kg/d) waren im Vergleich zu niedrigeren (12.0 g/kg/d) mit besserer psychomotorischer Entwicklung und weniger Zerebralparese korreliert [36].

Neben dem Wachstum (bisher als Gewichtszunahme in g/kg/d definiert) ist auch die Qualität der Gewichtszunahme, dass heißt die Körperzusammensetzung (Fettmasse und fettfreie Masse) relevant. Die fettfreie Masse ist ein Indikator für das Wachstum der Organe sowie Wachstum der Knochen und Muskeln und reflektiert die Qualität der Proteinsynthese [37].

Der Anteil der Fettmasse beträgt bei Termingeborenen ca. 24 % des Gewichts und der Anteil der fettfreien Masse ca. 4450 g (50. Perzentile) im Alter von 52 postmenstruellen Wochen (PMW). Die Frühgeborenen haben mit 40 PMW einen höheren Anteil Fettmasse und geringeren Anteil fettfreier Masse, im Alter von 60 PMW gibt es keinen Unterschied mehr zwischen beiden Gruppen [38]. Untersuchungen konnten zeigen, dass das Verhältnis von Protein zu Energie und das Verhältnis von Energie aus Kohlenhydraten zu Nicht-Protein-Energie einen Einfluss auf das Wachstum und die Körperzusammensetzung (body composition) haben. So führen eine höhere Proteinzufuhr und ein adäquates Verhältnis von Protein zu Energie zu einer höheren fettfreien Masse [39, 40]. Daraus schlussfolgernd ist eine bilanzierte Ernährung wichtig, um die optimale body composition zu erreichen. Bezüglich der längerfristigen Wirkungen führt eine höhere Menge an fettfreier Masse zu besserem Gehirnwachstum und dieses wiederum zu einer besseren kognitiven und motorischen Entwicklung [41- 43]. Es wurde jedoch auch beobachtet, dass ein schnelles (Aufhol-)Wachstum bei Frühgeborenen, die aufgrund inadäquater Nahrungszufuhr zunächst eine postnatale Wachstumsretardierung erfahren haben, mit einem erhöhten Risiko für Übergewicht und metabolischen Folgeerkrankungen im Schulkind- und Erwachsenenalter assoziiert ist [44- 46]. In Zusammenschau der wissenschaftlichen Erkenntnisse ist nach vollendeter postnataler Adaptation das Erreichen von adäquaten postnatalen Wachstumsraten mit einer optimalen Body Composition erstrebenswert [30, 31].

## **1.6 Fragestellung**

Es gibt viele wissenschaftliche Belege über die Wichtigkeit der Ernährung mit Muttermilch sowie die Bedeutung der ausreichenden Zufuhr der Makronährstoffe und des Energiegehaltes zum Erreichen des gewünschten Wachstums der Frühgeborenen Kinder <1500 g. Daher beschäftigt sich die Arbeit mit mehreren Fragestellungen, wie diese Ziele erreicht werden können.

Es wird zunächst die Zusammensetzung der nativen Muttermilch in Bezug auf die Makronährstoffe und den Energiegehalt dargestellt. Darauf aufbauend wird der Einfluss von Standard- bzw. Targetfortifizierung auf den Gehalt der Makronährstoffe gezeigt. Dabei werden verschiedene Standardprodukte eingesetzt, die kommerziell erworben werden können. Mit dem Hintergrund der hohen intraindividuellen Variabilität wird der Einfluss der Häufigkeit der Muttermilchanalysen pro Woche auf die Effektivität der Fortifizierung untersucht.

Anhand der vorherigen Ergebnisse wird die Zusammensetzung eines optimalen Standardfortifiers für Fett, Protein und Laktose ermittelt, der für drei verschiedene Szenarien der Standard- bzw. Targetfortifizierung im klinischen Alltag anwendbar ist. Der Effekt der Fortifizierung auf das Wachstum des Frühgeborenen wird anhand einer Modellberechnung dargestellt.

Abschließend werden verschiedene Methoden zur Behandlung der nativen Muttermilch gezeigt, um einerseits die Variation zu verringern und andererseits eine Erhöhung der Makronährstoffkonzentration zu erreichen. Es werden Berechnungen erläutert, die auch den Ansatz zur Lyophilisation der Muttermilch beinhaltet. Ziel aller Analysen und Darstellungen ist es, für frühgeborene Kinder eine bestmögliche Makronährstoffzufuhr mit Muttermilch zu erreichen.

## **2 Methoden**

### **2.1 Studiendesign und Studienpopulation**

Diese modellierende Studie ist die Re-Analyse einer randomisierten kontrollierten klinischen Studie (RCT), die von November 2012 bis Juli 2016 auf der neonatologischen Intensivstation (Level III NICU) des McMaster Children's Hospitals (Hamilton, Ontario, Kanada) durchgeführt wurde [26]. In die Studie wurden Kinder mit einem Gestationsalter von <30 SSW eingeschlossen, die mit fortifizierter Frauenmilch ernährt wurden und bei einer enteralen Nahrungszufuhr von 100 ml/kg/d noch eine Aufenthaltsdauer auf der Intensivstation von voraussichtlich mehr als 21 Tagen hatten. Die Randomisierung wurde für das Schwangerschaftsalter stratifiziert (<28 SSW und ≥28 SSW). Das betreuende medizinische Personal und die Eltern, nicht aber das Personal der Milchküche waren verblindet. Für jedes Kind wurde daher die Nahrung für den Kontroll- sowie für den Interventionsfall verordnet.

Exklusionskriterien waren gastrointestinale Malformationen, kongenitale Anomalien, nekrotisierende Enterokolitis, chirurgische abdominelle Intervention oder eine gramnegative Sepsis. Das schriftliche Einverständnis der Eltern lag vor, ebenso die Genehmigung der zuständigen Ethikkommission.

In dieser Arbeit wurden Daten von 103 frühgeborenen Kindern <1500 g (Very Low Birthweight) eingeschlossen. In der gesamten Studienpopulation betrug das mittlere Gestationsalter  $27.0 \pm 1.5$  SSW bei einem Geburtsgewicht von  $980 \pm 240$  g, einem Kopfumfang bei Geburt  $25.1 \pm 2.7$  cm und einer Körperlänge bei Geburt  $34.7 \pm 3.3$  cm. Die Fortifizierung wurde in der Regel am  $21. \pm 6$  Lebenstag ab einer enteralen Menge von 150 ml/kg/d begonnen und für  $33$  Tage  $\pm 10$  Tage

fortgesetzt. Jeder Studienteilnehmer war für mindestens 14 aufeinanderfolgende Tage in die Studie eingeschlossen [26].

## 2.2 Probensammlung

Native Muttermilch wurde über je 24 Stunden gepoolt, woraus zum Schluss eine repräsentative Probe für die Messung der Makronährstoffkonzentrationen entnommen wurde. Bei nicht ausreichenden Tagesmengen von Milch der eigenen Mutter wurde mit pasteurisierter Frauenspendermilch ergänzt. Vor der Analyse wurden die Proben über 15 Sekunden homogenisiert (VCX130; Chemical Instruments AB, Sollentuna, Schweden). Fett- und Proteingehalt wurden mit einem Infrared Milk Analyzer (Spectrastar; Unity Scientific, Brookfield, Connecticut, US) gemessen [47, 48]. Der Laktosegehalt wurde mit einem Massenspektrometer gemessen (UPLC-MS/MS) [49]. Alle Methoden waren in vorherigen Studien untersucht und validiert worden [47- 49].

## 2.3 Deskriptive Muttermilchanalyse

Der Energiegehalt in kcal/100 ml wurde mittels Atwater-Faktoren (Protein und Kohlenhydrate je 4, Fett 9 kcal/g) berechnet. Das Verhältnis von Protein zu Energie (P:E Ratio) in g Protein/100 kcal sowie von Kohlenhydratenergie-zu-Nichtproteinenergie (KH/NP-E) in % wurde anhand der unten stehenden Formeln errechnet (Formel 1 und 2) [50, 51].

$$\text{Ratio Protein – zu – Energie (g/kcal)} = \frac{\text{Protein (g)}}{\text{Energie (100 kcal)}} \quad (1)$$

$$\text{Ratio Kohlenhydratenergie – zu – Nichtproteinenergie (\%)} = \frac{4 \cdot \text{KH (g/100ml)}}{(4 \cdot \text{KH (g/100ml)} + 9 \cdot \text{Fett (g/100ml)})} \cdot 100 \quad (2)$$

Diese Berechnungen erfolgten für die native Muttermilch und die einzelnen Schritte der Standard- bzw. Targetfortifizierung.

## 2.4 Ziele der Makronährstoffkonzentration nach Targetfortifizierung

Die European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) empfiehlt einen Makronährstoffeintrag für Frühgeborene <1000g von bis zu 3.0 g/100ml (4.5 g/150ml) Protein, 4.4 g/100ml (6.6 g/150ml) Fett und 8.8 g/100ml (13.2 g/150ml) Kohlenhydrate mit einer Gesamtflüssigkeitszufuhr von 150 ml/kg/d [19]. Das ergibt einen Energiegehalt von 87 kcal/100ml (130 kcal/150ml), ein Verhältnis Protein-zu-Energie von 3.5 g/100kcal und Kohlenhydrat-zu-Nichtproteinenergie von 47 %.

## **2.5 Verwendete Pulverfortifier und Standardfortifizierung**

Insgesamt wurden vierzehn verschiedene Fortifizierer verwendet (Tab. 1 und 2). Davon sind sechs Standardfortifier in Pulverform kommerziell erhältlich (#1 bis #4, #6 und #7) sowie ein weiterer (#5), der zum Zeitpunkt dieser Studie noch nicht kommerziell erhältlich war. Zusätzlich wurden hypothetische Fortifier (# 8 bis #10) in Pulverform untersucht und ein kommerziell erhältlicher Flüssigfortifier (#11a bis d), der mit vier definierten Mengen der Muttermilch beigemischt wurde, sowie daraus eine Off-Label Anwendung (#12) mit kontinuierlicher Steigerung.

Der Proteingehalt aller Pulverfortifier (#1 bis #7) ist ähnlich und liegt zwischen 1 und 1.5 g/100ml. Sie können jedoch anhand der Zusammensetzung des Nicht-Protein-Energiegehaltes in drei verschiedene Gruppen unterteilt werden: es gibt eine Gruppe mit wenig Fett-, aber hohem Kohlenhydratgehalt (#1 und #2), mit mittlerem Fett- und mittlerem Kohlenhydratgehalt (#3 bis #5) und hohem Fett- und niedrigem Kohlenhydratgehalt (#6 und #7). Der durch Pulverfortifier bewirkte Fetteintrag beträgt zwischen 0 bis 1 g/100ml und der Kohlenhydrateintrag zwischen 0.01 bis 3.3 g/100ml. Der Energieeintrag beträgt zwischen 13 bis 17 kcal/100ml. Für die Standardfortifizierung wurde die von den Herstellern empfohlene Menge des Fortifiers zu 100 ml Muttermilch hinzugefügt.

Der nächste Schritt hatte zum Ziel, die optimalen Makronährstoffgehalte der Pulverstandardfortifier (#8 bis #10) zu ermitteln, die die maximale Anzahl der vorhandenen Muttermilchproben in den Bereich der ESPGHAN-Werte bringt, bei einem Minimum an Überfortifizierung. Unter Berücksichtigung der hohen intra- und interindividuellen Variabilität der Muttermilch wurde der optimierte Standardfortifier, basierend auf drei verschiedenen Annahmen, ermittelt.

Die erste Variante (#8) nahm eine durchschnittliche Zusammensetzung der vorhandenen Milchproben an - ohne Muttermilchanalyse. In der zweiten Variante (#9) wurde die Nährstoffanalyse einmal pro Woche durchgeführt. Auf Basis der Messwerte wurde die Differenz der Makronährstoffkonzentration zur Zielkonzentration ermittelt und die Zusammensetzung des optimalen Standardfortifiers berechnet, ohne dass Proben überfortifiziert wurden. Für die dritte Variante (#10) wurde anhand von drei Analysen pro Woche wie zuvor beschrieben verfahren. Jede der drei Varianten des optimierten Standardfortifiers wurde zu 100 ml Muttermilch hinzugefügt.

**Tabelle 2:** Übersicht über die Zusammensetzung der Standardfortifier. Angegeben ist die Menge an Makronährstoffen, die zu 100ml Muttermilch hinzugefügt wurden, \*g pro Portion, \$ kcal pro Portion, (FF-Flüssigfortifizierer, MM – Muttermilch, KH-Kohlenhydrate)

Unterteilung der Fortifier	Standard Pulverfortifier							Flüssigfortifier						
	Wenig Fett/ hohe-KH	Mittlerer Fett/ mittlerer-KH	Hoher Fett/ wenig-KH	Optimierter Standardfortifier	11a	11b	11c	11d						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11a	11b	11c	11d
<b>Ratio FF : MM (ml:ml)</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20:80	30:70	40:60	50:50
<b>Fett (g/100ml)</b>	0	0.02	0.72	0.36	0.7	0.7	1	0.77	0	0	1.8*	2.7*	3.6*	4.5*
<b>Protein (g/100ml)</b>	1.1	1	1.4	1	1.3	1.5	1.1	1.85	1.54	1.26	1.2*	1.8*	2.4*	3*
<b>Kohlenhydrate (g/100ml)</b>	2.7	3.3	1.3	1.8	1.5	0.01	0.4	2.13	0.99	0.45	1.8*	2.8*	3.6*	4.6*
<b>Energie (kcal/100ml)</b>	15	18	17	14	17	13	14	23	10	7	28\$	42\$	56\$	71\$



## **2.6 Frequenzen der Muttermilchanalysen bei Targetfortifizierung**

Um die Qualität der Fortifizierung in Abhängigkeit von der Häufigkeit der Muttermilchanalysen zu untersuchen, wurden für alle Fortifier (#1 bis #11d) je sechs Szenarien simuliert. Im ersten Szenario wurde keine Messung durchgeführt, dies entspricht also der normalen Standardfortifizierung. Für die Targetfortifizierung wurden fünf Szenarien simuliert (Szenarien #2 bis #6, siehe Tab. 3). Im einfachsten Fall fand nur eine Analyse pro Woche statt (Szenario # 2, montags). Für das dritte, vierte und fünfte Szenario wurden zwei, drei bzw. fünf Analysen pro Woche (montags, donnerstags; montags, mittwochs und freitags; werktags) durchgeführt. Das letzte Szenario führte die Analysen täglich durch. Für die ersten vier Szenarien galt, dass die Targetfortifizierung an Tagen ohne Messung anhand der Ergebnisse der letzten Messung berechnet wurde.

## **2.7 Durchführung der Targetfortifizierung**

Zur Targetfortifizierung wurde in den gepoolten 24h-Proben in einem ersten Schritt die Makronährstoffkonzentrationen mit den oben genannten Methoden gemessen. Energie, Verhältnis von Protein-zu-Energie und von Kohlenhydrat-zu-Nichtproteinergie wurden berechnet. Im zweiten Schritt wurde die Standardfortifizierung mit den Pulverfortifiern (#1 bis #10) durchgeführt. Im dritten Schritt wurde anhand der Milchanalysen die nach Standardfortifizierung vorliegende Makronährstoffkonzentration definiert und die Differenz zur Zielkonzentration (Fett 4.4 g/ml, Protein 3.0 g/100ml, Kohlenhydrate 8.8 g/100ml) ermittelt. Anschließend wurden die noch fehlenden Makronährstoffe durch kommerziell erhältliche Modularprodukte für Fett, Protein und Laktose je nach Bedarf einzeln hinzugefügt (Abb. 1). Diese Methode passte lediglich Proben mit zu niedrigem Nährstoffgehalt nach Standardfortifizierung an die Zielkonzentrationen an. Zu hohe Makronährstoffkonzentrationen, die bereits in der nativen Muttermilch oder nach Standardfortifizierung vorlagen, konnten nicht verringert werden.

## **2.8 Flüssigfortifier**

### **2.8.1 Anwendung für angepasste Standardfortifizierung und Targetfortifizierung**

Zusätzlich zu den in Pulverform verfügbaren bovinen Fortifiern gibt es einen kommerziell erhältlichen flüssigen Fortifier auf Frauenmilchbasis (#11 a bis d). Während die Pulverfortifier direkt der Muttermilch hinzugegeben werden, wird durch diesen Flüssigfortifier ein definiertes Volumen der Muttermilch ersetzt (Tab. 2). So sind in 20 ml Flüssigfortifier 1.8 g Fett, 1.2 g Protein und 1.8 g Kohlenhydrate mit 28 kcal enthalten. Es gibt vier verschiedene, verfügbare Produkte, die jeweils die gleichen Makro-, aber unterschiedliche Mikronährstoffkonzentrationen aufweisen. Die höheren Makronährstoffeinträge wurden durch ein in 10ml Schritten ansteigendes Volumen des Fortifiers

erreicht. Das Verhältnis von Flüssigfortifier in ml zu Muttermilch in ml betrug 20:80 (#11a), 30:70 (#11b), 40:60 (#11c) und 50:50 (#11d). Dadurch erhöhte sich je Fortifizierungsstärke die Zufuhr um 0.6 g Protein, 0.9 g Fett und 1.0 g Kohlenhydrate pro 100 ml fortifizierter Milch (Tab. 2). Die Fortifizierung orientierte sich an der zu erzielenden Proteinkonzentration. Dabei wurde der Proteingehalt der Muttermilch von 1.2 g/100ml angenommen. Um den Zielwert von 3.0 g/100ml Protein zu erreichen, wurde daher Fortifier #11b mit 1.8 g/100ml Protein als Standardfortifier gewählt. Die Menge an hinzugefügtem Fett betrug 1.8 g/100ml und 1.8 g/100ml Kohlenhydrate. Für die angepasste Standardfortifizierung wurden abhängig vom Proteingehalt der nativen Muttermilch das adäquate Produkt aus den Fortifiern #11a bis #11d gewählt, damit eine Proteinzielkonzentration von 2.8 bis 3.4 g/100ml erreicht wurde. Anschließend wurde wie bei den Pulverfortifiern die fehlenden Mengen Fett und Kohlenhydrate mit Modularprodukten hinzugefügt, um die Zielkonzentrationen für Fett von 4.4 g und für Kohlenhydrate von 8.8 g/100ml zu erreichen [19].

### **2.8.2 Off-Label Anwendung**

Für die Off-Label Anwendung „Targetfortifizierung“ des flüssigen Fortifiers (#12) wurden nun kontinuierlich ansteigende Mischungsverhältnisse der erwähnten Flüssigfortifierstufen zugelassen. Nach der Muttermilchanalyse wurden die Flüssigfortifier #11a bis #11d in ihren vier verschiedenen Stärken so gewählt, dass der Zielproteinwert von 3.0 g/100ml erreicht wurde (Tab. 2, Abb. 2). Dabei wurde stets eine Stärke des Fortifiers als Basis gewählt und die nächstgrößere Stärke als Ergänzung. Zur Fortifizierung von Muttermilch mit einer nativen Proteinkonzentration von  $\geq 1.8$  g/100ml wurde Fortifier 11a genommen und 20 ml davon zu 80 ml Muttermilch hinzugefügt. Für Muttermilchproben mit einer nativen Proteinkonzentration von  $\geq 1.2$  bis 1.8 g/100ml bildete 11a die Basis und 11b wurde im Verhältnis so hinzugefügt, dass die Zielproteinwerte erreicht wurden. Dies entsprach einem Volumenverhältnis 11a:11b von 2:3 bzw. 20 ml 11a wurde durch 15 ml 11b ersetzt. Bei einem Proteingehalt der Muttermilch von  $\geq 0.6$  bis  $< 1.2$  g/100ml wurde 11b als Basis gewählt und 11c in einem Verhältnis von 3:4 hinzugefügt. Für Muttermilch mit einer Proteinkonzentration von 0 bis  $< 0.6$  g/100ml wurde 11c als Basis bestimmt und 11d in einem Verhältnis von 4:5 ersetzt (Abb. 2). Anschließend wurden Fett und Kohlenhydrate zum Erreichen der Empfehlungen noch hinzugefügt.

### **2.9 Tatsächliche Makronährstoffaufnahme und Konsequenz für das Wachstum**

Die Standardfortifizierung führt wegen der hohen intra- und interindividuellen Variation der Muttermilch häufig zu insuffizient- oder überfortifizierten Milchen. Um zu untersuchen, wie sich diese „Fehl“-Fortifizierungen auf das Wachstum auswirken, wurden die Arbeiten von Kashyap et al.

herangezogen, in denen u.a. der Einfluss des Verhältnisses der Fett- zu Kohlenhydratkalorien berücksichtigt wurde [50- 52].

Die folgende Formel (3) beschreibt das Wachstum [g/kg/d] in Abhängigkeit von Energie- (EI, entsprechend Fett und Kohlenhydrate) [kcal/kg/d] und Proteinzufuhr (PI) [g/kg/d] [52]. Die Gewichtszunahme wurde außerdem umgekehrt proportional vom Geburtsgewicht (BW) moduliert. Für unsere Berechnungen wurde ein Geburtsgewicht von 1000 g gewählt.

$$\text{weight gain velocity} = 0.095 \cdot \text{energy intake} + 3.6 \cdot \text{protein intake} - 0.00468 \cdot \text{BW} + 1.699 \quad (3)$$

Weitere Untersuchungen von Kashyap et al. zeigten, dass die Zusammensetzung der Nichtproteinenergie das Wachstum in seiner Geschwindigkeit und body composition moduliert. Bei gleicher Protein- und Gesamtenergiezufuhr führte ein höherer Anteil an Kohlenhydratenergie zu Fettenergie zu mehr Wachstum, einem höheren Anteil fettfreier Masse und somit zu einer vorteilhafteren body composition [50, 51]. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde ein metabolischer Faktor (MF) für die Wachstumsberechnung definiert und in Formel (4) beschrieben [50, 51].

$$\text{MF} = 0.7757 + \left(0.47 \cdot \frac{\text{KH-Energie}}{\text{Nicht-Protein Energie}}\right) \quad (4)$$

Unter Berücksichtigung dieses metabolischen Faktors ergab sich Formel 5.

$$\text{Target weight gain velocity} = (0.095 \cdot \text{EI} + 3.6 \cdot \text{PI} - 0.00468 \cdot \text{BW} + 1.699) \cdot \left(0.7757 + \left(0.47 \cdot \frac{\text{KH-Energie}}{\text{Nicht-Protein Energie}}\right)\right) \quad (5)$$

Für die Analyse wurden nun für die verschiedenen Fortifierprodukte und Fortifizierungsstrategien die nach Formel (5) erzielten Wachstumsraten aufgrund der tatsächlich zugeführten Nahrungsmengen berechnet und gegen das „Zielwachstum“ bei einer „Zielzufuhr“ laut ESPGHAN-Empfehlungen verglichen [19].

Bei einem Geburtsgewicht von 1000 g führten ESPGHAN Zielwerte von 4.5 g Protein, 6.6 g Fett und 13.2 g Kohlenhydrate pro kg und Tag rechnerisch zu einem Wachstum von 25.5 g/kg/d. Für ein adäquates Wachstum wurde ein Toleranzbereich von  $\pm 1$  g/kg/d definiert. Wachstumsraten oberhalb oder unterhalb davon galten als insuffizient.

Die Flüssigfortifier wurden aufgrund bisher fehlender Erfahrungen mit dem deutlich höheren Fettgehalt von der folgenden Analyse ausgenommen. Fett auf Muttermilchbasis scheint positive Effekte zu haben, die jedoch in dieser Analyse nicht berücksichtigt wurden [53].

## **2.10 Analysen und Berechnungen mit nativer Muttermilch zur Optimierung der Makronährstoffzusammensetzung und Reduktion der Variation**

Im Folgenden wurden weitere theoretische Analysen durchgeführt, um zu untersuchen, ob die Variation der Muttermilch durch drei verschiedene Poolingstrategien reduziert werden kann. Dafür wurden virtuelle Sets aus sechs bzw. acht aufeinanderfolgenden Spenderportionen von Milch einer Mutter gewählt. Die analysierten Proben wurden jeweils nach Fett-, Protein-, Laktose- und Energiegehalt aufsteigend sortiert.

Im ersten Modell wurden die beiden Muttermilchproben mit dem höchsten und niedrigsten, zweithöchsten und zweitniedrigsten Makronährstoff-/ Energiegehalt und so weiter fortlaufend gemischt und dann wieder in zwei Proben mit dem gleichen Volumen aufgeteilt. Im zweiten Modell wurden jeweils die drei Muttermilchproben mit dem höchsten Makronährstoff-/ Energiegehalt gemischt und dann wieder in drei Proben mit dem gleichen Volumen aufgeteilt. Die Makronährstoffkonzentration bzw. der Energiegehalt der entstandenen Proben wurde berechnet. Die dritte Analyse schloss nun alle vorhandenen Proben ein und die Anzahl der zu poolenden Muttermilchproben wurde bestimmt, ab der die Variation der Makronährstoffe signifikant reduziert wurde. Als signifikant galt, wenn in einer Probenmenge gepoolter Muttermilch die Makronährstoffkonzentration weniger als zehn Prozent Variation aufwies. Aus dem Datenset von 3338 Proben wurden in Fünferschritten, beginnend mit  $n=1$  bis  $n=1000$ , zufällig Proben entnommen. Diese wurden zu einer gesamten Probe gemischt, und die resultierenden Gehalte berechnet. Die zuvor gezogenen Proben wurden anschließend wieder in den Probenstock zurückgegeben, und die Prozedur wurde für die gleiche Probenanzahl insgesamt 1000mal durchgeführt. Aus der erhaltenen Verteilung wurden Mittelwert (mean) und Standardabweichungen (SD) für jeden Schritt berechnet. Dann wurde dieser Algorithmus für den nächsten Fünferschritt durchgeführt, so dass am Ende gut definierte Schätzwerte pro Fünferschritt zur Verfügung standen, innerhalb derer sich die durch Pooling erzielten Nährstoffgehalte bewegen werden.

## **2.11 Makronährstoffoptimierung mit Gefriertrocknung**

Diese Modellrechnung untersuchte, ob durch partielle Gefriertrocknung von Muttermilch die Konzentration der Makronährstoffe erhöht werden kann. Dazu wurde in vier Ansätzen jeweils ein Hauptmakronährstoff (entweder Fett, Protein oder Kohlenhydrate) oder der Energiegehalt als Referenzgröße festgelegt, auf den optimiert werden soll. Ausgehend von den gemessenen Konzentrationen wurde der Faktor berechnet, um die Zielkonzentration (für Fett 6.6g/150ml bzw. Protein 4.5g/150ml, Kohlenhydrate 13.2g/150ml, Energie 135kcal/150ml) zu erreichen.

Dieser Faktor entspricht dem Lyophilisationsfaktor (Trocknungsfaktor). Anhand dessen wurden die Konzentrationen der übrigen Makronährstoffe bzw. der Energiegehalt berechnet.

## **2.12 Statistik**

Die deskriptive Statistik für die Makronährstoffkonzentrationen sowie das Vorgehen der Targetfortifizierung wurde mit der R Version 3.5.3 (2019-03-11, R Development Core Team 2019) ermittelt. Zur intraindividuellen Analyse wurden Mittelwert, Median, Standardabweichung, Interquartilbereich (IQR), Quantilabstand ( $Q_{0.1}$ -  $Q_{0.9}$ ) der Proben jeder Mutter (n=103) berechnet und in Boxplots dargestellt (Abb. 3). Für die interindividuelle Analyse wurden daraus der Median und die Streuung bestimmt und Boxplots erstellt.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Ergebnisse der Muttermilchanalyse**

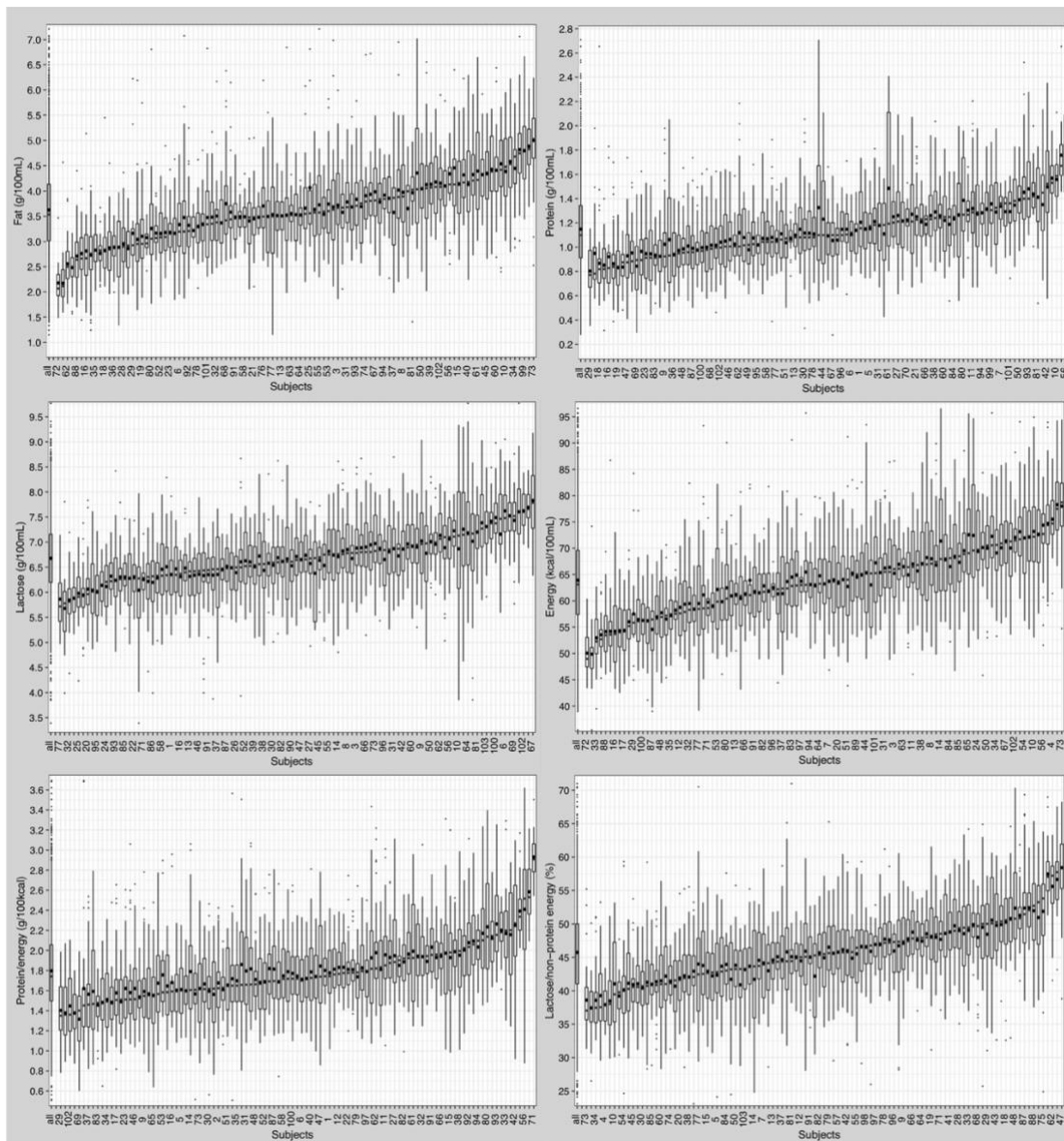
Die intra- und interindividuelle Variation von Muttermilch ist für alle Makronährstoffen beträchtlich. Abbildung 4 zeigt die Makronährstoffkonzentrationen, Energiegehalt, das Verhältnis von Protein-zu-Energie sowie von Kohlenhydrat-zu-Nichtproteinergie sortiert nach intraindividuellem Median.

Der mittlere Gehalt aller Proben pro 100ml lag für Fett bei  $3.6 \pm 0.9$  g, Protein bei  $1.1 \pm 0.3$  g, Laktose bei  $6.7 \pm 0.8$  g und für Energie bei  $64 \pm 9$  kcal (Tab. 4). Das Verhältnis von Protein-zu-Energie lag im Mittel bei  $1.8 \pm 0.4$  g/100kcal und von Kohlenhydrat-zu-Nichtproteinergie bei  $46 \pm 7$  %. Die kleinste Variation bestand absolut bei Protein mit 0.8 bis 1.6 ( $Q_{0.1}$  und  $Q_{0.9}$ ), wies jedoch den größten Variationskoeffizienten mit 27,2% auf. Die größte Variation absolut wies Fett auf mit 2.6 und 4.8 ( $Q_{0.1}$  und  $Q_{0.9}$ ), der Variationskoeffizient lag jedoch nur bei 25%. Die Variation der Kohlenhydrate bewegte sich zwischen Protein und Fett, jedoch war der Variationskoeffizient mit 11,9% am geringsten.

Die Analyse der individuellen Werte der Mütter zeigte dagegen eine deutlich höhere Variabilität. Für die gesamte Population schwankt der Gehalt in der gleichen Mutter (intraindividuelle Variation, ausgedrückt als Abstand von der 25. zur 75. bzw. von der 10. zur 90. Perzentile aller Proben der gleichen Mutter) für Fett im Median (min;max) 0.8 (0.3;1.9) bzw. 1.5 (0.5;3.4) g/100ml, für Protein 0.3 (0.1;1.1) bzw. 0.6 (0.2;1.6) g/100ml, für Kohlenhydrate 0.7 (0.3;1.9) bzw. 1.3 (0.7;4.0) g/100ml und für Energie 8 (2;18) bzw. 15 (5;31) kcal/100ml (Tab. 5).

Die interindividuelle Variation, das heißt die Variabilität der Muttermilchzusammensetzung zwischen den Müttern, ist deutlich höher (Tab. 5, Abb. 4). Die Verteilung der individuellen

Mittelwerte reicht für Fett absolut von 2.2 bis 5.0 ml, für Protein von 0.8 bis 1.8 g/100ml, für Kohlenhydrate von 5.7 bis 7.8 g/100ml und für den Energiegehalt von 50 bis 78 kcal/100ml. Die Korrelationsanalyse fand keinen Zusammenhang zwischen der Konzentration der einzelnen Makronährstoffe. Proben mit einer hohen Konzentration eines Makronährstoffes, konnten eine hohe oder niedrige Konzentration der anderen Makronährstoffe aufweisen. Die Variation eines Makronährstoffes war unabhängig von der mittleren Konzentration. Es bestand kein Zusammenhang zwischen den Variationen der Makronährstoffe.



**Abbildung 4:** Zusammensetzung der Muttermilch mit den verschiedenen Makronährstoffen, Energiegehalt sowie Protein-zu-Nichtproteinenergie und Kohlenhydrat-zu-Nichtkohlenhydratenergie in 103 Müttern mit mindestens 14 Proben. Die Boxplots stellen die Medianwerte dar, Kreise zeigen die Mittelwerte und Punkte die einzelnen Ausreißer. Die Daten sind aufsteigend ausgehend vom Median sortiert.

## 3.2 Fortifizierung

### 3.2.1 Standardfortifizierung mit Fortifier #1 bis #7 und #11

Mit Standardfortifizierung erreichte keiner der verwendeten Pulverstandardfortifier die empfohlenen Konzentrationen (Abb. 5). Die mittlere Proteinkonzentration bewegte sich zwischen 2.1 und 2.6 g/100ml (Zielwert 3.0 g/100ml). Fett und Laktose erreichten je nach Zusammensetzung des verwendeten Fortifiers unterschiedliche Werte: Fortifier #1 und #2 mit einem geringen Fett- und hohem Kohlenhydratanteil ergaben für Fett Mediane um 3.6 g/100ml und für Kohlenhydrate 9.3 und 9.9 g/100ml. Fortifier #3, #4 und #5 mit mittlerem Fett- und Kohlenhydratgehalt hatten für Fett Mediane zwischen 3.9 und 4.3 g/100ml und für Kohlenhydrate 7.9 bis 8.4 g/100ml. In dieser Gruppe erreichten einige Milchen bereits durch Standardfortifizierung die Zielwerte, der Hauptanteil verfehlte diese jedoch. Fortifier #6 und #7 mit hohem Fett- und niedrigem Kohlenhydratanteil erreichten einen Fettgehalt von im Median 4.3 bis 4.6 g/100ml und einen Kohlenhydratgehalt von 6.7 bis 7.1 g/100ml und lagen damit für Fett, aber nicht für Kohlenhydrate nahe der Zielkonzentration. Der Energiegehalt lag für alle Fortifier im Median zwischen 76 und 83 kcal/100ml und somit nicht im Zielbereich. Ebenso lag die Protein-zu-Energie Ratio wegen des niedrigen Proteingehaltes meistens unter der Zielgröße. Lediglich Fortifier #6 erreichte mit im Median 1.5 g/100ml die Empfehlung. Der Kohlenhydrat-zu-Nichtprotein-Energiegehalt zeigt große Schwankungen mit zu hohem als auch zu niedrigem Verhältnis (Abb. 5). Die Variation unter Standardfortifizierung entspricht der Variation der nativen Muttermilch mit Median und IQR auf einem höheren Niveau (Abb. 4 und 6).

Mit dem flüssigen Fortifier lag der Proteingehalt mit 2.6 g/100ml unter der Empfehlung. Bei ausreichendem Kohlenhydratgehalt lag die Fettkonzentration mit 0.8 g/100ml über der Zielkonzentration, der Energiegehalt war mit 88kcal/100ml ebenfalls höher als angestrebt.

Der Flüssigfortifier weist stets die gleiche Makronährstoffkonzentration auf. Die höhere Zufuhr wurde durch ein ansteigendes Mischungsverhältnis mit der Muttermilch erreicht, d.h. es wurde ein größeres Volumen von Muttermilch durch den Fortifier ersetzt. Deswegen verringerte sich auch durch die Zufuhr des konstant zusammengesetzten flüssigen Fortifiers die Variation (Abb. 6). Dies wurde deutlich durch einen Interquantilabstand ( $Q_{0.1}$ ;  $Q_{0.9}$ ) für Protein von 0.4g/100ml, für Fett von 1.1 g/100ml und für Kohlenhydrate 0.9 g/100ml. Der Energiegehalt hatte eine Variation von 11 kcal/100ml, das Protein-zu-Energie Verhältnis 0.4 g/100kcal und die Kohlenhydrat-zu-Nichtproteinenergie 0.6 %.

### 3.2.2 Standardfortifizierung mit dem optimierten Standardfortifier #8, #9 und #10

Basierend auf den Makronährstoffkonzentrationen der 3338 Muttermilchproben wurde die optimale Zusammensetzung eines Fortifiers ermittelt, mit dessen Anwendung die ESPGHAN-Empfehlungen erfüllt wurden [19]. Die Zusammensetzung basierte auf drei Szenarien: keine Muttermilchmessung (#8), sowie einer (#9) bzw. drei Messungen (#10) pro Woche.

Für das erste Szenario (Fortifier #8) wurde ermittelt, dass dieser Fortifier pro 100 ml Frauenmilch im Durchschnitt zusätzlich 0.8 g Fett, 1.9 g Protein und 2.1 g Kohlenhydrate eintragen soll. Jedoch führte die natürliche Variation der nativen Muttermilch bei Standardfortifizierung bei ca. 50 % der Proben zur Überfortifizierung (Median ( $Q_{0.25}$  und  $Q_{0.75}$ ) für Fett 4.3 (4; 4.8) g/pro 100ml, Protein 3 (2.9; 3.1) g/100ml Kohlenhydrate 8.8 (8.5; 9.1) g/100ml) (Abb. 5). Der Energiegehalt zeigte zwar eine hohe Variation, aber der Median erreichte die empfohlene Zufuhr. Die Zusammensetzung der Protein-zu-Energie sowie der Kohlenhydrat-zu-Nichtproteinergie erreichte im Median die Empfehlungen, wies jedoch eine hohe Variation auf (Abb. 6). Für den optimierten Standardfortifier (#9) ergab sich eine Zusammensetzung von 0 g/100ml Fett, 1.5 g/100ml Protein und 1 g/100ml Kohlenhydrate. Dies (#9) führte im Median zu einer Energie von 74 kcal/100ml, einem Verhältnis von Protein-zu-Energie von 3.7 g/100kcal und Kohlenhydrat-zu-Nichtproteinergie von 49 %. Der dritte optimierte Fortifizierer (#10) ergab einen Eintrag von 0 g Fett, 1.3 g Protein und 0.5 g Kohlenhydrate pro 100 ml Frauenmilch. Dies führte zu einer Energieaufnahme von 71 kcal/100ml, einer Ratio von 3.4 g/100kcal Protein-zu-Energie und 47% Kohlenhydrat-zu-Nichtproteinergie. Aufgrund der hohen Variation der nativen Muttermilch mit teilweise hoher Fettkonzentration, enthält der optimierte Standardfortifier (#9 und #10) ab einer Messung pro Woche kein Fett mehr, um eine Überfortifizierung zu vermeiden. Aufgrund der Variation sinkt bei häufigerer Messung ebenfalls die Menge Protein und Kohlenhydraten im optimierten Standardfortifier (Tab. 2, Abb. 6).

### 3.2.3 Targetfortifizierung

Mit der Targetfortifizierung näherten sich die erzielten Makronährstoffkonzentrationen mit zunehmender Häufigkeit der Analysen immer mehr dem Zielwert an (Abb. 5). Dabei können allerdings in denjenigen Proben, die bereits nativ und/oder nach Standardfortifizierung eine Makronährstoffkonzentration oberhalb der Empfehlungen aufweisen, die überschießend vorhandenen Nährstoffe nicht reduziert werden.

Für die Fortifier mit dem geringen Fett- und hohem Kohlenhydratanteil (#1 und #2) wurde für Fett bereits ab einer Analyse pro Woche der Zielwert von 4.4 g/100ml erreicht, mit zunehmender Messhäufigkeit sank zusätzlich die Variation. Dagegen war der Kohlenhydratanteil für viele Proben bereits nach Standardfortifizierung zu hoch und konnte durch Targetfortifizierung die Zielwerte



weder erreichen noch die Variation verringern. Die Fortifier mit mittlerem Fett- und mittlerem Kohlenhydratanteil (#3, #4 und #5) lagen beim Fettgehalt im Median mit 4.6 bis 4.7 g/100ml etwas über den Zielwerten. Dagegen erreichten die Kohlenhydratkonzentrationen nahezu die Zielwerte. Die Fortifier mit hohem Fett- und niedrigem Kohlenhydratgehalt (#6 und #7) übertrafen mit im Median 4.6 bis 4.8 g/100ml Fett die Empfehlungen leicht. Dagegen erreichten die Kohlenhydrate die Zielwerte. Protein ist in allen Fortifiern unzureichend vorhanden und erst durch Targetfortifizierung wird der Zielwert von 3.0 g/100ml erreicht.

Der optimierte Standardfortifier ohne Analyse (#8) lag für alle drei Makronährstoffe leicht über den Zielwerten. Durch Targetfortifizierung konnten auch die Proben mit ungenügendem Nährstoffgehalt angepasst werden, da etwaige Defizienzen nach Standardfortifizierung durch Modularprodukte ausgeglichen wurden. Das zweite und dritte Szenario des optimierten Standardfortifiers (#9, #10) mit einmaligen und dreimaligen Muttermilchanalysen erreichte ebenfalls die Zielwerte der Makronährstoffe, aber mit geringerer Variation für #10 (Abb. 6).

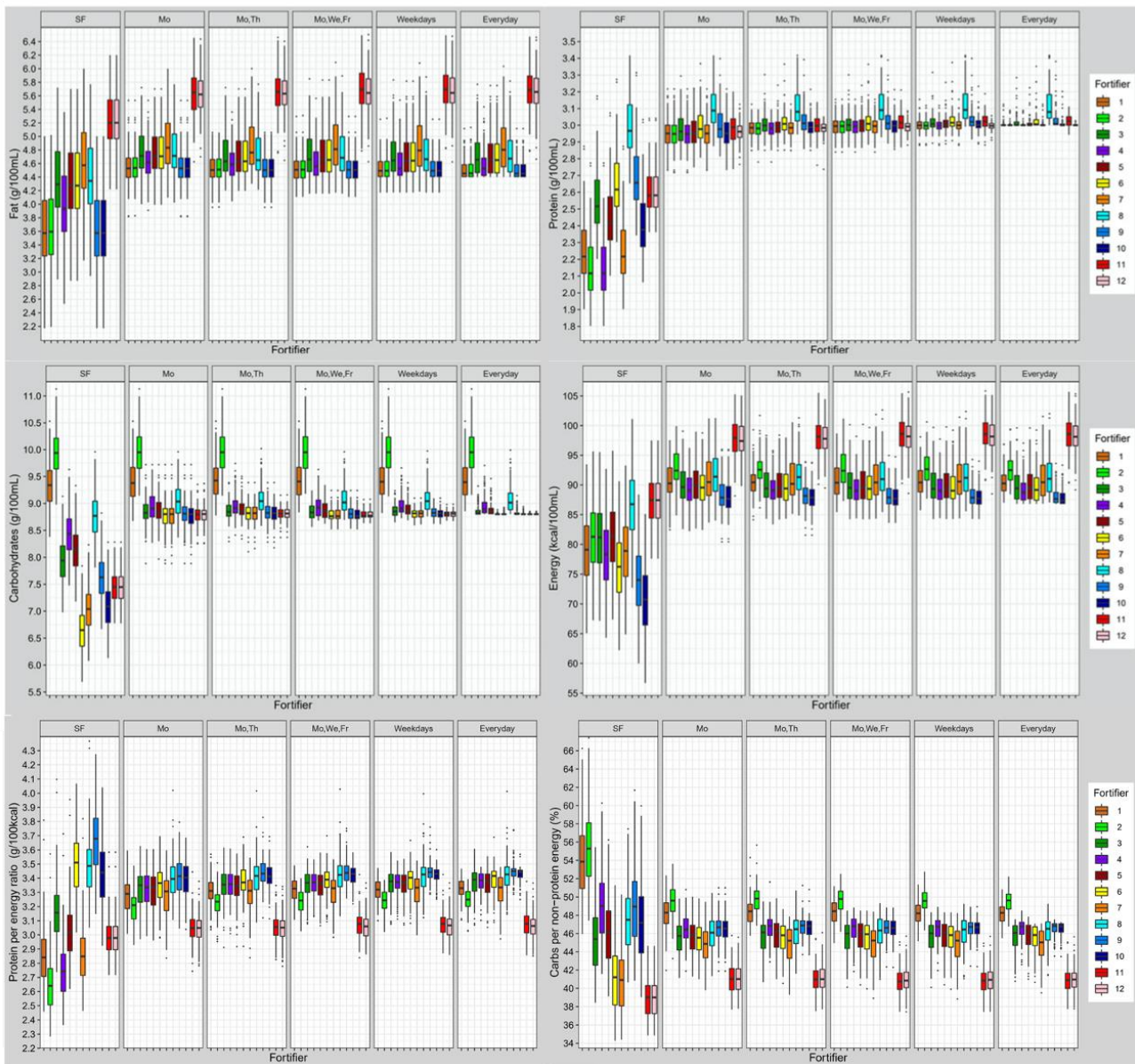
Der Energiegehalt war für die Fortifier mit geringem Fett- und hohem Kohlenhydratanteil (#1 und #2) und hohem Fett- und niedrigem Kohlenhydratgehalt (#6 und #7) mit 88 bis 92 kcal/100ml leicht zu hoch. Wegen des erhöhten Kohlenhydratgehaltes wurden für die Fortifier #1 und #2 die Zielwerte von Protein-zu-Energie sowie die Kohlenhydrat-zu-Nichtprotein-Energie überschritten. Die anderen Fortifizierer erreichten nach Targetfortifizierung in etwa die Empfehlungen.

Die inter- und intraindividuelle Variation der Makronährstoffkonzentration wurde wie erwartet durch die Standardfortifizierung nicht verringert. Dagegen konnte die Targetfortifizierung ab zwei Analysen pro Woche die Variation für alle Makronährstoffe signifikant senken (Abb. 6).

Der optimierte Standardfortifier verhielt sich unter Targetfortifizierung wie die herkömmlichen Standardfortifier (#1 bis #7). Die Proben mit ungenügenden Gehalten wurden durch die Targetfortifizierung mit Modularprodukten adäquat fortifiziert. Die Proben mit zu hoher Makronährstoffkonzentration in nativer Muttermilch sowie die unter Standardfortifizierung bereits überfortifizierten Proben wurden nicht weiter behandelt, sondern der erhöhte Gehalt eines Makronährstoffes wurde im Rahmen der biologischen Variation akzeptiert. Die Variation sank ab drei Analysen pro Woche sichtbar und stetig je mehr Analysen durchgeführt wurden (Abb. 6).

Mit dem Flüssigfortifier erreichte die Targetfortifizierung für Protein mit 3 (2.9; 3.0) g/100ml und für Kohlenhydrate mit 8.8 (8.7; 8.9) g/100ml jeweils den Zielbereich, lag jedoch für Fett mit 5.7 (5.4; 5.9) g/100ml deutlich darüber (Zielwert 4.4 g/100ml), unabhängig von der Analysefrequenz. Der Energiegehalt lag aufgrund der hohen Fettzufuhr mit 97 kcal/100ml über der Empfehlung. Zwischen der regulären (#11) und der Off-Label Anwendung (#12) gab es kaum Unterschiede.

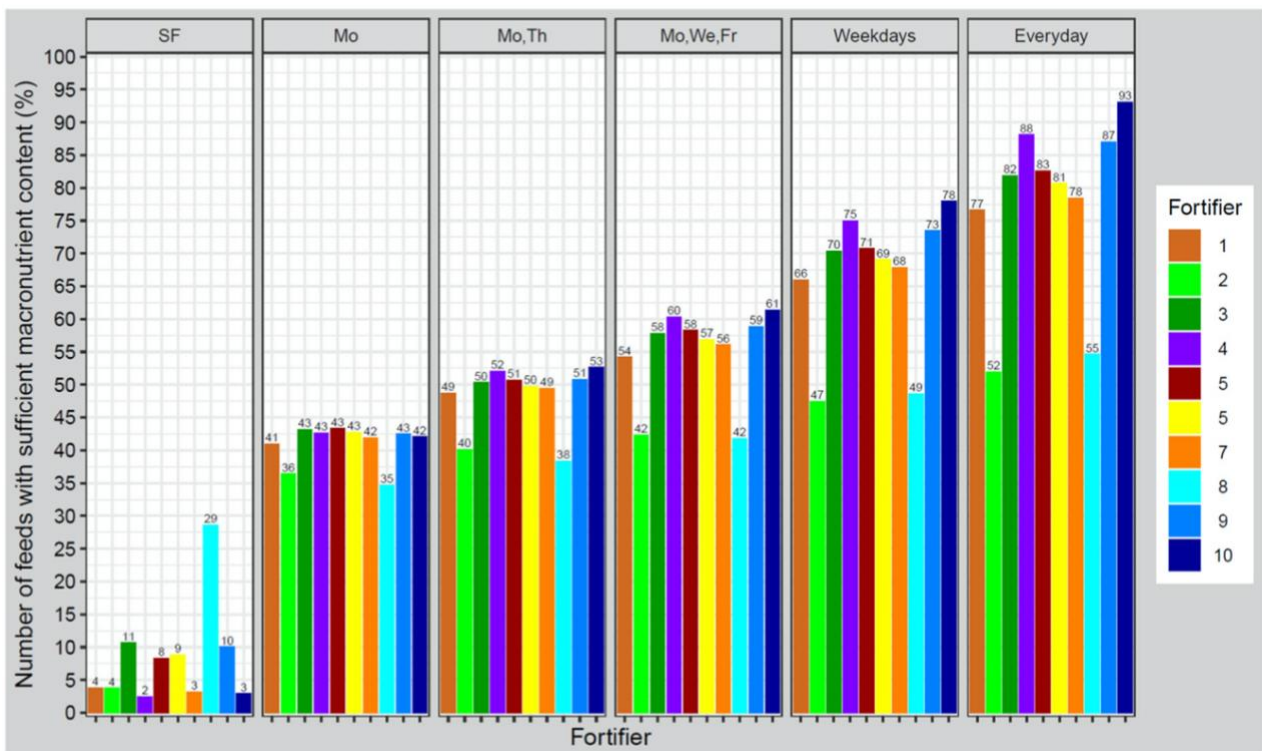
Weil ein Flüssigfortifier ein definiertes Volumen an Muttermilch ersetzt, reduzierte sich bereits mit Standardfortifizierung die Variation der Makronährstoffkonzentration deutlich und sank nach Targetfortifizierung dann noch weiter ab. Die Off-Label Anwendung zeigte deutlich verringerte Variation für Kohlenhydrate und Proteine nach Targetfortifizierung (Abb. 6).



**Abbildung 5:** Makronährstoffkonzentration von Fett, Protein und Kohlenhydraten in g/100ml, Energie in kcal/100ml, Protein-zu-Energie in g/100kcal und Kohlenhydrat-zu-Nichtprotein-Energie in % unter Anwendung von 12 Fortifiern an sieben verschiedenen Frequenzen der Muttermilchanalyse. Die Zuordnung der Fortifier ist in Tabelle 1 und 2 dargestellt, die der Flüssigfortifier 11a bis d wird in seinen verschiedenen Stärken unter der Nummer 11 abgebildet. Die Analysen wurden an verschiedenen Wochentagen durchgeführt (Mo- Montag, Th- Donnerstag, Fr- Freitag, Weekdays- wochentags, everyday- täglich).

### 3.3 Einfluss der Makronährstoffzufuhr auf die Wachstumsraten

Die Umrechnung der tatsächlich erzielten Nährstoffzufuhr in Wachstum mit Hilfe der Kashyap-Formeln zeigte, dass Standardfortifizierung bei 5 bis 10% der Proben zu adäquater Gewichtszunahme führte, mit dem optimierten Standardfortifier (#8) wurde dies bereits in 30 % der Proben erreicht. Mit der Targetfortifizierung mit einer Analyse pro Woche erreichten für alle Fortifizierer 40 % der Proben das gewünschte Wachstum. Jeder zusätzliche Analysenschritt verschaffte eine Zunahme von 10 %. Bei täglicher Analyse wurde für 80 bis 90 % der Proben das Zielwachstum erreicht. Der optimierte Standardfortifier basierend auf drei Analysen pro Woche zeigte mit 93 % das höchste Ergebnis. Fortifizierer #2 und #8 erreichten allerdings nur maximal 50 %, was an der inadäquaten Makronährstoffzusammensetzung bezogen auf alle Muttermilchproben liegen könnte (Abb. 7).



**Abbildung 7:** Prozentualer Anteil der Proben, deren Makronährstoffzusammensetzung zu adäquatem Wachstum führt. Zielwachstumsraten sind definiert von  $\pm 1\text{g/kg/d}$  des angestrebten Wachstums. Dargestellt sind die zehn Pulverfortifizierer (identisch zu Tabelle 2) in Standardfortifizierung und Targetfortifizierung basierend auf der bereits zuvor beschriebenen Analysenanzahl pro Woche. (SF- Standardfortifizierung, Mo- Montag, Wed- Mittwoch, Th- Donnerstag, Fr- Freitag, weekdays- Wochentags, every day- täglich)

### **3.4 Optimierung der Makronährstoffkonzentration und Reduktion der Variation in nativer Muttermilch**

Die Kombination von je zwei Milchproben mit dem höchsten und niedrigsten, dem zweithöchsten und zweitniedrigsten Gehalt und so weiter fortlaufend reduzierte die Variation der führenden Komponente um 50 %, hatte aber die Variation der anderen Makronährstoffe bzw. Energie keinen signifikanten Einfluss (Tab. 6).

Die Kombination von je drei Proben mit den höchsten Werten hatte den größten Effekt für Fett (von 3.5 auf 4.1 g/100ml) und für Energie (63 auf 69 kcal/100ml). Für Protein und Laktose gab es eine leichte Erhöhung der Konzentration von 0.2 g/100ml Protein und 0.3 g/100ml für Laktose. Insgesamt lag der Effekt bei 9 bis 13 %. Der Einfluss auf die Variation der Makronährstoffe und Energie war gering (Tab. 7).

### **3.5 Simulation einer Milchbank mit Pooling der nativen Muttermilchproben**

Die Ergebnisse der Milchbankanalyse zeigten, dass die Variation der Makronährstoffe, Energie, das Verhältnis von Protein-zu-Energie und Kohlenhydrat-zu-Nichtproteinenergie kontinuierlich sank, je mehr Proben in einer Milchbank zur Verfügung stehen. Signifikant war eine Reduktion von 10 % ab einer Probengröße von 150 zu beobachten. Dieses Ergebnis konnte für alle Komponenten in ähnlichem Maße dargestellt werden (Abb. 8).

### **3.6 Optimierung des Makronährstoffgehaltes durch Gefriertrocknung**

Unsere Analysen zeigten, dass mit der Gefriertrocknung die Zielwerte der Makronährstoffe und Milchzusammensetzung nicht erreicht werden konnten. Basierend auf der Konzentration von Fett waren alle resultierenden Konzentrationen von Protein, Kohlenhydrat und Energie zu niedrig. Protein als Basis ergab eine deutlich zu hohe Konzentration an Fett, Kohlenhydraten und Energie. Ausgehend von den Kohlenhydraten war der Gehalt an Fett zu hoch, Protein und Energie nicht ausreichend. Der „Lyophilisationsfaktor“ für Energie ergab eine zu hohe Menge an Fett und Kohlenhydraten und eine zu niedrige Menge an Protein. Somit waren die Ergebnisse für alle Analysen insuffizient (Tab. 8).

## 4 Diskussion

Die Analysen zeigten die hohe intra- und interindividuelle Makronährstoffvariation in nativer Muttermilch, wobei die Makronährstoffgehalte intraindividuell nicht miteinander korrelieren. Mütter mit höherem Gehalt eines Makronährstoffes zeigten zwar größere Schwankungen, aber die Höhe der Konzentration lässt keinen Schluss auf die tatsächliche intraindividuelle Variation eines Makronährstoffes zu. Ebenso kann aus der intraindividuellen Variation eines Makronährstoffes nicht auf die Variation der anderen Makronährstoffe geschlossen werden. So sind ohne Analyse aller Makronährstoffe keine Aussagen über die tatsächliche Zusammensetzung einer individuellen Muttermilchprobe möglich.

Verglichen mit den Empfehlungen der ESPGHAN erreichte eine Vielzahl standardfortifizierter Muttermilchproben die Makronährstoffziele nicht [19]. Meistens wiesen die Proben einen zu niedrigen oder unbalancierten Gehalt auf. Diese Unvorhersagbarkeit und Unsicherheit der Nährstoffzufuhr für das einzelne Frühgeborene illustriert deutlich die Schwierigkeit, eine adäquate und bilanzierte Ernährung für diese vulnerable Population sicherzustellen.

In unserer Simulation stammen die Proben ausschließlich von den „eigenen“ Müttern der Frühgeborenen. Dagegen spenden in Milchbanken auch Mütter älterer früh- oder termingeborener Kinder. Dies kann zu einer höheren interindividuellen Variabilität als in unserer Studie führen, denn die Zusammensetzung der Muttermilch hängt vom Gestationsalter und postnatalen Alter ab. Milch frühgeborener Mütter enthält zu Beginn mehr Protein als die der Mütter von Termingeborenen und nähert sich erst ab der zehnten Woche deren Niveau an. Der Fettgehalt ist höher in der Milch frühgeborener Mütter und steigt bei beiden Gruppen mit zunehmendem Laktationsalter noch etwas an. Dagegen ist der Laktosegehalt bei Müttern Frühgeborener zunächst etwas niedriger als bei Termingeborenen, steigt aber ebenfalls für beide Gruppen im Verlauf noch etwas an [16]. In der Praxis ist es also wahrscheinlich, dass die Makronährstoffkonzentrationen bei Einschluss von Spendermilchen eine noch höhere Variabilität als in unserer Studie aufweisen könnten. Die unterschiedliche Zusammensetzung der Muttermilchen verdeutlicht die Schwierigkeit einer gezielten Ernährung und Fortifizierung.

Kommerziell erhältliche Standardfortifizier weisen verschiedene Gehalte von Fett, Protein und Kohlenhydraten auf. Die beschriebenen Besonderheiten der Muttermilchzusammensetzung machen deutlich, dass Standardfortifizierung unter der Annahme einer mittleren Zusammensetzung von Muttermilch zu unzureichenden und im individuellen Einzelfall sogar zu unvorteilhaften Makronährstoffeinträgen führt. In unserer Studie werden die Makronährstoffempfehlungen unter Standardfortifizierung nur von weniger als 12 % der Proben erfüllt. Der Großteil der Proben bietet

nach Standardfortifizierung eine inadäquate Zufuhr, aber es werden unter Standardfortifizierung teilweise auch zu hohe Makronährstoffgehalte verfüttert.

Um die definierten Ziele der Sicherstellung eines adäquaten Nährstoffeintrages mit einem Standardfortifier zu erreichen, sollte dieser so optimiert sein, dass es bereits durch diesen für möglichst viele Muttermilchen zu einer adäquaten Zufuhr an Fett, Protein und Kohlenhydraten kommt. Gleichzeitig muss eine Überfortifizierung verhindert werden.

Der in dieser Studie ermittelte optimierte Standardfortifier (#8) enthält eine höhere Menge an Protein (1.85 g/100ml) als die herkömmlichen Standardfortifier. Der Fettgehalt (0.77 g/100ml) ist vergleichsweise niedrig und nähert sich der Gruppe der Fortifier mit hohem Fett-/ niedrigem Kohlenhydratanteil an. Der Kohlenhydratgehalt (2.13 g/100ml) weist einen ähnlichen Gehalt wie die Gruppe wenig Fett-/ hoher Kohlenhydratanteil auf. Mit diesem Fortifier erreichen lediglich 30 % der Proben die angestrebten Zielwerte. Trotz optimierter Zusammensetzung des Standardfortifiers bleibt die Problematik der inter- und intraindividuellen Variation der Muttermilch bestehen und führt zu inadäquater Ernährung der frühgeborenen Kinder [19].

Standardfortifizierung mit dem Flüssigfortifier erreicht den empfohlenen Nährstoffeintrag nicht, verringert aber die Variation des Makronährstoffgehaltes bereits bei der Standardfortifizierung deutlich.

Die Targetfortifizierung adressiert die beschriebene Makronährstoffvariation. Das Prinzip basiert auf der Vorgabe von Zielwerten, Messung der Muttermilch, Verwendung eines Standardfortifiers und Ergänzung fehlender Makronährstoffe durch Modularprodukte, um die Zielwerte zu erreichen. Bereits mit einer Muttermilchanalyse pro Woche werden die Zielwerte im Mittel erreicht. Aber erst häufigere Messungen reduzieren die Variabilität der Zufuhr. Sie sinkt signifikant ab zwei oder mehr Analysen pro Woche. Die besten Ergebnisse liefert die tägliche Analyse, dies bedeutet allerdings einen höheren zeitlichen Aufwand. Da bei diesem Vorgehen ebenfalls Standardfortifier verwendet werden, bleibt die Problematik der Überfortifizierung auch hier bestehen. Die zu hohen Makronährstoff-konzentrationen sind einerseits durch einen hohen Ausgangsgehalt der nativen Muttermilch, durch einen zu hohen Gehalt im Standardfortifier oder durch die Kombination beider bedingt.

In den verfügbaren Standardfortifiern ist 1 bis 1.5 g/100ml Protein enthalten, deren alleinige Anwendung zu einer insuffizienten Zufuhr führt. Durch Targetfortifizierung kann diese jedoch ausgeglichen werden. Für Fett und Kohlenhydrate weisen die Standardfortifier unterschiedliche Mengen auf, sodass diese in drei Gruppen eingeteilt wurden. Die Gruppe mit mittlerem Fett- und mittlerem Kohlenhydratanteil erreichte die ausgeglichene Zufuhr, wenn auch auf niedrigem Niveau.

Die beiden anderen Gruppen (niedriger Fett-/ hoher Kohlenhydratanteil und hoher Fett-/ niedriger Kohlenhydratanteil) waren in den Makronährstoffen entsprechend zu hoch oder zu niedrig (Abb. 5).

Um Überfortifizierung möglichst zu vermeiden, wurde ein optimierter Standardfortifier (#9 und #10) zur Targetfortifizierung konzipiert. Mit einer bzw. drei Messungen pro Woche enthält der optimierte Standardfortifier kein zusätzliches Fett. Die Proteinmenge beträgt 1.5 bzw. 1.3 g/100ml und die Kohlenhydratmenge 1 bzw. 0.5 g/100ml. Der optimierte Standardfortifier enthält eine insgesamt deutlich niedrigere Menge an Makronährstoffen als die herkömmlichen Standardfortifier. Die Menge von Fett, Protein und Kohlenhydraten im optimierten Standardfortifier sinkt, je mehr Muttermilchanalysen durchgeführt werden. Stattdessen müssen dann gezielt modulare Produkte hinzugefügt werden, was einen leicht erhöhten Aufwand bedeutet. Insgesamt erscheinen zwei Analysen pro Woche als ein guter Kompromiss, um die Makronährstoffempfehlungen zu erfüllen und die Variation zu reduzieren (Abb. 5 und 6). Unter diesen Voraussetzungen ist eine effiziente Vorgehensweise in der klinischen Praxis möglich.

Bei den kommerziell erhältlichen Standardfortifiern kommt die Gruppe mit mittlerem Fett- und mittlerem Kohlenhydratanteil der Zusammensetzung des optimierten Standardfortifiers am nächsten, jedoch führt diese in einem Großteil der Proben zu einer Überfortifizierung von Fett.

Für eine effiziente und möglichst genaue, individualisierte Targetfortifizierung sollte ein Standardfortifier gewählt sein, der eine Basismenge an Makronährstoffen hinzufügt, ohne dass eine Überfortifizierung entsteht. Dafür muss dann häufiger eine fehlende Menge an Fett, Protein und Kohlenhydraten durch das Hinzufügen der Modularprodukte ausgeglichen werden.

Die im Jahr 2022 veröffentlichte aktualisierte Guideline der ESPGHAN wird in dieser Studie noch nicht berücksichtigt. Im Vergleich zu der Guideline von 2010 sind insgesamt höhere Einfuhren für die Gesamtflüssigkeit (135 bis max. 200 ml/kg/d) sowie für Kohlenhydrate (11 bis 15 g/kg/d) und Fett (4.8 bis 8.1 g/kg/d) empfohlen, die Grenze der minimal angestrebten Einträge bleibt unverändert. Die Empfehlung für die Proteinzufuhr bleibt gleich [20]. Die neue Empfehlung ändert an der Grundaussage nichts, jedoch würde sogar eine noch größere Anzahl nativer und standardfortifizierter Muttermilchen die Nährstoffeinträge nicht oder nur knapp erreichen [34, 54].

Unsere Studie berücksichtigt nicht die benötigten Mikronährstoffe. Sie wurden in dieser Arbeit nicht betrachtet. Untersuchungen über die Mikronährstoffkonzentration in Muttermilch zeigten ebenfalls Unterschiede zwischen frühgeborenen und termingeborenen Kindern. Weiterhin sind auch dort eine intra- und interindividuelle Variation beschrieben. Über die Laktation hinweg ändern sich die

Konzentrationen der Mikronährstoffe und sinken nach einigen Wochen auf ein stabiles Niveau [55]. Für die Ernährung mit Muttermilch für Frühgeborene unter Verwendung der Milch der eigenen Mutter sowie Spendermilch aus einer Milchbank, die häufig von Müttern älterer Kinder stammt, könnten es sich daher in Zukunft als sinnvoll erweisen, die Mikronährstoffe ebenfalls wie die Makronährstoffe zu analysieren und individuell zu supplementieren.

Die Flüssigfortifier enthalten ähnlich viel Kohlenhydrate wie die Gruppe mit mittleren Fett- und Kohlenhydratanteil sowie eine Proteinmenge, die im Durchschnitt der Pulverfortifier liegt. Der Fettanteil ist deutlich höher und führt dazu, dass alle Muttermilchproben für Fett und Energie überfortifiziert sind. Dies erscheint zunächst von Nachteil, jedoch ist zu bedenken, dass der Flüssigfortifier auf der Basis von Muttermilch besteht und dadurch andere Fettglobule enthält als die Fortifier, die auf Kuhmilch basieren. Die Milchfettglobule sind aus verschiedenen mittel- und langkettigen Triglyceriden aufgebaut, die essentielle Fettsäuren beinhalten. Durch die Sekretion aus den Milchdrüsen sind die Fettglobule von einer Membranphospholipidschicht umgeben und durch Proteine ergänzt. Die Zusammensetzung aus Sphingolipiden, Cholesterol, Glycerolipiden und Proteinen ist anders als in Kuhmilch [53, 56]. So werden dem Organismus wichtige Bauteile für Zellmembranen und Zellbestandteile geliefert. Weiterhin werden positive Effekte für das Immunsystem, insbesondere für die mikrobielle Besiedelung des Gastrointestinaltraktes und die strukturelle Entwicklung vermutet. Studien ergaben, dass die Zusammensetzung der Milchfettglobule und die neurologische Entwicklung vergleichbar ist von frühgeborenen und termingeborenen Kindern, die nur mit Muttermilch ernährt wurden [53, 56- 58]. Genaue Studien über den Einfluss der Fettglobule sind jedoch noch ausstehend.

Die adäquate Ernährung bildet die Grundlage für das Wachstum der frühgeborenen Kinder. Die Modellrechnung zur Ermittlung des täglichen Wachstums und die definierte Toleranzgrenze zeigt, dass der Effekt der insuffizienten Ernährung weitreichende Folgen für das Wachstum und die weitere Entwicklung der Kinder hat. Erst unter Targetfortifizierung konnten bis zu 90 % der Proben diese Zielvorgabe erfüllen. In dieser Studie wurden die Wachstumsraten der Kinder nicht untersucht, sondern theoretisch berechnet.

Man weiß, dass die Wachstumsraten von Frühgeborenen nach Geburt den intrauterinen gleichen sollten [28]. Eine überschießende Gewichtszunahme ist jedoch mit Risiken im späteren Leben assoziiert [44, 45]. Neben einer ausreichenden Gewichtszunahme ist deren adäquate Zusammensetzung insbesondere für die spätere neurokognitive Entwicklung bedeutsam [41-43]. Um fettfreie Masse optimal aufzubauen spielt das Verhältnis Protein-zu-Energie sowie die Kohlenhydrat-



zu-Nichtproteinenergie eine wichtige Rolle. Dieser Effekt wurde in der Modellrechnung durch den „Metabolic Factor“ berücksichtigt. Die Modellrechnung verdeutlicht welchen Einfluss die Analyse der Makronährstoffkonzentrationen auf die adäquate Ernährung sowie die Zusammensetzung des Wachstums hat, was als Grundlage für die spätere Entwicklung dient. Unter Standardfortifizierung werden <10 % der Proben ein adäquates Wachstum ermöglichen, lediglich der optimierte Standardfortifier erlangt 30 %. Erst mit der individualisierten Targetfortifizierung können die Ernährungsziele und angestrebten Wachstumsraten erreicht werden.

Die Analysen dieser Studie konnten zeigen, dass die reine Verwendung von Muttermilch nicht ausreichend ist, um die empfohlene Makronährstoffzufuhr für Frühgeborene zu gewährleisten. Das Mischen der Milch einer Mutter hat keine nennenswerte Reduktion der Variation der Makronährstoffe erbracht. Erschwerend dafür ist, dass es keinen Zusammenhang und damit Vorhersagbarkeit für die Menge an Fett, Protein oder Kohlenhydraten in Muttermilch gibt. Eine Optimierung eines Makronährstoffes hat daher nicht zwangsläufig einen positiven Effekt auf die Konzentration der anderen Makronährstoffe.

Das Szenario zur Erhöhung der Konzentration durch Mischen ist ebenfalls ohne deutlichen Effekt gewesen. Für diese Szenarien wären größere Mengen an Muttermilch notwendig als im Normalfall von einer Mutter vorhanden sind. Der Aufwand im klinischen Alltag steht dem geringen Nutzen gegenüber und ist nicht ausreichend von Vorteil.

Die Grundidee der Gefriertrocknung war es durch ein verringertes Volumen bei gleicher Menge an Fett, Protein und Kohlenhydraten die Konzentration zu erhöhen und so eine reine Ernährung mit Muttermilch zu ermöglichen. Nun ist das durchschnittliche Verhältnis der Makronährstoffe in Muttermilch Protein zu Fett 1:3,2 und das Verhältnis von Protein zu Kohlenhydraten 1:6,1. Die Empfehlungen für Frühgeborene sehen ein Verhältnis von Protein zu Fett 1:1,5 und Protein zu Kohlenhydraten 1:2,9, vor sodass anhand dieser Grundvoraussetzungen die einfache Konzentrierung der Muttermilch nicht zielführend ist. Diese kann aufgrund der hohen Variation der Makronährstoffe teils zu sehr hohen Konzentrationen der anderen Makronährstoffen führen. An dieses Modell anzumerken ist weiterhin, dass die Konzentrationen von Mikronährstoffen und Schadstoffen ebenfalls erhöht wird [59- 61], die nicht weiter betrachtet wurden. Praktisch durchgeführte Studien zur Gefriertrocknung zeigten ebenfalls hohe Konzentrationen für Fett, Laktose und Energie mit geringer Proteinzufuhr [62].

Eine weitere Überlegung zur Gefriertrocknung war, die Makronährstoffe zu separieren und einzeln hinzuzufügen. Jedoch ist dies technisch aufwändig und daher nicht ohne weiteres umsetzbar.

Die Modellrechnung zur Verringerung der Variation durch Milchpooling zeigte einen signifikanten Effekt ab einer Probengröße von 150 à 100 ml Probenvolumen. Für die Umsetzung im Alltag ist diese Probengröße allerdings zu hoch, da die Menge durch Muttermilch und Frauenmilch täglich in kaum einer Milchbank vorhanden ist. Weiterhin wird die Muttermilch für eine korrekte Lagerung eingefroren, wenn diese nicht am selben Tag zur Ernährung genutzt wird. Auftauen und Mischen erfordert die Verwendung der Milch am selben Tag, die in dieser Menge höchstwahrscheinlich nicht gebraucht werden wird.

Frauenmilch kann sich abhängig von den gewählten Bedingungen unter Lagerung verändern. So ändert sich die Konzentration von Laktose nicht relevant [63]. Dagegen ist der Gehalt von Energie und Fett abhängig von der Temperatur (-80°C vs. -20°C) sowie von der Dauer der Lagerung [64]. Die Lagerung hat auch einen Einfluss auf die Fettsäuren [65]. Zwar beeinflusst eine Lagerung nach Pasteurisierung bei -20°C für drei Monate oder bei mehr als -70°C die Qualität der Fettsäuren kaum, aber Lagerung bei Licht und 4°C verringert die Menge an Fettsäuren. Der Proteingehalt hingegen sinkt mit der Dauer und das Milchpeptidom verändert sich abhängig von der Temperatur [64]. Die Veränderungen sind am stärksten, wenn die Milch bei Raumtemperatur und am geringsten, wenn sie direkt tiefgefroren wird [66]. Für die Verwendung der Milch aus Milchbanken oder auch gelagerte Milch der eigenen Mutter müssen also die Lagerungsbedingungen beachtet werden. Beim Abweichen der Lagerung von -20°C und zügigen Verwenden der Milch muss von einer Änderung der ursprünglichen Zusammensetzung ausgegangen werden. Das Vorhalten einer so großen Anzahl von Proben erscheint daher nicht sinnvoll bzw. machbar.

## **5 Limitationen und Stärken**

Limitationen der Studie sind die über 24 Stunden gesammelten und gemischten Muttermilchproben, wodurch die Makronährstoffvariation bereits reduziert worden sein könnte. Es wird auch bewusst nicht auf den Unterschied von bovinen vs. humanen Frauenmilchverstärkern eingegangen. Weiterhin wurden die Mikronährstoffe nicht betrachtet. Die ESPGHAN Zielwerte für die enterale Makronährstoffzufuhr wurden für gesunde, extremfrühgeborene Kinder definiert. Kinder, die komplexe Krankheitsbilder und einen höheren Bedarf haben, wurden nicht berücksichtigt. Dennoch könnten die beschriebenen Methoden ebenfalls für solche Kinder angewandt werden. Die Modellrechnung für das Wachstum ist lediglich theoretisch und soll die somatischen Auswirkungen von Nährstoffzufuhr auf Wachstum darstellen, könnte jedoch in der Realität im Einzelfall abweichen.

Stärken der Studie ist die große Zahl an Proben (n=3338) und Teilnehmern (n=103) sowie eine kontinuierliche Probensammlung von mindestens 15 Tagen. Die Sammlung der Proben, Lagerung und Verarbeitung wurde von geschultem Personal durchgeführt. Weiterhin wurden validierte Methoden für die Analyse von Fett, Protein und Laktose angewandt [26, 47, 48]. Die UPLC-MS/MS bestimmt ausschließlich Laktose. Oligosaccharide, die den Wert falsch erhöhen, sind somit nicht relevant.

## **6 Schlussfolgerung**

Die reine Ernährung mit Muttermilch ist für frühgeborene Kinder nicht ausreichend. Standardfortifizierung liefert häufig eine inadäquate Ernährung. Die hohe intra- und interindividuelle Variation der Makronährstoffkonzentration in der Muttermilch beeinträchtigt die Fortifizierung. Unter Anwendung von individualisierter Targetfortifizierung können ESPGHAN Ernährungsziele erreicht werden, jedoch muss Überfortifizierung vermieden werden. Die Anwendung des in dieser Arbeit definierten optimierten Standardfortifiers erreicht in 90 % der Proben ESPGHAN Richtwerte. Strategien zur Reduktion der Variation oder Erhöhung der Makronährstoffkonzentration in nativer Muttermilch erreichen die Ernährungsziele nicht und bieten keinen Nutzen. Fortifizierung mit muttermilchbasierten Produkten, die evtl. langfristig einen Vorteil für Frühgeborene bringt, kann die Nährstoffziele erreichen, sollten aber in Hinblick auf adäquates Wachstum mehr untersucht werden.

## 7 Zusammenfassung

Für frühgeborene Kinder ist Muttermilch die empfohlene enterale Ernährung mit vielen bereits gut untersuchten positiven Effekten. Jedoch ist der Gehalt an Makronährstoffen ungenügend für die Bedürfnisse der Frühgeborenen. Native Muttermilch zeigt eine hohe inter- und intraindividuelle Variabilität der Makronährstoffe. Die Effizienz der allgemein verbreiteten Standardfortifizierung mit kommerziell erhältlichen Fortifiern ist durch diese Variabilität beeinträchtigt und führt so in einem Großteil der Muttermilchproben zu einer inadäquaten Nährstoffzufuhr, die zu niedrig, jedoch auch zu hoch ausfallen kann. Unzureichende Ernährung kann einen negativen Einfluss auf das Wachstum und die Körperzusammensetzung sowie für Folgeerkrankungen im Erwachsenenalter haben.

Diese Studie zeigt anhand realer Daten zur Zusammensetzung der Muttermilch in über 3300 Proben, dass die Messung der Makronährstoffe in nativer Muttermilch und die anschließende, darauf basierende Targetfortifizierung mit der individuellen Ergänzung der fehlenden Makronährstoffen zu adäquaten Nährstoffeinträgen führt. Dadurch kann auf die Variabilität der nativen Muttermilch reagiert und die Variation der Makronährstoffzufuhr signifikant verringert werden. In dieser Arbeit wurden drei verschiedene optimierte Standardfortifier entwickelt, dessen Zusammensetzungen zu einem adäquaten Makronährstoffeintrag für die Anwendung der Standardfortifizierung als auch für zwei weitere Targetfortifizierungsschritte führen.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit der Einfluss, der durch die verschiedenen Fortifizierungsstrategien erzeugten Nährstoffzufuhren auf die Wachstumsrate berechnet, der für Standardfortifizierung ungenügende und für Targetfortifizierung hauptsächlich zufriedenstellende Ergebnisse zeigt.

Verschiedene Analysen der nativen Muttermilch, die durch verschiedene Kombinationen des Mischens kleiner Probenmengen und durch Pooling von Muttermilch in einer großen Milchbank die Variabilität verringern sollten sowie durch Mischen und die Anwendung von Gefriertrocknung die Makronährstoffkonzentration erhöhen sollten, zeigten keine zufriedenstellenden Ergebnisse.

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, dass standardfortifizierte Muttermilch trotz verschiedener Poolingstrategien keine adäquate Makronährstoffzufuhr für frühgeborene Kinder sicherstellt. Für den klinischen Alltag wird die Bedeutung der Targetfortifizierung deutlich, die mit regelmäßiger Muttermilchanalyse und unter Anwendung optimierter Standardfortifier zufriedenstellend gelingen kann und so zu physiologischen Wachstumsraten führen kann.

## 8 Literaturverzeichnis

- [1] Noah J. Friedman RSZ. The role of breast-feeding in the development of allergies and asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2005; Volume 115(Issue 6):Pages 1238-48.
- [2] Kull I, Wickman M, Lilja G, Nordvall SL, Pershagen G. Breast feeding and allergic diseases in infants-a prospective birth cohort study. *Arch Dis Child*. 2002;87(6):478-81.
- [3] Dogaru CM, Nyffenegger D, Pescatore AM, Spycher BD, Kuehni CE. Breastfeeding and childhood asthma: systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol*. 2014;179(10):1153-67.
- [4] Kramer MS, Chalmers B, Hodnett ED, Sevkovskaya Z, Dzikovich I, Shapiro S, et al. Promotion of Breastfeeding Intervention Trial (PROBIT): a randomized trial in the Republic of Belarus. *Jama*. 2001;285(4):413-20.
- [5] Boix-Amorós A, Collado MC, Van't Land B, Calvert A, Le Doare K, Garssen J, et al. Reviewing the evidence on breast milk composition and immunological outcomes. *Nutr Rev*. 2019.
- [6] Tlaskalová-Hogenová H, Kverka M, Hrdý J. Immunomodulatory Components of Human Colostrum and Milk. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser*. 2020;94:38-47.
- [7] Greer FR, Sicherer SH, Burks AW. The Effects of Early Nutritional Interventions on the Development of Atopic Disease in Infants and Children: The Role of Maternal Dietary Restriction, Breastfeeding, Hydrolyzed Formulas, and Timing of Introduction of Allergenic Complementary Foods. *Pediatrics*. 2019;143(4).
- [8] Horta BL, Loret de Mola C, Victora CG. Long-term consequences of breastfeeding on cholesterol, obesity, systolic blood pressure and type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*. 2015;104(467):30-7.
- [9] Barker D. The fetal and infant origins of adult disease. *BMJ* 17NOVEMBER 1990. 1990;301.
- [10] Eriksson JG, Forsen T, Tuomilehto J, Osmond C, Barker DJ. Early growth and coronary heart disease in later life: longitudinal study. *Bmj*. 2001;322(7292):949-53.
- [11] Sullivan S, Schanler RJ, Kim JH, Patel AL, Trawöger R, Kiechl-Kohlendorfer U, et al. An exclusively human milk-based diet is associated with a lower rate of necrotizing enterocolitis than a diet of human milk and bovine milk-based products. *The Journal of pediatrics*. 2010;156(4):562-7.e1.
- [12] Schanler RJ, Shulman RJ, Lau C. Feeding strategies for premature infants: beneficial outcomes of feeding fortified human milk versus preterm formula. *Pediatrics*. 1999;103(6 Pt 1):1150-7.
- [13] Lucas A, Cole TJ. Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis. *Lancet (London, England)*. 1990;336(8730):1519-23.
- [14] Isaacs EB, Fischl BR, Quinn BT, Chong WK, Gadian DG, Lucas A. Impact of breast milk on intelligence quotient, brain size, and white matter development. *Pediatric research*. 2010;67(4):357-62.

- [15] Lucas A, Morley R, Cole TJ. Randomised trial of early diet in preterm babies and later intelligence quotient. *Bmj*. 1998;317(7171):1481-7.
- [16] Gidrewicz DA, Fenton TR. A systematic review and meta-analysis of the nutrient content of preterm and term breast milk. *BMC Pediatrics*. 2014;14(1):216.
- [17] Fusch G, Mitra S, Rochow N, Fusch C. Target fortification of breast milk: levels of fat, protein or lactose are not related. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*. 2015;104(1):38-42.
- [18] Bachour P, Yafawi R, Jaber F, Choueiri E, Abdel-Razzak Z. Effects of smoking, mother's age, body mass index, and parity number on lipid, protein, and secretory immunoglobulin A concentrations of human milk. *Breastfeed Med*. 2012;7(3):179-88.
- [19] Agostoni C, Buonocore G, Carnielli VP, De Curtis M, Darmaun D, Decsi T, et al. Enteral nutrient supply for preterm infants: commentary from the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Committee on Nutrition. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2010;50(1):85-91.
- [20] Embleton ND, Moltu SJ, Lapillonne A, van den Akker CHP, Carnielli V, Fusch C, et al. Enteral Nutrition in Preterm Infants (2022): A Position Paper From the ESPGHAN Committee on Nutrition and Invited Experts. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2023;76(2):248-68.
- [21] Arslanoglu S, Moro GE, Ziegler EE. Adjustable fortification of human milk fed to preterm infants: does it make a difference? *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association*. 2006;26(10):614-21.
- [22] Weber A, Loui A, Jochum F, Buhner C, Obladen M. Breast milk from mothers of very low birthweight infants: variability in fat and protein content. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*. 2001;90(7):772-5.
- [23] Sauer CW, Boutin MA, Kim JH. Wide Variability in Caloric Density of Expressed Human Milk Can Lead to Major Underestimation or Overestimation of Nutrient Content. *J Hum Lact*. 2017;33(2):341-50.
- [24] Rochow N, Landau-Crangle E, Fusch C. Challenges in breast milk fortification for preterm infants. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2015;18(3):276-84.
- [25] Rochow N, Fusch G, Zapanta B, Ali A, Barui S, Fusch C. Target fortification of breast milk: how often should milk analysis be done? *Nutrients*. 2015;7(4):2297-310.
- [26] Rochow N, Fusch G, Ali A, Bhatia A, So HY, Iskander R, et al. Individualized target fortification of breast milk with protein, carbohydrates, and fat for preterm infants: A double-blind randomized controlled trial. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*. 2021;40(1):54-63.

- [27] Rochow N, Fusch G, Choi A, Chessell L, Elliott L, McDonald K, et al. Target fortification of breast milk with fat, protein, and carbohydrates for preterm infants. *The Journal of Pediatrics*. 2013;163(4):1001-7.
- [28] Fenton TR, Kim JH. A systematic review and meta-analysis to revise the Fenton growth chart for preterm infants. *BMC Pediatr*. 2013;13:59.
- [29] Mei Z, Grummer-Strawn LM, Thompson D, Dietz WH. Shifts in percentiles of growth during early childhood: analysis of longitudinal data from the California Child Health and Development Study. *Pediatrics*. 2004;113(6):e617-27.
- [30] Landau-Crangle E, Rochow N, Fenton TR, Liu K, Ali A, So HY, et al. Individualized Postnatal Growth Trajectories for Preterm Infants. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2018;42(6):1084-92.
- [31] Rochow N, Raja P, Liu K, Fenton T, Landau-Crangle E, Göttler S, et al. Physiological adjustment to postnatal growth trajectories in healthy preterm infants. *Pediatric research*. 2016;79(6):870-9.
- [32] Cooke RJ, Ainsworth SB, Fenton AC. Postnatal growth retardation: a universal problem in preterm infants. *Archives of disease in childhood Fetal and neonatal edition*. 2004;89(5):F428-30.6.
- [33] Su BH. Optimizing nutrition in preterm infants. *Pediatrics and neonatology*. 2014;55(1):5-13.
- [34] Ehrenkranz RA, Younes N, Lemons JA, Fanaroff AA, Donovan EF, Wright LL, et al. Longitudinal growth of hospitalized very low birth weight infants. *Pediatrics*. 1999;104(2 Pt 1):280-9.
- [35] Fenton TR, Anderson D, Groh-Wargo S, Hoyos A, Ehrenkranz RA, Senterre T. An Attempt to Standardize the Calculation of Growth Velocity of Preterm Infants-Evaluation of Practical Bedside Methods. *The Journal of pediatrics*. 2018;196:77-83.
- [36] Ehrenkranz RA, Dusick AM, Vohr BR, Wright LL, Wrage LA, Poole WK. Growth in the neonatal intensive care unit influences neurodevelopmental and growth outcomes of extremely low birth weight infants. *Pediatrics*. 2006;117(4):1253-61.
- [37] Demerath EW, Johnson W, Davern BA, Anderson CG, Shenberger JS, Misra S, et al. New body composition reference charts for preterm infants. *The American journal of clinical nutrition*. 2017;105(1):70-7.
- [38] Hamatschek C, Yousuf EI, Möllers LS, So HY, Morrison KM, Fusch C, et al. Fat and Fat-Free Mass of Preterm and Term Infants from Birth to Six Months: A Review of Current Evidence. *Nutrients*. 2020;12(2).
- [39] Kashyap S, Forsyth M, Zucker C, Ramakrishnan R, Dell RB, Heird WC. Effects of varying protein and energy intakes on growth and metabolic response in low birth weight infants. *The Journal of pediatrics*. 1986;108(6):955-63.

- [40] Kashyap S, Ohira-Kist K, Abildskov K, Towers HM, Sahni R, Ramakrishnan R, et al. Effects of quality of energy intake on growth and metabolic response of enterally fed low-birth-weight infants. *Pediatric research*. 2001;50(3):390-7.
- [41] Ramel SE, Demerath EW, Gray HL, Younge N, Boys C, Georgieff MK. The relationship of poor linear growth velocity with neonatal illness and two-year neurodevelopment in preterm infants. *Neonatology*. 2012;102(1):19-24.
- [42] Ramel SE, Gray HL, Christiansen E, Boys C, Georgieff MK, Demerath EW. Greater Early Gains in Fat-Free Mass, but Not Fat Mass, Are Associated with Improved Neurodevelopment at 1 Year Corrected Age for Prematurity in Very Low Birth Weight Preterm Infants. *The Journal of pediatrics*. 2016;173:108-15.
- [43] Ramel SE, Haapala J, Super J, Boys C, Demerath EW. Nutrition, Illness and Body Composition in Very Low Birth Weight Preterm Infants: Implications for Nutritional Management and Neurocognitive Outcomes. *Nutrients*. 2020;12(1).
- [44] Belfort MB, Gillman MW, Buka SL, Casey PH, McCormick MC. Preterm infant linear growth and adiposity gain: trade-offs for later weight status and intelligence quotient. *The Journal of pediatrics*. 2013;163(6):1564-9.e2.
- [45] Uthaya S, Thomas EL, Hamilton G, Doré CJ, Bell J, Modi N. Altered adiposity after extremely preterm birth. *Pediatric research*. 2005;57(2):211-5.
- [46] Eriksson JG, Forsén T, Tuomilehto J, Winter PD, Osmond C, Barker DJ. Catch-up growth in childhood and death from coronary heart disease: longitudinal study. *Bmj*. 1999;318(7181):427-31.
- [47] Choi A, Fusch G, Rochow N, Sheikh N, Fusch C. Establishment of micromethods for macronutrient contents analysis in breast milk. *Matern Child Nutr*. 2015;11(4):761-72.
- [48] Fusch G, Rochow N, Choi A, Fusch S, Poeschl S, Ubah AO, et al. Rapid measurement of macronutrients in breast milk: How reliable are infrared milk analyzers? *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*. 2015;34(3):465-76.
- [49] Fusch G, Choi A, Rochow N, Fusch C. Quantification of lactose content in human and cow's milk using UPLC-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2011;879(31):3759-62.
- [50] Kashyap S, Ohira-Kist K, Abildskov K, Towers HM, Sahni R, Ramakrishnan R, et al. Effects of quality of energy intake on growth and metabolic response of enterally fed low-birth-weight infants. *Pediatric research*. 2001;50(3):390-7.
- [51] Kashyap S, Towers HM, Sahni R, Ohira-Kist K, Abildskov K, Schulze KF. Effects of quality of energy on substrate oxidation in enterally fed, low-birth-weight infants. *The American journal of clinical nutrition*. 2001;74(3):374-80.



- [52] Kashyap S, Schulze KF, Ramakrishnan R, Dell RB, Heird WC. Evaluation of a mathematical model for predicting the relationship between protein and energy intakes of low-birth-weight infants and the rate and composition of weight gain. *Pediatric research*. 1994;35(6):704-12.
- [53] Lee H, Padhi E, Hasegawa Y, Larke J, Parenti M, Wang A, et al. Compositional Dynamics of the Milk Fat Globule and Its Role in Infant Development. *Front Pediatr*. 2018;6:313.
- [54] Ziegler EE. Meeting the nutritional needs of the low-birth-weight infant. *Ann Nutr Metab*. 2011;58 Suppl 1:8-18.
- [55] Sabatier M, Garcia-Rodenas CL, Castro CA, Kastenmayer P, Vigo M, Dubascoux S, et al. Longitudinal Changes of Mineral Concentrations in Preterm and Term Human Milk from Lactating Swiss Women. *Nutrients*. 2019;11(8).
- [56] Michalski MC, Briard V, Michel F, Tasson F, Poulain P. Size distribution of fat globules in human colostrum, breast milk, and infant formula. *J Dairy Sci*. 2005;88(6):1927-40.
- [57] Bergner EM, Shypailo R, Visuthranukul C, Hagan J, O'Donnell AR, Hawthorne KM, et al. Growth, Body Composition, and Neurodevelopmental Outcomes at 2 Years Among Preterm Infants Fed an Exclusive Human Milk Diet in the Neonatal Intensive Care Unit: A Pilot Study. *Breastfeed Med*. 2020.
- [58] Hair AB, Patel AL, Kiechl-Kohlendorfer U, Kim JH, Schanler RJ, Hawthorne KM, et al. Neurodevelopmental outcomes of extremely preterm infants fed an exclusive human milk-based diet versus a mixed human milk + bovine milk-based diet: a multi-center study. *Journal of perinatology: official journal of the California Perinatal Association*. 2022;42(11):1485-8.
- [59] Gross SJ, David RJ, Bauman L, Tomarelli RM. Nutritional composition of milk produced by mothers delivering preterm. *The Journal of pediatrics*. 1980;96(4):641-4.
- [60] Pajewska-Szmyt M, Sinkiewicz-Darol E, Gadzała-Kopciuch R. The impact of environmental pollution on the quality of mother's milk. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2019;26(8):7405-27.10.
- [61] V. H. Insektizide und Polychlorierte Biphenyle (PCBs) in der Muttermilch, Kuhmilch und Milchprodukten in Deutschland-Ost und -West vor und nach der Wiedervereinigung - ein Vergleich mit der aktuellen Situation. *Acta Acad Sci*. 2019;17:29–56.
- [62] Oliveira MM, Aragon DC, Bomfim VS, Trevilato TMB, Alves LG, Heck AR, et al. Development of a human milk concentrate with human milk lyophilizate for feeding very low birth weight preterm infants: A preclinical experimental study. *PLoS One*. 2019;14(2):e0210999.
- [63] Tanriverdi S, Koroglu O, Uygur Ö, Yalaz M, Kultursay N. Evaluation of macronutrient content of fresh and frozen human milk over 6 months. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2021;34(12):1875-82.
- [64] Orbach R, Mandel D, Mangel L, Marom R, Lubetzky R. The Effect of Deep Freezing on Human Milk Macronutrients Content. *Breastfeed Med*. 2019;14(3):172-6.

[65] Nessel I, Khashu M, Dyall SC. The effects of storage conditions on long-chain polyunsaturated fatty acids, lipid mediators, and antioxidants in donor human milk - A review. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2019;149:8-17.

[66] Howland V, Klaedtke M, Ruhnau J, Dhople VM, Grabe HJ, Völker U, et al. Impact of Storage Conditions on the Breast Milk Peptidome. *Nutrients*. 2020;12(9).

## 9 Anhang

### 9.1 Wissenschaftliche Arbeit

#### **Individualized Target Fortification of Breast Milk: Optimizing Macronutrient Content Using Different Fortifiers and Approaches**

Stephanie Fusch<sup>1,2</sup>, Gerhard Fusch<sup>3</sup>, Efraim I. Yousuf<sup>3</sup>, Markus Rochow<sup>4</sup>, Hon Yiu So<sup>5</sup>, Christoph Fusch<sup>3,6</sup> and Niels Rochow<sup>3,6,7</sup>

<sup>1</sup> Department of Pediatrics, University Medicine Greifswald, Greifswald, Germany, <sup>2</sup> Department of Pediatrics, Kantonsspital Aarau AG, Aarau, Switzerland, <sup>3</sup> Department of Pediatrics, McMaster University, Hamilton, ON, Canada, <sup>4</sup> Carl-Thiem-Hospital, Cottbus, Germany, <sup>5</sup> Department of Mathematics and Statistics, Oakland University, Rochester, MI, United States, <sup>6</sup> Department of Pediatrics, General Hospital, Paracelsus Medical University, Nuremberg, Germany, <sup>7</sup> Department of Pediatrics, Rostock University Medical Center, Rostock, Germany

Front. Nutr., 21 September 2021

Sec. Clinical Nutrition

Volume 8 - 2021 | <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.652641>



# Individualized Target Fortification of Breast Milk: Optimizing Macronutrient Content Using Different Fortifiers and Approaches

Stephanie Fusch<sup>1,2</sup>, Gerhard Fusch<sup>3</sup>, Efraim I. Yousuf<sup>3</sup>, Markus Rochow<sup>4</sup>, Hon Yiu So<sup>5</sup>, Christoph Fusch<sup>3,6</sup> and Niels Rochow<sup>3,6,7\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Pediatrics, University Medicine Greifswald, Greifswald, Germany, <sup>2</sup> Department of Pediatrics, Kantonsspital Aarau AG, Aarau, Switzerland, <sup>3</sup> Department of Pediatrics, McMaster University, Hamilton, ON, Canada, <sup>4</sup> Carl-Thiem-Hospital, Cottbus, Germany, <sup>5</sup> Department of Mathematics and Statistics, Oakland University, Rochester, MI, United States, <sup>6</sup> Department of Pediatrics, General Hospital, Paracelsus Medical University, Nuremberg, Germany, <sup>7</sup> Department of Pediatrics, Rostock University Medical Center, Rostock, Germany

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Sharon Groh-Wargo,  
Case Western Reserve University,  
United States

### Reviewed by:

Miguel Saenz De Pipaon,  
University Hospital La Paz, Spain  
Amy Hair,  
Baylor College of Medicine,  
United States  
David Adamkin,  
University of Louisville, United States

### \*Correspondence:

Niels Rochow  
rochow@nprmmcmaster.ca

### Specialty section:

This article was submitted to  
Clinical Nutrition,  
a section of the journal  
Frontiers in Nutrition

Received: 12 January 2021

Accepted: 05 August 2021

Published: 21 September 2021

### Citation:

Fusch S, Fusch G, Yousuf EI, Rochow M, So HY, Fusch C and Rochow N (2021) Individualized Target Fortification of Breast Milk: Optimizing Macronutrient Content Using Different Fortifiers and Approaches. *Front. Nutr.* 8:652641. doi: 10.3389/fnut.2021.652641

**Background:** Native breast milk composition displays significant inter- and intra-individual variation which persists after standard fortification with fixed doses and challenges target fortification. This study aims to analyze the macronutrient composition of different commercially available fortifiers and the effect of different fortification strategies on nutritional intake of preterm infants.

**Methods:** In 103 preterm infants, native breast milk samples were collected from 24-h feeding batches ( $n = 3,338$ ) and fat, protein and carbohydrate contents were analyzed. Nutrient content was compared for breast milk that had undergone either (i) standard fortification, (ii) targeted fortification, (iii) selective batching according to breast milk composition, or (iv) partial lyophilization. For (i) eight commercially available standard fortifiers were tested. Targeted fortification (ii) involved the addition of single component modulars of either protein, fat or carbohydrates to standard fortified breast milk. Using a mathematical growth model, the combined effect of protein, fat and carbohydrate intake on growth was assessed. The best composition of standard fortifiers as the initial step for target fortification was explored assuming three clinical scenarios for milk analysis.

**Results:** Macronutrient content was highly variable between native breast milk samples, and this variation was still present after standard fortification, however at elevated macronutrient levels. Standard fortification, breast milk batching, as well as partial lyophilization of human milk resulted in deficient and imbalanced enteral intakes in a significant proportion of infants. Target fortification reduced this variation in a, respectively, higher percentage of samples. The effect size was dependent on the number of measurements per week. The optimum composition of standard fortifiers was dependent on the clinical scenario (measurement frequency) for target fortification.

**Conclusions:** To provide precise and accurate intakes of macronutrients, breast milk should be target fortified. Standard fortified breast milk can result in excess

above recommended intakes of some macronutrients which limits the efficiency of target fortification. Standard fortifiers with improved composition are needed for target fortification.

**Keywords:** human milk, milk analysis, standard fortification, fat, carbohydrates, protein, preterm infants, growth

## INTRODUCTION

Between 43 and 97% of preterm infants experience postnatal growth restriction (1, 2). Adequate nutrition of preterm infants is known to improve neurodevelopmental outcomes in later life and to reduce the risk of chronic cardiovascular and metabolic diseases in adulthood (3–8). For term infants, breast milk is considered as the optimal source of nutrition. It provides macronutrients such as proteins, fat, carbohydrates (carbs), as well as micronutrients that include vitamins and minerals. Breast milk is also known to have positive immunomodulatory and psychological effects and reduces the risk of developing many diseases like respiratory tract infections and allergic diseases (9, 10). Preterm infants fed breast milk during hospitalization in neonatal intensive care units (NICUs) have a lower risk of developing infections and necrotizing enterocolitis (4, 11–18). However, for preterm infants to reach intrauterine growth rates (19), in general higher amounts of nutrients are needed, which cannot be obtained solely from native breast milk [Figure 1] (1).

Fortification of native breast milk is routinely used to meet clinical recommendations of enteral nutrient intake (20). Various types of fortification methods are used to increase the macronutrient content of breast milk. Standard fortification assumes an average composition of breast milk and aims to improve nutrient intake by adding a fixed dose of fortifier to native breast milk (Figure 1). However, because native breast milk shows significant inter- and intraindividual variation of nutrient contents, this fortification strategy is frequently leading to an unbalanced intake (21–23). This will result in suboptimal growth, but in clinical routine it usually will take a few days to recognize and adjust intake—valuable time that is lost for appropriate growth. Adjustable fortification is an alternative approach originally reported to adjust protein intake based on blood urea nitrogen levels. However, the adjustment of deficient nutrients is delayed because it reacts on dynamics of metabolic response to an inappropriate supply (24, 25). Conversely, target fortification aims to provide infants with fortified breast milk that adheres to current clinical recommendations for macronutrient intake. Based on actual measurements of macronutrient contents in native breast milk, one-component modulars of either protein, fat or carbs are added to standard fortified breast milk to reach targeted macronutrient levels (Figure 1). While this process is the most accurate and allows infants to be fed the prescribed dose of macronutrients, it is also the most time-consuming method (26–28).

In the current paper, we examine differences in macronutrient contents of native breast milk samples and the impact of standard and targeted fortification on this variation when using different standard fortifiers and analysis schedules. Further, in this study

we aimed (1) to identify the best composition of a standard fortifier for three clinical scenarios for target fortification; (2) to analyze the effect of fortification on infant's growth based on established growth models; and (3) to study pre-fortification approaches to optimize the macronutrient content by batching and lyophilization.

## MATERIALS AND METHODS

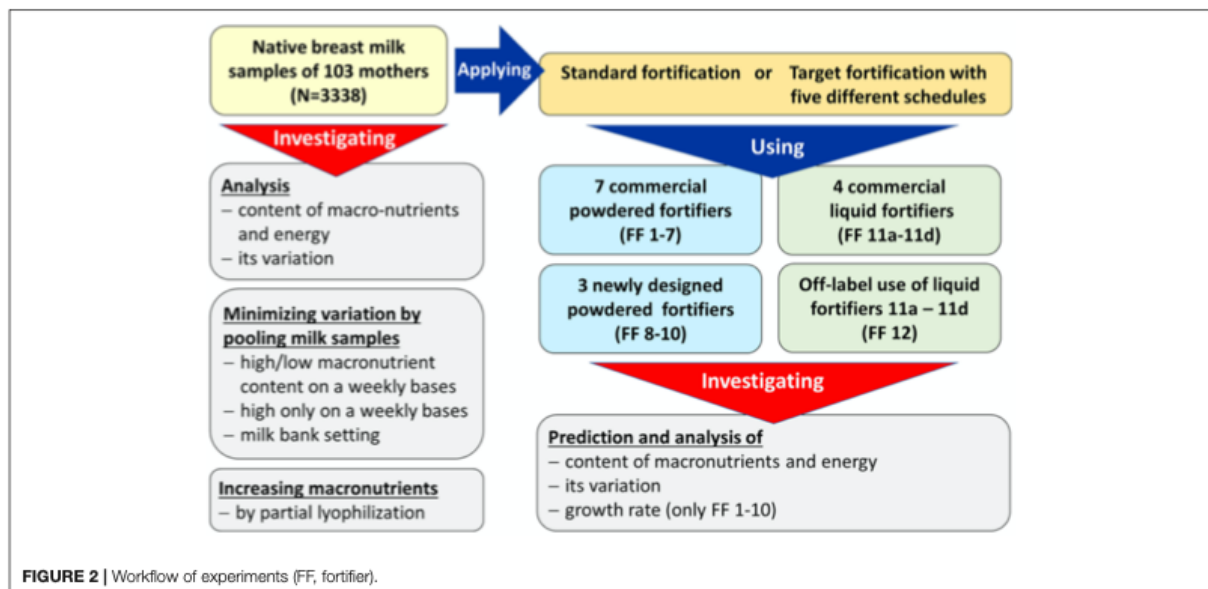
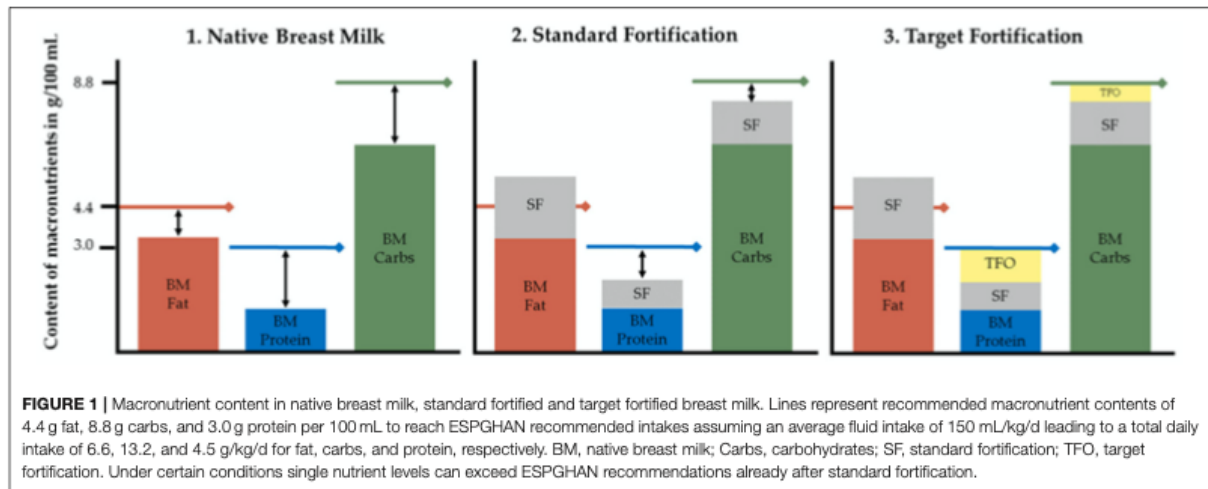
### Study Design and Study Population

This modeling study is a secondary analysis of a dataset obtained during a randomized controlled clinical trial (RCT) which was conducted between November 2012 and July 2016 at the Division of Neonatology (Level-III NICU) at McMaster Children's Hospital (Hamilton, Ontario, Canada) (28). The purpose of this RCT was to study the effect of target fortification of breast milk on growth, metabolism and neurodevelopmental outcomes using three single macronutrient modular products and compare it to standard fortification. The study was approved by Research Ethics Board of McMaster University (#12-109). All parents gave informed written consent prior to inclusion into the study. The flowchart of performed experiments is outlined in Figure 2.

### Sample Collection and Breast Milk

Samples were collected from pooled batches ( $n = 3,338$ ) of 24-h feedings before breast milk was fortified. Batches were usually prepared from frozen milk of the own mother (MOM) and—depending on the level of available MOM—supplemented with pasteurized frozen human donor milk. Data from 103 preterm infants born at a mean gestational age of  $27.0 \pm 1.5$  weeks (birth weight  $980 \pm 240$  g, head circumference  $25.1 \pm 2.7$  cm, and length  $34.7 \pm 3.3$  cm) were available. Fortification (and subsequent collection of breast milk samples) began at day of life  $21 \pm 6$  and continued over an average period of  $33$  days  $\pm 10$  days. Each study participant provided samples covering at least 14 consecutive days. The native breast milk samples were stored at  $-20^\circ\text{C}$  until milk analysis.

Breast milk samples were analyzed using validated methods. Samples were thawed and homogenized using a sonicator for 15 s (VCX 130; Chemical Instruments AB, Sollentuna, Sweden). Content of true protein and fat was determined by a validated near-infrared milk analyzer (SpectraStar; Unity Scientific, Brookfield, Connecticut) (29, 30). Lactose was measured using an established reference method (UPLC-MS/MS) in order to avoid crossover from non-digestible carbohydrates, i.e., human oligosaccharides (31).



## Descriptive Analysis of Breast Milk Content and Macronutrient Targets After Fortification

Levels of fat, protein, carbohydrate, and lactose [g/100 mL] were measured in all native breast milk samples. The energy content (kcal/100 mL) was calculated using energy equivalents which assume that protein and carbs yield 4 kcal/g and that fat yields 9 kcal/g of energy, respectively (Atwater factor) (32). Additionally, the protein-to-energy ratio (P:E ratio, [g protein/100 kcal]) (33) and the ratio of total carbohydrate energy vs. non-protein energy was calculated (carbs/NPE, %) (34) for native breast milk as well as for all fortified variations.

Target macronutrient intake for preterm infants <1,000 g of birth weight were defined according to the guidelines of the European Society for Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition (ESPGHAN): 4.5 g/kg/d protein, 6.6 g/kg/d fat, and 13.2 g/kg/d carbs (20). With an assumed daily fluid intake of 150 mL/kg/d, nutrient contents of enteral feeds then translate to 3 g of protein, 4.4 g of fat, 8.8 g of carbohydrates per 100 mL of feeds. Achieving the recommended amounts of macronutrients would result in 87 kcal/100 mL, a protein -to-energy (P:E) ratio of 3.5 g/100 kcal and carbohydrate-to-NPE ratio of 47%.

## Standard Fortifier

In this study, seven commercially available multicomponent powdered standard fortifiers (fortifiers 1–7) with different

compositions were used. Each of them provides 1.0–1.5 g of extra protein per 100 ml thereby comprising comparable energy intakes. Based on their non-protein composition, they can be divided into three groups: (i) low-fat/high-carbohydrate, (ii) medium-fat/medium-carbohydrate, and (iii) high-fat/low-carbohydrate content (Table 1). For each 24 h-feeding, final macronutrient levels, energy content and corresponding ratios were calculated for all fortifiers.

In a second step, the optimum macronutrient composition for standard fortification was identified based on three different scenarios for milk analysis as described below (fortifiers 8–10). Composition was optimized for each macronutrient to minimize the deviation between fortified breast milk content and ESPGHAN recommended intake by minimizing the residual sum of squares. In a next step, the performance of fortifiers was evaluated for the three different measurement scenarios. Fortifier 8 represents a fortifier that was optimized for standard fortification only, i.e., no measurement of macronutrients in native breast milk. Fortifiers 9 and 10 were optimized for target fortification using either one breast milk analysis per week (occurring on Monday) or three breast milk analyses per week (occurring on Monday, Wednesday, Friday), respectively.

Further, the macronutrient intake for human milk based liquid fortifiers (fortifiers 11a-d and 12) were also calculated. Fortifiers 11a to 11d represent the different preparation strengths (20–50 mL). Fortifiers 11 and 12 represent the same product, however, fortifier 12 uses different volumes as an off-label clinical approach.

### Target Fortification

Target fortification was calculated using three steps (Figure 1). First, macronutrient contents of native breast milk samples were analyzed (methods see paragraph Sample Collection and Breast Milk). In a second step, a standard fortifier (as described below) was added to native 24-h breast milk batches. Third, based on the measurement of the macronutrient content of breast milk, single component modulars containing either protein, fat and/or carbohydrates were added to standard fortified breast milk to achieve the recommended enteral macronutrient intake. The amount of required modulars was calculated by subtracting the standard fortified breast milk content for fat, protein, and carbs from the ESPGHAN recommended targets (20, 26). Further details and a model calculation have been previously described (28). In cases where the amount of a macronutrient already exceeded the recommendations after standard fortification, this macronutrient was not further fortified; the others were adjusted through the addition of modular products.

### Schedules for Target Fortification

For the target fortification approach, we tested five different schedules for milk analysis and simulated the resulting macronutrient concentrations using fortifiers 1–12 (Table 2).

### Target Fortification With Liquid Fortifier

Macronutrient intakes achieved by using commercially available human milk based liquid fortifiers were also investigated. Different from powdered fortifiers, all liquid fortifiers inherently

TABLE 1 | Macronutrients added at recommended doses of fortifiers to obtain 100 mL of ready-to-feed breast milk, <sup>a</sup>g per portion, <sup>b</sup>kcal per portion (carbs, carbohydrates; LF, liquid fortifier).

Fortifier group	Standard multicomponent powdered fortifier										Liquid fortifier based on human milk			
	Low-fat/high-carbs		Medium-fat/medium-carbs		High-fat/low-carbs		Optimized standard fortifier				11a	11b	11c	11d
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10				
Ratio of LF: breast milk	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	20:80	30:70	40:60	50:50
Fat (g/100 mL)	0	0.02	0.72	0.36	0.7	0.7	1	0.77	0	0	1.8*	2.7*	3.6*	4.5*
Protein (g/100 mL)	1.1	1	1.4	1	1.3	1.5	1.1	1.85	1.54	1.26	1.2*	1.8*	2.4*	3*
Carbohydrates (g/100 mL)	2.7	3.3	1.3	1.8	1.5	0.01	0.4	2.13	0.99	0.45	1.8*	2.8*	3.6*	4.6*
Energy (kcal/100 mL)	15	18	17	14	17	13	14	23	10	7	28 <sup>§</sup>	42 <sup>§</sup>	56 <sup>§</sup>	71 <sup>§</sup>

**TABLE 2 |** Different schedules of target fortification analysis and recipe adjustment (BM—pooled native breast milk batch for 24 h feeding).

Approach		Monday BM batch	Tuesday BM batch	Wednesday BM batch	Thursday BM batch	Friday BM batch	Saturday BM batch	Sunday BM batch
1/week	Analysis	X						
	Recipe	Mo	Mo	Mo	Mo	Mo	Mo	Mo
2/week	Analysis	X			X			
	Recipe	Mo	Mo	Mo	Th	Th	Th	Th
3/week	Analysis	X		X		X		
	Recipe	Mo	Mo	We	We	Fr	Fr	Fr
5/week	Analysis	X	X	X	X	X		
	Recipe	Mo	Tu	We	Th	Fr	Fr	Fr
7/week	Analysis	X	X	X	X	X	X	X
	Recipe	Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su

"X" indicates the day of milk analysis. Same colors indicate the same recipe for target fortification.

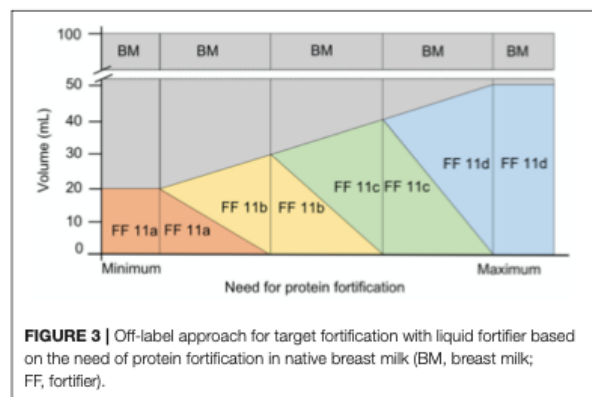
will replace a specific volume of native breast milk. For example, for a final feeding volume of 100 mL, 20 mL of fortifier product will be added to 80 mL breast milk. To achieve higher strengths of fortification the ratio of fortifier-to-breast milk needs to be increased (from 20:80 to 30:70, 40:60, or 50:50 v/v e.g.). In this study, four different fortifier strengths were studied consisting of the following composition per 100 ml of ready-to-feed-batches: 20 mL (fortifier 11a), 30 mL (fortifier 11b), 40 mL (fortifier 11c), and 50 mL (fortifier 11d). All four different liquid fortifier products contain identical macronutrient concentrations (g/mL). The 10 mL- increase in the volume ratio of fortifier to breast milk leads to an incremental increase in protein by ~0.6 g, fat by ~0.9 g, and carbohydrates by ~1.0 g per 10 mL of fortifier.

The following approaches were applied and referred to as fortifier 11 in the analyses: (1) Standard fortification with liquid fortifier: an average protein content of 1.2 g/100 mL in native breast milk was assumed. Fortifier 11b (30:70 v/v ratio) which increases the protein content by 1.8 g/100 mL was chosen as reference fortifier because it represents the fortifier which is most frequently used in clinical routine. (2) For target fortification: Breast milk analysis was performed and the extra protein content needed to reach 3 g/100 mL was calculated. Based on the analysis, the fortifier (11a to 11d) was chosen that was most appropriate to reach the protein target range of 2.8–3.4 g/100 mL. In the final step, fat and carbohydrate content—if below target—were adjusted by adding single component modular products to meet ESPGHAN recommended intake (20).

### Off-Label Use of Liquid Fortifier for Target Fortification

Switching between the four different strengths of the HM based liquid fortifiers (11a, 11b, 11c, and 11d) will lead to stepwise increase of protein and macronutrients intake. To allow a more continuous increase fortifiers were dosed in an off-label approach to achieve ESPGHAN recommendations. This approach is categorized as fortifier 12.

For this off-label approach, target fortification was performed by measuring breast milk macronutrient content and native breast milk batches were adjusted to final target protein concentration of 3 g/100 mL. For native breast milk with a



**FIGURE 3 |** Off-label approach for target fortification with liquid fortifier based on the need of protein fortification in native breast milk (BM, breast milk; FF, fortifier).

protein content of  $\geq 1.8$  g/100 mL, liquid fortifier 11a was used as a 20: 80 ratio (i.e., ratio of fortifier: native BM). For native breast milk with a protein content of  $\geq 1.2$  to 1.8, the liquid fortifier was 11a was used as the base component and fortifier 11b was added to reach a protein content of 3 g/100 mL. In this case, the ratio between the volume of fortifier 11a and 11b was 2:3 or, as expressed in volume referred to a ready to feed volume of 100 mL, 20 ml of fortifier 11a would be replaced by 15 ml of fortifier 11b, consequently, the volume of native milk needs to be reduced by this amount. For native breast milk with a protein content of  $\geq 0.6$  to  $< 1.2$  g/100 mL, fortifier 11b constituted the base fortifier and fortifier 11c was added in a ratio of 3:4. For native breast milk with a protein content of  $\geq 0$  to  $< 0.6$  g/100 mL, fortifier 11c formed the base component and fortifier 11d was added in a ratio of 4:5 (Figure 3).

After target fortification of protein, the final step of adjusting fat to 4.4 g/100 mL and carbs to 8.8 g/100 mL was performed using modular products.

### Identification of Feeds With Insufficient Macronutrient Intake

Because of the natural intra- and interindividual variation of breast milk macronutrient composition standard fortification



(i.e., without milk analysis) will always result in over- or under-fortification of a significant number of breast milk samples. To investigate the magnitude of this inherent weakness feeds with inappropriate macronutrient composition shall be identified applying principles of nutritional physiology. Levels of all three macronutrients and energy as well as ratios of protein-to-energy as well as carbohydrate energy-to-non-protein energy were incorporated into an established prediction equation for growth velocity (33–35). Feeds resulting in growth deviating for more than 1 g/kg/d from expected target weight gain velocity would be considered as inappropriate (33–35). To calculate the daily growth of the study infants depending on the nutritional intake routine feeding volumes of 150 mL/kg/d were assumed and the weight gain velocity was calculated per body weight (g/kg body weight per day).

Two nutritional physiological approaches were considered. The base equation was derived from Kashyap et al. (35). This equation considered the effects of protein and energy on growth rates (Equation 1).

$$\text{weight gain velocity} = 0.095 \cdot \text{energy intake} + 3.6 \cdot \text{protein intake} - 0.00468 \cdot \text{BW} + 1.699 \quad (1)$$

with energy intake as [kcal/kg/d], protein intake as [g/kg/d] and birth weight (BW) as (g). For our calculations a constant birth weight of 1,000 g was assumed.

Growth rates are mainly determined by protein and energy intakes, but nutritional studies have shown that variations of the carbohydrate-to-non-protein energy ratio significantly modulate growth rates (33, 34). This impact is quantified by using a metabolic factor given in Equation (2). The equation was obtained from regression analysis performed on previously published growth data of preterm infants fed with same amount of protein and calories, however with different carbohydrate to non-protein energy ratios (33, 34). Combining both equations into one leads to Equation (3) combining the impact of all three macronutrients on weight gain

$$\text{Metabolic factor} = 0.7757 + \left( 0.47 \cdot \frac{\text{Carbs energy}}{\text{NPE energy}} \right) \quad (2)$$

$$\text{Target weight gain velocity} = (0.095 \cdot \text{Energy intake} + 3.6 \cdot \text{Protein intake} - 0.00468 \cdot \text{BW} + 1.699) \cdot \left( 0.7757 + \left( 0.47 \cdot \frac{\text{Carbs energy}}{\text{NPE energy}} \right) \right) \quad (3)$$

Target weight gain velocity was defined using (Equation 3) thereby assuming ESPGHAN recommended intakes for an infant with a body weight of 1,000 g (4.5 g/150 mL protein, 6.6 g/150 mL fat, and 13.2 g/150 mL carbohydrate), the target weight gain velocity was defined. Macronutrient composition of single feeds was considered as “inadequate” if the estimated weight gain velocity was >1 g/kg/d above or below the target weight.

Human milk based liquid fortifiers were not included in this analysis due to insufficient reference data. Additionally, the fat phase from human milk might have different physiological effects when compared with fat in formula (36).

## Optimization of Macronutrient Content in Native Breast Milk to Reduce the Variation Simulation of Selection and Combination of Specific Native Breast Milk Samples

To investigate whether the natural variation of breast milk can be reduced, pairs of breast milk samples from the same mother with matching macronutrient content shall be pooled. Length of pooling intervals was set to alternating between  $n = 6$  and  $n = 8$  days (~1 week) to allow paired matching. The interval length was chosen assuming a minimum number of frozen milk samples during the major part of a NICU stay available to prepare feedings. Within each group BM samples were sorted by one macronutrient (either fat, protein, carbs) or by energy content in ascending order. Assuming identical volumes (e.g., 100 mL), as a next step two or three samples were pooled using two different approaches:

(i) *Averaging macronutrient by combining breast milk samples with high and low macronutrient content:* According to the selected macronutrient, pairs of samples (the highest and the lowest value, the second highest and second lowest, proceeding continuously) were pooled. Pooled samples were split into two of equal volume.

(ii) *Combining breast milk samples with the highest macronutrient content:* The three samples containing the highest amounts of the selected macronutrient were mixed and divided into equal samples containing a volume of 100 mL each. The remaining three or five batches were not included into further analysis (see discussion).

The content and variation of fat, protein, carbohydrates, and energy were calculated for each of the resulting batches.

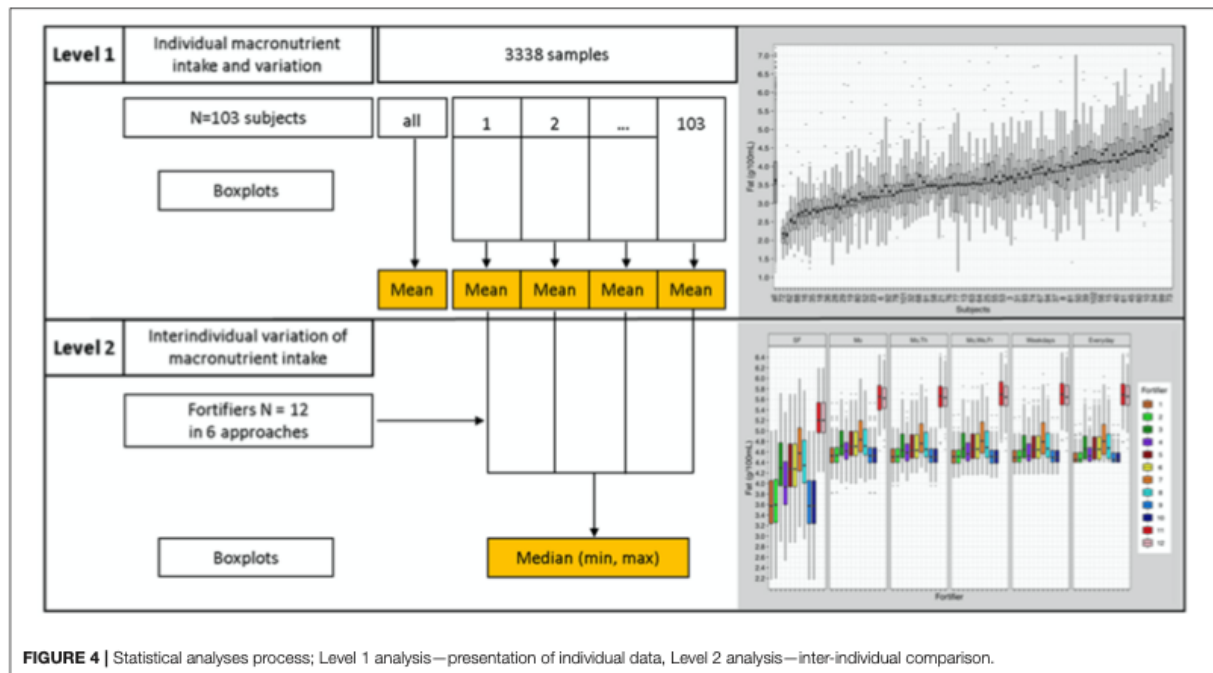
## Random Milk Pooling to Reduce the Variation of Macronutrients

This simulation addresses the question whether random pooling of native breast milk samples will be able to reduce the variability of macronutrients and, if so, which would be the most efficient set size. For this purpose, a defined number of native breast milk batches were randomly drawn from the original data set of 3,338 batches, were pooled and the resulting content of protein, fat, and carbohydrates was calculated. For any given set size, this step of random allocation was repeated 1,000 times and mean

and SD were calculated to serve as an estimate of the most likely distribution of nutrient contents after pooling. Set size started at  $n = 1$  and was increased up to  $n = 996$  with increments of  $n = 5$ . Cut-off criterium for efficiency was the minimum set size needed to reduce protein content below 10% variability.

## Optimizing Macronutrient Content by Lyophilization (Freeze-Drying)

This simulation uses partial lyophilization to up-concentrate the breast milk content. Separate analyses were done for protein, fat, and carbohydrates as the leading macronutrient to determine



**FIGURE 4 |** Statistical analyses process; Level 1 analysis—presentation of individual data, Level 2 analysis—inter-individual comparison.

the amount of water to be removed to meet ESPGHAN recommendations at a h feeding volume of 150 mL/kg/d (20). Up-concentrated compositions of the other two macronutrients were calculated using the “new” hydration factor.

## Statistics

Descriptive statistics for the macronutrient content of native breast milk and the different approaches to target fortification were calculated using R version 3.5.3 (2019-03-11, R Development Core Team 2019).

Level 1 analysis analyzed individual data. For each subject ( $n = 103$ ), mean, standard deviation, median, interquartile range, quantile distance  $Q_{0.1}$ - $Q_{0.9}$ , and boxplots were calculated (Figure 4).

Level 2 analysis employed an interindividual analysis. Results from “Level 1 analysis” were used to assess interindividual differences (Figure 4). Level 2 analysis compared and evaluated means and quantile distances from each subject ( $n = 103$ ) of the “Level 1 analysis.” Boxplots and descriptive statistics were generated.

## RESULTS

### Native Breast Milk Analysis and Description

Overall, the fat, protein, and lactose content of native breast milk showed high inter- and intra-individual variation and a high range of macronutrient content or composition (Table 3).

At the intra-individual level, native breast milk samples from the same mother were also found to vary in macronutrient

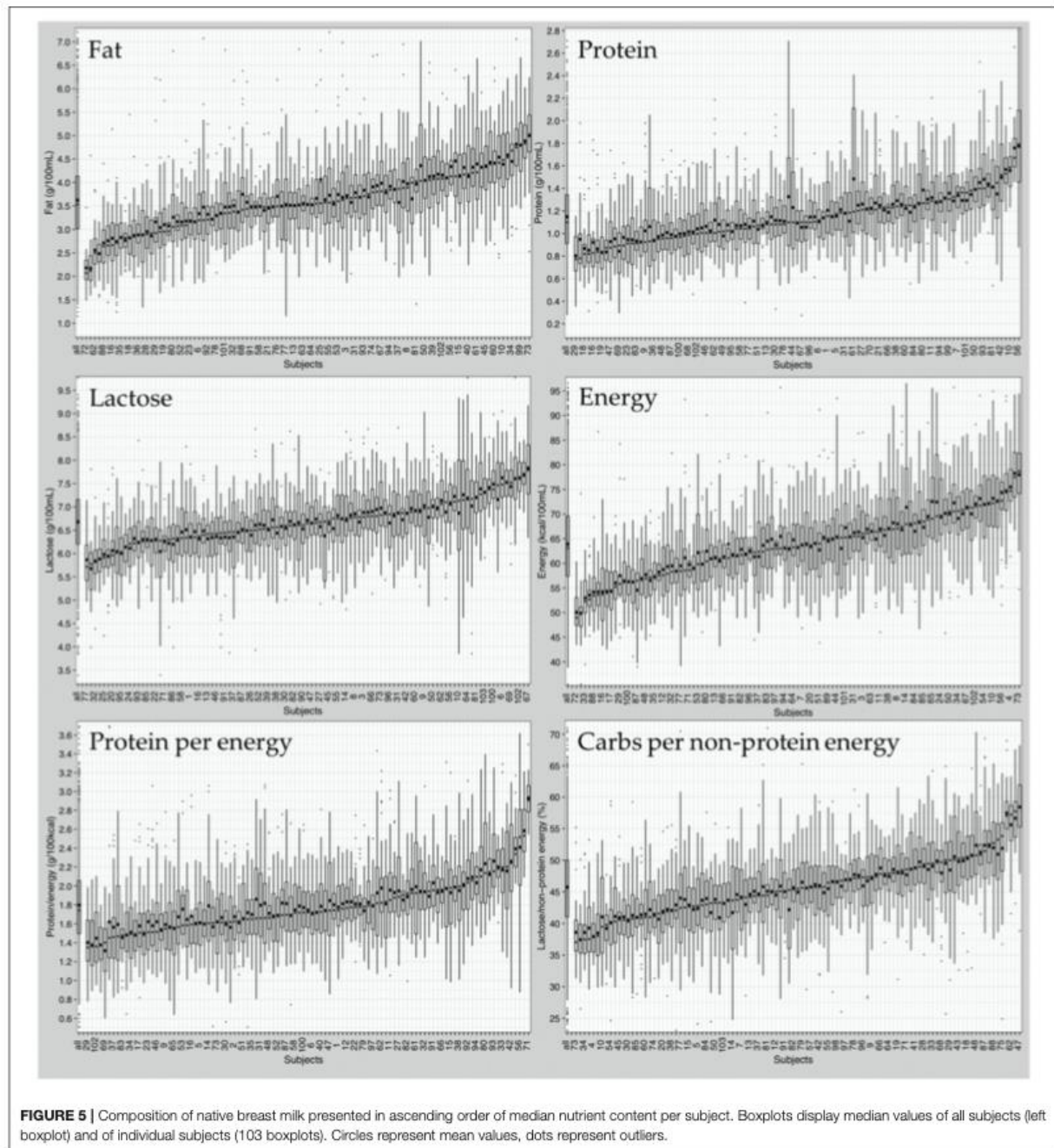
**TABLE 3 |** Macronutrient content of  $n = 3,338$  native breast milk samples from  $n = 103$  subjects.

	Mean $\pm$ SD	Range
Fat (g/100 mL)	3.6 $\pm$ 0.9	1.5–7
Protein (g/100 mL)	1.1 $\pm$ 0.3	0.3–2.5
Lactose (g/100 mL)	6.7 $\pm$ 0.8	4.0–9.0
Energy (kcal/100 mL)	64 $\pm$ 9	40–95
Protein:Energy (g/100 kcal)	1.8 $\pm$ 0.4	0.8–3.3
Carbs/NPE (%)	46 $\pm$ 7	25–70

Carbs, carbohydrate; NPE, non-protein energy; Carbs/NPE, carbohydrate energy/carbohydrate energy + fat energy.

composition (Figure 5). Boxplots depicting infant macronutrient content were sorted in ascending order of the subject’s median fat, protein, and lactose content. The order of subject IDs was found to be different between the three macronutrients (Figure 5). This suggests that fat, protein and lactose content were not correlated with one another. For instance, mothers who had breast milk with high levels of fat did not necessarily have high protein or lactose content in their milk.

In addition to the variation in median macronutrients, the range of macronutrient content was also highly variable between individuals. Independent of the median macronutrient concentration, breast milk samples with low median protein content could have large interquartile ranges, while breast milk samples with high median

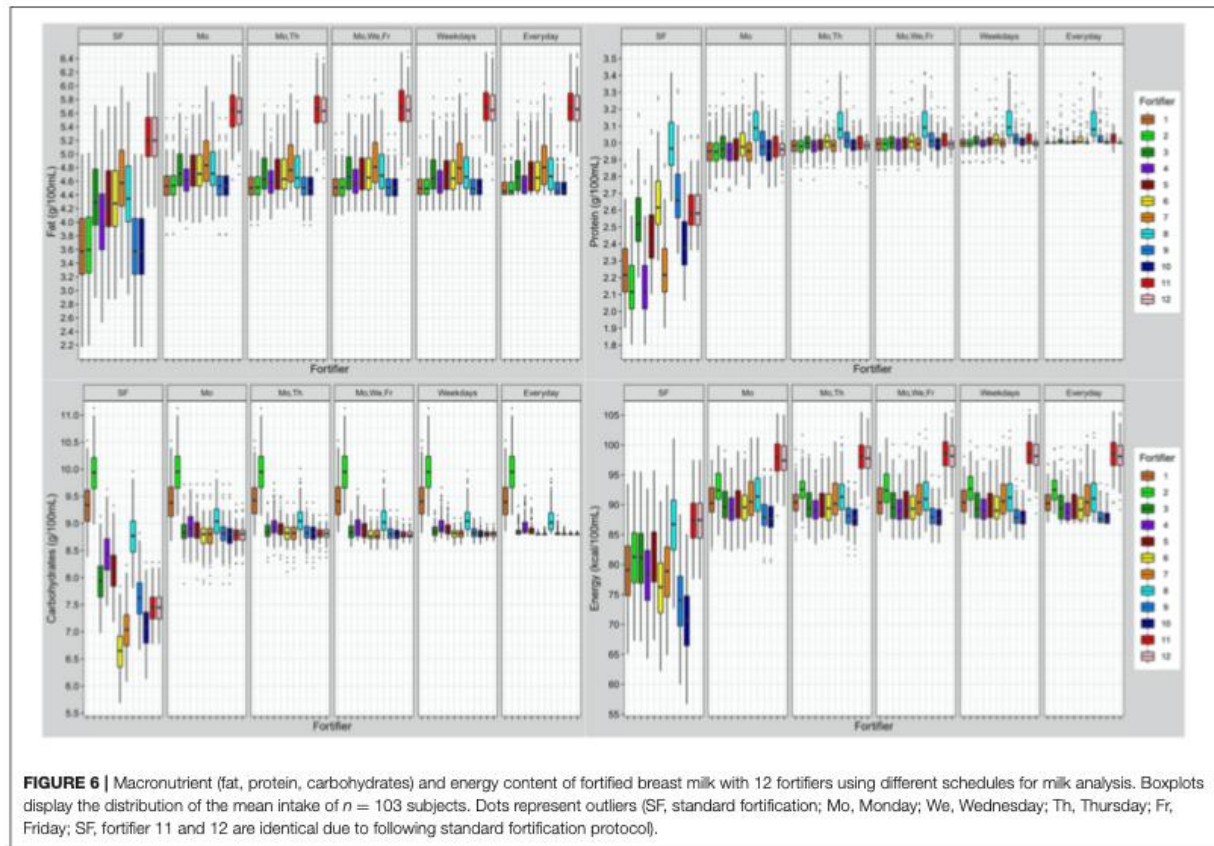


protein content could show small interquartile ranges or vice versa.

Moreover, the high variation was also observed in calculated parameters like “Protein to Energy Ratio” and “Carbohydrate Energy per Non-Protein Energy” (Supplementary Tables 1, 2).

### Commercially Available Multicomponent Standard Fortifier (Fortifier 1–7 and 11)

Standard fortified breast milk. Overall, all commercially available standard fortifiers did not meet recommended nutrient intakes for preterm infants (Figure 6). In most cases, the protein content



**FIGURE 6 |** Macronutrient (fat, protein, carbohydrates) and energy content of fortified breast milk with 12 fortifiers using different schedules for milk analysis. Boxplots display the distribution of the mean intake of  $n = 103$  subjects. Dots represent outliers (SF, standard fortification; Mo, Monday; We, Wednesday; Th, Thursday; Fr, Friday; SF, fortifier 11 and 12 are identical due to following standard fortification protocol).

was below the target (median of 2.1–2.6 g/100 mL instead of 3.0 g/100 mL). For fat and carbohydrate levels results were dependent from the type of fortifier used. For low-fat/high-carbohydrates fortifiers (fortifiers #1 and #2) breast milk batches ended up with median fat levels below 3.6 g/100 mL, and with median carbohydrate levels from 9.3 to 9.9 g/100 mL thus exceeding ESPGHAN recommendations. For medium-fat/medium-carbohydrate fortifiers (fortifiers #3, #4, and #5), median fat and carbohydrate contents were in the range of the recommended intake, however, a significant number of batches still had insufficient carbohydrate content. In the high-fat/low-carbohydrates group (fortifiers #6 and #7), median fat content exceeded recommendations (4.3–4.6 g/100 mL), while median carbohydrate content ranged between 6.7 and 7.1 g/100 mL, i.e., below the recommendations (Figure 7). Median energy intake as well as protein to energy ratio (P:E ratio) were also below the targets. The percentage of carbohydrate energy per non-protein energy (Carbs/NPE) was lowest in the high-fat/low-carbs group (fortifiers #6 and #7) (Table 4). Further details are presented in the Supplementary Figures 1, 3.

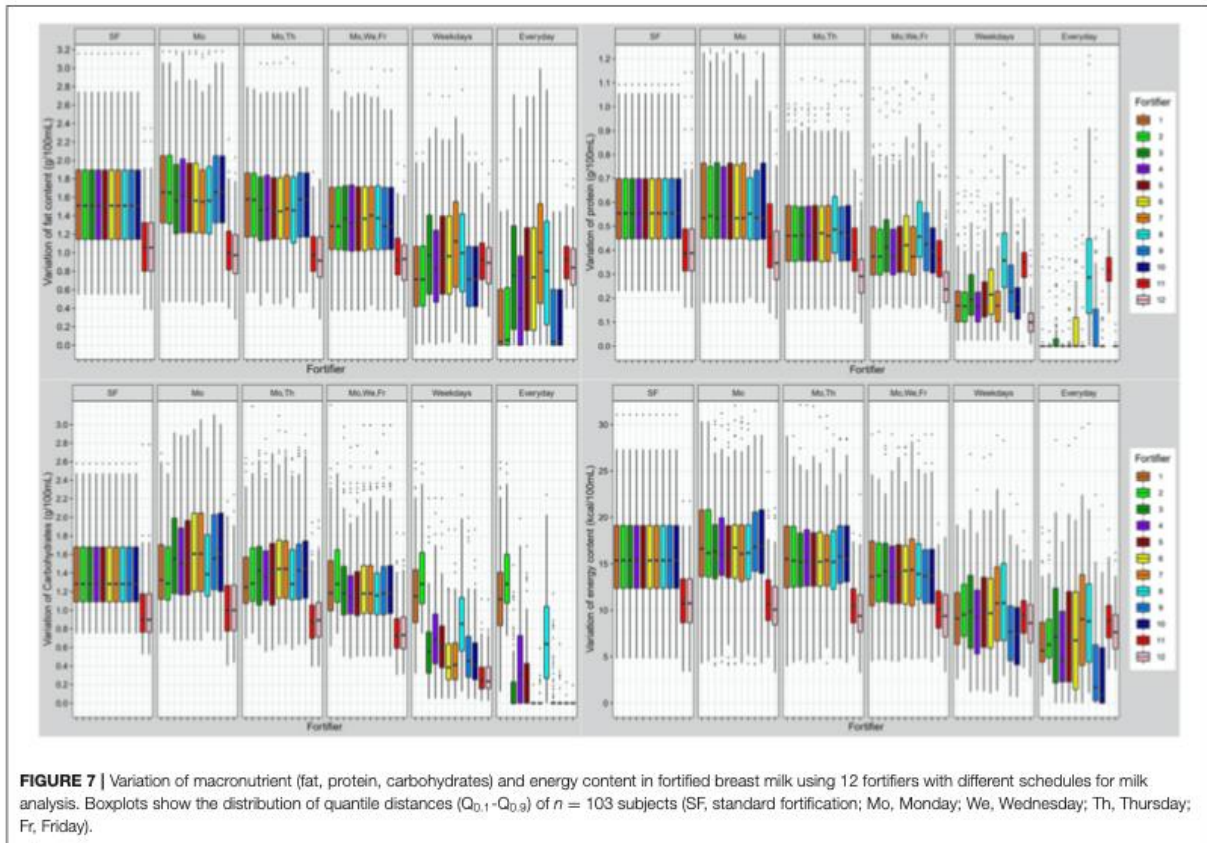
When using the liquid fortifier (#11b), the median fat content exceeded the recommended intake by  $\sim 0.8$  g/100 mL (Figure 6) while median protein (2.6 g/100 mL) and carbohydrate (7.5 g/100 mL) content were close to ESPGHAN recommendations.

However, the median energy content (88 kcal/100 mL) was higher compared to standard powder fortified breast milk (76–81 kcal/100 mL).

Overall, breast milk standard fortified with fortifier 11 still showed a high individual variation of macronutrients. The individual variation (Quantile range  $Q_{0.1}$ – $Q_{0.9}$ ) was 0.6 g/100 mL for protein, 1.5 g/100 mL for fat, 1.3 g/100 mL for carbohydrates, and 15 kcal/100 mL for energy. Due to the volume displacement, the use of liquid fortifier (#11b) decreased the variation of macronutrients (protein: 0.4; fat: 1.1; carbohydrates: 0.9 g/100 mL; and energy: 11 kcal/100 mL) when compared to powdered fortifiers (Figure 7).

### Optimized Standard Fortifier (Fortifiers #8, #9, and #10)

Using the macronutrient data obtained from all 3,338 breast milk samples, the optimum composition of a standard fortifier for three given measurement schedules (none vs. once vs. three times per week) was calculated (fortifier 8–10). For all three measurement schedules final macronutrient content of breast milk batches fortified with the corresponding optimized fortifier were then computed (Table 1). Macronutrient composition was found to be different for each of the three optimized fortifiers. Fortifier 8 (standard fortification, no measurements) had the



**TABLE 4 |** Energy ratio of standard fortified breast milk (median) compared to ESPGHAN recommendation achieved with  $\sim 150$  mL/kg/d milk intake, carbs, carbohydrate; P:E ratio, protein to energy ratio; Carbs/NPE, carbohydrate energy per non-protein energy.

	ESPGHAN targets	Standard fortifier by non-protein composition		
		Low-fat/high-carbs	Medium-fat/medium-carbs	High-fat/low-carbs
Energy (kcal)*	130	119–122	117–122	114–119
P:E ratio (g/100 kcal)	3.5	2.6–2.8	2.7–3.2	2.8–3.5
Carbs/NPE (%)	47	54–55	45–49	41

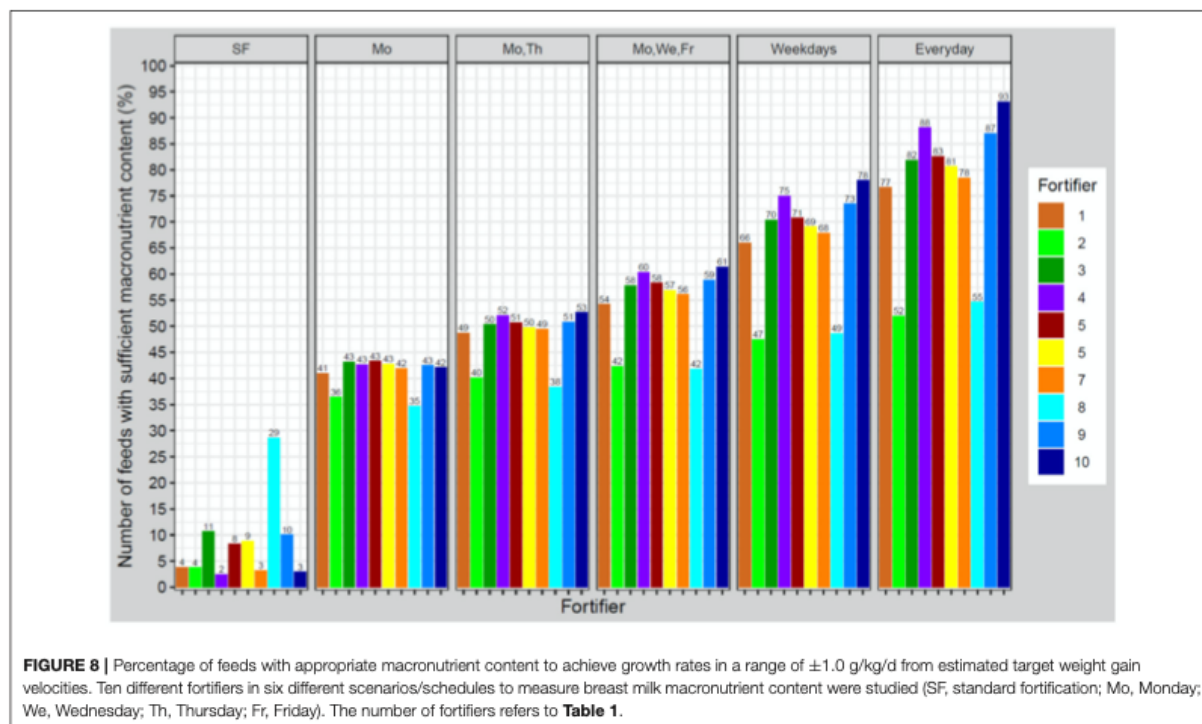
highest macronutrient and energy content (fat 0.8 g, protein 1.9 g, carbs 2.1 g, energy 23 kcal) and on average provided ESPGHAN recommended intakes. However, intra- and interindividual variation of standard fortified breast milk remained unchanged compared to that of native breast milk. As a result, many breast milk batches had macronutrient compositions that were above or below recommendations or had unbalanced ratios, i.e., P:E or carbohydrate-to-non-protein-energy.

Fortifiers 9 and 10 shall serve as base fortifiers for target fortification with either one measurement per week or 3 measurements per week, respectively. Macronutrient levels decreased with increasing measurement frequency. Interestingly, they did not require the addition of fat. Since fat content was highly variable and exceeded recommendations in a significant

number of breast milk batches routinely adding more fat seems to be quite unreasonable. As a consequence of this approach, administering any extra fat by single macronutrient modular is not required in  $\sim 40\%$  of the feeds. Compared to fortifier 9, fortifier 10 added lower amounts of protein (1.3 vs. 1.5 g) and carbohydrates (0.5 vs. 1.0 g).

### Target Fortified Breast Milk

Overall, target fortification was able to achieve ESPGHAN recommended intakes. Target fortification based on just one breast milk analysis per week provided a median macronutrient intake that met recommended levels. However, some residual day-to-day variation remained. A clinically significant reduction



in macronutrient variation was found when target fortification was based on three or more measurements per week (**Figure 7**).

Target fortification using low-fat/high-carbohydrate standard fortifiers (fortifiers #1 and #2) led to some milk samples exceeding the recommended carbohydrate content without extra modular macronutrients being added, while the use of high-fat/low-carbs fortifiers (fortifiers #6 and #7) resulted in fat levels that exceeded recommendations. In these samples target fortification was not able to reduce the macronutrient variation as well as to achieve recommended intakes. The fortifier optimized for three measurements (fortifier #10) came the closest to ESPGHAN recommended intakes for three or more measurements. The highest precision and accuracy of nutrient intake was reached with daily measurements.

The use of the liquid fortifier (#11) led to median fat (5.6 g/100 mL) and energy (97 kcal/100 mL) levels that were above the recommended intake. The use of liquid fortifier also reduced the variability of macronutrient content due to volume displacement [see also last paragraph of chapter Commercially Available Multicomponent Standard Fortifier (Fortifier 1–7 and 11)] One measurement per week for target fortification achieved a lower variation when compared with powdered fortifiers.

Detailed data about energy intake, protein per energy ratio as well as carbohydrate energy per non-protein energy are presented in **Supplementary Figures 2–4**.

### Assessment of Achieved Macronutrient Intake at Standardized Tolerance Range

In a next step, we were aiming to evaluate the quality of nutrient supply provided by the different fortification regimes. For this purpose, rather than assess the quality of each single nutrient intake separately, we focused on the effect of the composite intake on growth. Growth is a function of the intake of all three macronutrients therefore we applied an established growth model to estimate ELBW infant growth rates assuming a fixed intake of 150 mL/kg/d for all fortification approaches (20, 33–35). Growth rates achieved by ESPGHAN recommended intakes were considered to be the reference data.

Applying standard fortification, most samples led to growth rates below the defined tolerance range of  $\pm 1$  g/kg/d. The optimized standard fortifier, i.e., no breast milk analysis (fortifier 8) lead to adequate growth in about 30% of the feeds. Using target fortification, a higher number of fortified batches met the tolerance range as the number of measurements per week increased. About 40% were inside the growth range when applying one measurement per week. The percentage of appropriately fortified samples increased in increments of  $\sim 10\%$  along with the number of measurements per week. The highest accuracy hit the optimized fortifier with one (fortifier 9) or three (fortifier 10) measurements per week of 87–93% (**Figure 8**).

**TABLE 5** | Reduction of variation of fat in native breast milk samples of  $n = 103$  subjects, when matching native breast milk batches containing the highest and the lowest macronutrient content, the second highest and the second lowest values, proceeding continuously were combined.

Matching criterium	Variation of macronutrient content in batched native breast milk			
	Fat (g/100 mL)	Protein (g/100 mL)	Lactose (g/100 mL)	Energy (kcal/100 mL)
None	1.5 (0.5, 3.4)	0.6 (0.2, 1.6)	1.3 (0.7, 4.0)	15 (5, 31)
Fat	0.7 (0.5, 1.0)	0.4 (0.3, 0.6)	1.0 (0.8, 1.2)	7.8 (6.2, 10.2)
Protein	1.0 (0.8, 1.4)	0.3 (0.2, 0.5)	0.9 (0.8, 1.2)	10.7 (8.8, 13.9)
Lactose	1.1 (0.8, 1.4)	0.4 (0.3, 0.6)	0.6 (0.5, 0.8)	10.8 (8.2, 14.3)
Energy	0.8 (0.6, 1.0)	0.4 (0.3, 0.6)	0.9 (0.8, 1.2)	7.4 (5.2, 9.9)

Data show median and interquartiles of ranges  $Q_{0.1}$ - $Q_{0.9}$  (quantile) (level 2 analysis). Colors highlight the effect of matching on the selected macronutrient compared with native breast milk, yellow - fat, red - protein, green - lactose, blue - energy.

**TABLE 6** | Increase of the macronutrient content in native breast milk samples of  $n = 103$  subjects, breast milk samples were selected in groups of 6 or 8 consecutive samples and ordered by either energy, fat, protein, and lactose content.

Matching criterium	Macronutrient content in native breast milk batches			
	Fat (g/100 mL)	Protein (g/100 mL)	Lactose (g/100 mL)	Energy (g/100 mL)
None	3.5 (3.0, 4.1)	1.1 (0.9, 1.3)	6.7 (6.2, 7.2)	63 (57, 70)
Fat	4.1 (3.6, 4.6)	1.2 (1.1, 1.3)	6.6 (6.3, 7.0)	69 (64, 73)
Protein	3.7 (3.3, 4.2)	1.3 (1.1, 1.4)	6.6 (6.3, 6.9)	65 (62, 71)
Lactose	3.6 (3.1, 4.1)	1.1 (1.0, 1.3)	7.0 (6.7, 7.4)	65 (60, 70)
Energy	4.0 (3.6, 4.6)	1.2 (1.1, 1.3)	6.8 (6.4, 7.1)	69 (64, 73)

Samples containing the three highest values were combined. Values present median and interquartiles ( $Q_{25}$ ,  $Q_{75}$ ) of mean macronutrient of native breast milk (Level 2 analysis). Colors highlight the effect of matching on the selected macronutrient compared with native breast milk, yellow - fat, red - protein, green - lactose, blue - energy.

## Optimization of Macronutrient Content in Native Breast Milk to Reduce the Variation Selection and Combination of Specific Native Breast Milk Samples

Combining samples with opposite extremes [see Methods section Simulation of Selection and Combination of Specific Native Breast Milk Samples (i)] based on one macronutrient (fat, protein, or lactose) or on energy resulted in a decrease in variation of more than 50% for the selected macronutrient, while the other macronutrients showed a smaller decrease in variation. When samples were combined according to energy content, the variation for fat, protein and carbohydrates decreased by 47, 33, and 31%, respectively (Table 5).

For the second approach, i.e., pooling breast milk samples with the highest content of either protein or carbohydrates or fat [see Methods section Simulation of Selection and Combination of Specific Native Breast Milk Samples (ii)] increased the selected macronutrient content by 9–15%. However, when ordered by energy or fat, the average macronutrient intake improved for the other macronutrients by 9–13% (Table 6). This approach showed only a minimal reduction in macronutrient variation (data not shown).

## Simulation of a Milk Bank Setting by Pooling Native Breast Milk

Pooling of at least 150 random breast milk samples is needed to reduce the variation of macronutrients to below  $\pm 10\%$  ( $\sim 0.3$  g). Figure 9 shows the effects on the variation of fat. Similar

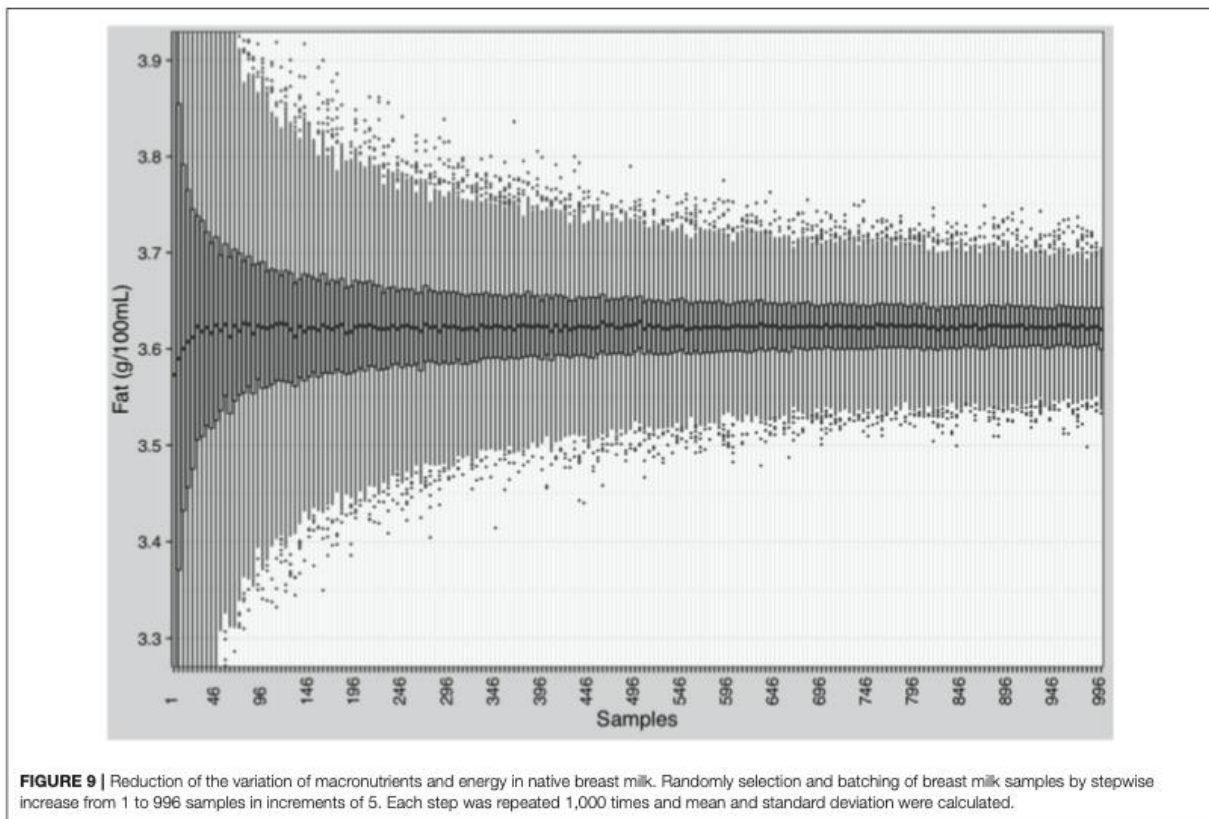
effects were observed for protein, carbohydrates, and energy (Supplementary Figure 5).

## Optimizing Macronutrient Content by Partial Lyophilization (Freeze-Drying)

Various factors for partial lyophilization were tested by up-concentrating native breast milk samples to achieve recommended ESPGHAN intakes for macronutrients and energy (Table 7). No lyophilization factor (i.e., hydration factor) could be identified which would achieve recommended levels for all macronutrients in individual batches by using native breast milk. When protein is adjusted to the target level, fat and carbohydrate intakes will be by far too high (energy content of 262 kcal/100 mL). When carbohydrate levels are adjusted to target levels, fat intake will be too high whereas protein intakes would be too low.

## DISCUSSION

This study confirms the presence of considerable intra- and inter-individual variation of native breast milk composition with no relationship between macronutrients. This challenges the ability of fortification strategies to achieve recommended intakes. While standard fortification with fixed doses increases the macronutrient content of native breast milk, it does not reduce its variation and the associated risk of unbalanced intakes. Only target fortification, based on at least two breast milk analyses per week in combination with an optimized standard



**TABLE 7 |** Macronutrient levels in native breast milk (BM) in 150 mL fluid intake.

	Lyophilization factor	Final macronutrient level			
		Fat (g)**	Protein (g)**	Carbs (g)**	Energy (kcal)**
Native breast milk/ESPGHAN	1.0	5.4	1.7	10.1	96
<b>Target macronutrient per kg/d</b>					
Fat [6.6 g*]	1.2	6.6	2.0	12.3	117
Protein [4.5 g*]	2.7	14.7	4.5	27.4	262
Carbs [13.2 g*]	1.3	7.1	2.2	13.2	126
Energy 135 [kcal*]	1.4	7.6	2.3	14.1	135

Recommended nutritional intake based on ESPGHAN guidelines reached applying freeze-drying by required lyophilization factor. BM, breast milk; carbs, carbohydrates. A green cell indicates the parameter used for adjustment.

\*Target intake per kg per day.

\*\*Amount per 150 mL breast milk.

Blue—values below ESPGHAN targets for macronutrient content, red—values above targets, and green—within targets.

fortifier (fortifiers #9, #10), was able to provide macronutrient intakes that adhered to the recommendations of nutritional committees (20).

Evaluation of milk analysis of 3,338 samples and eight commercially available fortifier shows that standard fortified breast milk meets nutritional requirements as suggested by

ESPGHAN in <12% of all feeds. Based on our data, we suggest a “new” optimized standard fortifier in order to meet these recommendations [see chapter Optimized Standard Fortifier (fortifiers #8, #9, and #10)]. The composition of this fortifier differs from current commercially available fortifiers. The optimized fortifier increases the number of appropriately



fortified batches; however, 70% of feeds will still have a more or less unbalanced composition of fat, protein, or carbohydrates. In conclusion, standard fortification is not suited to reduce the significant macronutrient variation of breast milk for all preterm infants, and instead transfers the degree of imbalance to higher macronutrient levels (27, 30, 37). It is of interest to note that liquid fortifiers, as opposed to powdered fortifiers, will reduce macronutrient variation: replacement of up to 50% of the volume of breast milk using a fortifier with defined composition will reduce the natural variability to the same degree.

Target fortification reduces the high macronutrient variation of standard fortified breast milk and improves deficient macronutrient content depending on the frequency of native breast milk measurements per week: one measurement per week will allow fortified breast milk to reach the average recommended macronutrient intake, although some intra-individual variation remained. Two or more measurements per week decrease the variation significantly. The best performance was achieved by daily measurements, however, with significantly increased clinical workload. This finding is comparable to our recently published randomized controlled trial, which also suggested to perform two or more weekly breast milk measurements to meet recommended macronutrient intakes and reduce variation (27).

The efficiency of target fortification depends on the composition of the standard product used as base fortifier (Figure 1). Target fortification reduces macronutrient deficiencies in breast milk by adding modular macronutrient products to standard fortified breast milk based on breast milk analysis. However, target fortification cannot reduce a macronutrient that exceeds target levels already after standard fortification as observed for lactose and fat (see Figure 6; lactose: fortifier #1 and #2; fat: fortifier #6, #7, and #8). This has important implications for the nutrient profile of standard fortifiers used in clinical scenarios with target fortification. All commercially available standard fortifiers add between 1 and 1.5 g protein to 100 mL of human milk which rarely leads to protein levels above target leaving room for fine-tuning by adding extra protein. However, their impact on fat, carbohydrate, and eventually energy levels is less consistent because their non-protein composition is quite heterogeneous. Basically, commercially available standard fortifiers can be classified into (i) low-fat/high-carbohydrate, (ii) medium-fat/medium-carbs, or (iii) high-fat/low-carbohydrate containing products. Hence, each group of fortifiers presents a different likelihood for inadequate or excessive intake of macronutrients. Fortifiers with medium-fat/medium-carbs composition provide the most balanced results. In many samples, high-fat/low-carbs fortifiers achieved fat levels above the recommended intake and low carbs levels, whereas low-fat/high-carbs fortifiers provided carbs levels above the recommendations and low-fat intakes (Figure 6).

In this present study, we propose an optimized composition for base fortifiers to reach recommended intakes with feeding volumes of 150 mL/kg/d of milk for most of the batches. The macronutrient composition of these optimized base fortifiers was different if developed for standard (no analysis) or for target (one to three analyses per week) fortification. Neither base fortifier for target fortification should contain fat. Additionally,

the composition of the base fortifier for target fortification was determined by the frequency of breast milk analyses. With three measurements per week, the optimized base fortifier had a lower macronutrient content than the fortifier based on one measurement per week. In an individualized approach with more frequent measurements such lower macronutrient levels are needed to prevent overfortification of native breast milk. Conversely, deficient samples will be corrected by individually adding modular single macronutrient products. In an ideal scenario, milk analysis and adjustment by target fortification would occur daily. Hence, the development of a general base fortifier for target fortification would be oriented to adequately fortify samples with higher macronutrient levels (as this is already the case for protein) and thus contain rather low amounts of non-protein components. Besides that base fortifiers would also focus on the important role to provide preterm infants with micronutrients, electrolytes, vitamins, phosphate, and trace elements. The required fine-tuning with macronutrients (fat, protein, carbs), could then individually be made by single macronutrient modulators only according to the breast milk analysis. Consequently, a modern fortification concept for use in clinical routine would aim to standardize intake on the basis of a biologically valuable base liquid with random composition effect by applying real-time component analysis followed by base fortification with (full) micro- and (partial) macronutrients using an optimized base fortifier plus fine-tuning with three modular for protein, fat and carbohydrates.

Our study demonstrated that the commercial liquid fortifier based on human milk provides higher amounts of fat than powdered standard fortifiers. Most of the samples fortified with the liquid fortifier had a higher fat content than recommended by ESPGHAN. However, from a nutritional point of view, the quality of fat from human milk sources cannot directly be compared to fat from non-human milk. The fat fraction of human milk has a particular composition and is constituted by specific fat globules. These fat globules contain glycerophospholipids, sphingolipids, cholesterol, and proteins (36, 38), which may serve as building blocks for cell membranes and cellular structures and also act as bioactive properties supporting the maturation of the gut and the immune system (36). Further, clinical studies have shown that preterm infants fed a human milk diet, containing human milk fat globules, demonstrate body composition, and neurodevelopmental outcomes comparable to term infants (39). While there seem to be benefits of an exclusive human milk diet for preterm infants, there are no studies that have compared the effects of fat derived from human milk to fat from non-human milk on growth and development of preterm infants.

In the present study we were able to show that selective batching of corresponding breast milk batches and/or up-concentrating by partial freeze drying are not appropriate to reduce the variation in the composition of breast milk and to meet the needs of preterm infants. Two main factors limit the effectiveness of these approaches. First, there is only a weak correlation between fat, protein, and carbs (30). Therefore, when breast milk is optimized for one macronutrient, the other two macronutrients may not necessarily reach recommended targets. Secondly, the ratio between macronutrients in native breast milk

is different compared to the ratio resulting from adhering to recommendations for preterm infants. In native breast milk, the ratio for protein to fat is 1:3.2 and the ratio for protein to carbohydrates is 1:6.1, while nutritional guidelines suggest a ratio for protein to fat of 1:1.5 and for protein to carbohydrates of 1:2.9. Such differences cannot be overcome by simply up-concentrating batches.

These findings have implications for breast milk preparation. Our data show that on a large scale, like in a milk bank setting, batching of a high number of milk samples (>150) has a high likelihood of creating large volume batches with a similar composition and less macronutrient variation. However, even considering that our sample set might provide a higher variability due to early milk vs. mature milk that a milk bank would have in stock, batch sizes would exceed reasonable numbers. However, on an individual level, mixing, and batching of a small number of breast milk batches only from one mother is unlikely to make a difference of clinical significance. To attain an exclusively human milk diet from mother's own milk by freeze-drying is also infeasible: we were able to demonstrate that the lyophilized human milk concentrates generated in this study fail to provide recommended intakes. The degree of up-concentrating native breast milk to optimize protein intake would lead to a significant over-fortification (more than double) of fat and carbohydrates. Further, freeze-drying could negatively affect infant's intake of vitamins and micronutrients (40) and increase the concentration of environmental pollutants (41, 42).

This study suggests that individualized target fortification of breast milk is able to provide an adequate intake of nutrients at recommended intakes with reduced macronutrient variability. In contrast, current practice of standard fortification provides an uncertain, probably sometimes even unsafe intake of imprecisely defined amounts of macronutrients, unlike the administration of parenteral nutrition or medications which requires accurate dosage and where such practice of random composition would be considered as unacceptable. Unbalanced or excessively high or low intakes of macronutrients may only be recognized by growth failure or metabolic disturbances and hence there inherently is a delay in detection. However, an optimal macronutrient composition is needed to achieve desired body composition outcomes. Recent studies have demonstrated that optimized nutrition leads to higher percentages of fat free mass, which is associated with faster neuronal processing, larger brain size and improved motor development (43–46). Unbalanced macronutrient intake, or under- and over-fortification would result in suboptimal utilization of nutrients and increased risk for adverse long-term health and neurodevelopmental outcomes (33, 47–50).

Strengths of this study include the high number of breast milk batches and mothers ( $n = 3,338$  of  $n = 103$  subjects), the daily sample collection for a minimum period of 15 days during the NICU stay, and the use of validated methods to precisely measure macronutrient content of breast milk (28–31). Unlike other studies which often present total carbohydrates only (sum of lactose and oligosaccharides), we precisely measured lactose in breast milk using UPLC-MS-MS, allowing us to calculate energy intake without confounding by oligosaccharides. Further, we followed good clinical and laboratory practices

guidelines (GCPL) for milk collection, storage, and analysis (28, 51). However, our study also had limitations. Based on the recommendations for macronutrient intake for ELBW infants (birth weight <1,000 g), we studied the achieved nutrient levels using different fortification approaches. However, VLBW infants (i.e., birth weight <1,500 g), intrauterine growth restriction or bronchopulmonary dysplasia may have different nutritional needs, but would be similarly affected by the natural variation of breast milk. Clinical studies are required to explore the effects of fortification approaches on growth for different groups of preterm infants. Another limitation of this study is that we collected milk samples from milk batches which were prepared for 24-h feedings as opposed to collecting samples from individual pumping sessions, which may show greater variation in macronutrient content. Our study did not include data about the quality of macronutrients (human milk protein vs. cow's milk protein), fat (human milk fat globules vs. oil from different sources), and carbs (lactose or glucose polymers). Approaches to reduce the macronutrient variation or improve macronutrient content were performed by theoretical calculation and did not consider the effects of sample preparation and workload. Further, we focused on macronutrients and did not consider micronutrients, vitamins, electrolytes, or trace elements.

## CONCLUSIONS

The macronutrient composition of native breast milk varies widely and frequently does not meet the nutritional needs of preterm infants. Batching of native breast milk by using selective strategies as well as concentrating the macronutrients by removing water with freeze-drying is not able to provide the recommended macronutrient intake to all preterm infants. Most commercial standard fortifiers do not achieve ESPGHAN recommended intakes. An optimized fortifier for standard fortification could only reach recommended intake in 30% of feeds. Target fortification reduces the inter- and intraindividual macronutrient variation and can achieve recommended ESPGHAN intake for individual infants. However, the composition of the base fortifier needs to be adjusted for best practice target fortification and is different from a fortifier originally developed for standard fortification. More frequent breast milk measurements and recipe refinement for fortifiers (and modular) to be used in target fortification would improve the macronutrient intake and thus growth.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this article are not readily available because restricted by the Study protocol and Research Ethics Board of McMaster University. Requests to access the datasets should be directed to [kinderzentrum@klinikum-nuernberg.de](mailto:kinderzentrum@klinikum-nuernberg.de).

## ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Research Ethics Board of McMaster University.

Written informed consent to participate in this study was provided by the participants' legal guardian/next of kin.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

CF and NR: conceptualization, methodology. HS, MR, and NR: formal analysis. GF and SF: milk analysis. GF, NR, and SF: data curation. EY, NR, and SF: writing—original draft preparation. CF, MR, NR, and SF: visualization. NR: supervision. CF: project administration. All authors writing—review and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

## FUNDING

This study was partially funded by Canadian Institute of Health Research, #MOP-125883.

## REFERENCES

- Cooke RJ, Ainsworth SB, Fenton AC. Postnatal growth retardation: a universal problem in preterm infants. *Arch Child Fetal Neonatal Ed.* (2004) 89:F428–30. doi: 10.1136/adc.2001.004044
- Su BH. Optimizing nutrition in preterm infants. *Pediatr Neonatol.* (2014) 55:5–13. doi: 10.1016/j.pedneo.2013.07.003
- Barker DJP. The fetal and infant origins of adult disease. *BMJ.* (1990) 301:1111.
- Lucas A, Morley R, Cole TJ, Gore SM, Lucas PJ, Crowle P, et al. Early diet in preterm babies and developmental status at 18 months. *Lancet.* (1990) 335:1477–81.
- Leon DA, Lithell HO, Vagero D, Koupilova I, Mohsen R, Berglund L, et al. Reduced fetal growth rate and increased risk of death from ischaemic heart disease: cohort study of 15 000 Swedish men and women born 1915–29. *BMJ.* (1998) 317:241–5.
- Lucas A, Morley R, Cole TJ. Randomised trial of early diet in preterm babies and later intelligence quotient. *BMJ.* (1998) 317:1481–7.
- Eriksson JG, Forsen T, Tuomilehto J, Osmond C, Barker DJ. Early growth and coronary heart disease in later life: longitudinal study. *BMJ.* (2001) 322:949–53. doi: 10.1136/bmj.322.7292.949
- Ehrenkranz RA, Dusick AM, Vohr BR, Wright LL, Wrage LA, Poole WK. Growth in the neonatal intensive care unit influences neurodevelopmental and growth outcomes of extremely low birth weight infants. *Pediatrics.* (2006) 117:1253–61. doi: 10.1542/peds.2005-1368
- Greer FR, Sicherer SH, Burks AW, Committee on Nutrition and Section on Allergy and Immunology. The effects of early nutritional interventions on the development of atopic disease in infants and children: the role of maternal dietary restriction, breastfeeding, hydrolyzed formulas, and timing of introduction of allergenic complementary foods. *Pediatrics.* (2019) 143:e20190281. doi: 10.1542/peds.2019-0281
- Section on Breastfeeding. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics.* (2012) 129:e827–41. doi: 10.1542/peds.2011-3552
- Lucas A, Cole TJ. Breast milk and neonatal necrotizing enterocolitis. *Lancet.* (1990) 336:1519–23.
- Lonnerdal B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am J Clin Nutr.* (2003) 77:1537–43s. doi: 10.1093/ajcn/77.6.1537S
- Ip S, Chung M, Raman G, Chew P, Magula N, DeVine D, et al. Breastfeeding and maternal and infant health outcomes in developed countries. *Evid Rep Technol Assess Full Rep.* (2007) 1–186.
- Gartner LM, Morton J, Lawrence RA, Naylor AJ, O'Hare D, Schanler RJ, et al. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics.* (2005) 115:496–506. doi: 10.1542/peds.2004-2491

## ACKNOWLEDGMENTS

This paper is dedicated to Dr. Adrien Charles Moessinger (1944–2021), Professor Emeritus (CHUV, Lausanne, Switzerland), Former Director of the Neonatal Intensive Care Units at CHUV (Lausanne) and at Inselspital (Berne) with great respect for his outstanding life work on lung development, introducing nasal CPAP into clinical routine in Central Europe and for planting seeds in young doctors how important nutrition is for positive long-term neurodevelopmental outcome. We would like to thank Tanja Pfitzenmaier for editorial support.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2021.652641/full#supplementary-material>

- O'Connor DL, Gibbins S, Kiss A, Bando N, Brennan-Donnan J, Ng E, et al. Effect of supplemental donor human milk compared with preterm formula on neurodevelopment of very low-birth-weight infants at 18 months: a randomized clinical trial. *JAMA.* (2016) 316:1897–905. doi: 10.1001/jama.2016.16144
- Quigley M, Embleton ND, McGuire W. Formula versus donor breast milk for feeding preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev.* (2018) 6:CD002971. doi: 10.1002/14651858.CD002971.pub4
- Chetta KE, Schulz EV, Wagner CL. Outcomes improved with human milk intake in preterm and full-term infants. *Semin Perinatol.* (2021) 45:151384. doi: 10.1016/j.semperi.2020.151384
- Miller J, Tonkin E, Damarell RA, McPhee AJ, Sukanuma M, Sukanuma H, et al. A systematic review and meta-analysis of human milk feeding and morbidity in very low birth weight infants. *Nutrients.* (2018) 10:E707. doi: 10.3390/nu10060707
- Arslanoglu S, Moro GE, Ziegler EE. Preterm infants fed fortified human milk receive less protein than they need. *J Perinatol.* (2009) 29:489–92. doi: 10.1038/jp.2009.50
- Agostoni C, Buonocore G, Carnielli VP, De Curtis M, Darmaun D, Decsi T, et al. Enteral nutrient supply for preterm infants: commentary from the European society of paediatric gastroenterology, hepatology and nutrition committee on nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* (2010) 50:85–91. doi: 10.1097/MPG.0b013e3181adaee0
- Weber A, Loui A, Jochum F, Buhrer C, Obladen M. Breast milk from mothers of very low birthweight infants: variability in fat and protein content. *Acta Paediatr.* (2001) 90:772–5. doi: 10.1111/j.1651-2227.2001.tb02803.x
- Sauer CW, Boutin MA, Kim JH. Wide variability in caloric density of expressed human milk can lead to major underestimation or overestimation of nutrient content. *J Hum Lact.* (2017) 33:341–50. doi: 10.1177/0890334416672200
- Fusch G, Mitra S, Rochow N, Fusch C. Target fortification of breast milk: levels of fat, protein or lactose are not related. *Acta Paediatr.* (2015) 104:38–42. doi: 10.1111/apa.12804
- Arslanoglu S, Moro GE, Ziegler EE. Adjustable fortification of human milk fed to preterm infants: does it make a difference? *J Perinatol.* (2006) 26:614–21. doi: 10.1038/sj.jp.7211571
- Rochow N, Landau-Crangle E, Fusch C. Challenges in breast milk fortification for preterm infants. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* (2015) 18:276–84. doi: 10.1097/mco.0000000000000167
- Rochow N, Fusch G, Choi A, Chessell L, Elliott L, McDonald K, et al. Target fortification of breast milk with fat, protein, and carbohydrates for preterm infants. *J Pediatr.* (2013) 163:1001–7. doi: 10.1016/j.jpeds.2013.04.052

27. Rochow N, Fusch G, Zapanta B, Ali A, Barui S, Fusch C. Target fortification of breast milk: how often should milk analysis be done? *Nutrients*. (2015) 7:2297–310. doi: 10.3390/nu7042297
28. Rochow N, Fusch G, Ali A, Bhatia A, So HY, Iskander R, et al. Individualized target fortification of breast milk with protein, carbohydrates, and fat for preterm infants: a double-blind randomized controlled trial. *Clin Nutr Edinb Scotl*. (2021) 40:54–63. doi: 10.1016/j.clnu.2020.04.031
29. Choi A, Fusch G, Rochow N, Sheikh N, Fusch C. Establishment of micromethods for macronutrient contents analysis in breast milk. *Matern Child Nutr*. (2015) 11:761–72. doi: 10.1111/mcn.12053
30. Fusch G, Rochow N, Choi A, Fusch S, Poeschl S, Ubah AO, et al. Rapid measurement of macronutrients in breast milk: how reliable are infrared milk analyzers? *Clin Nutr*. (2015) 34:465–76. doi: 10.1016/j.clnu.2014.05.005
31. Fusch G, Choi A, Rochow N, Fusch C. Quantification of lactose content in human and cow's milk using UPLC-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. (2011) 879:3759–62. doi: 10.1016/j.jchromb.2011.09.053
32. Carpenter KJ. A short history of nutritional science: part 2 (1885–1912). *J Nutr*. (2003) 133:975–84. doi: 10.1093/jn/133.4.975
33. Kashyap S, Ohira-Kist K, Abildskov K, Towers HM, Sahni R, Ramakrishnan R, et al. Effects of quality of energy intake on growth and metabolic response of enterally fed low-birth-weight infants. *Pediatr Res*. (2001) 50:390–7. doi: 10.1203/00006450-200109000-00015
34. Kashyap S, Towers HM, Sahni R, Ohira-Kist K, Abildskov K, Schulze KF. Effects of quality of energy on substrate oxidation in enterally fed, low-birth-weight infants. *Am J Clin Nutr*. (2001) 74:374–80. doi: 10.1093/ajcn/74.3.374
35. Kashyap S, Schulze KF, Ramakrishnan R, Dell RB, Heird WC. Evaluation of a mathematical model for predicting the relationship between protein and energy intakes of low-birth-weight infants and the rate and composition of weight gain. *Pediatr Res*. (1994) 35:704–12. doi: 10.1203/00006450-199406000-00017
36. Lee H, Padhi E, Hasegawa Y, Larke J, Parenti M, Wang A, et al. Compositional dynamics of the milk fat globule and its role in infant development. *Front Pediatr*. (2018) 6:313. doi: 10.3389/fped.2018.00313
37. Gidrewicz DA, Fenton TR. A systematic review and meta-analysis of the nutrient content of preterm and term breast milk. *BMC Pediatr*. (2014) 14:216. doi: 10.1186/1471-2431-14-216
38. Michalski MC, Briard V, Michel F, Tasson F, Poulain P. Size distribution of fat globules in human colostrum, breast milk, and infant formula. *J Dairy Sci*. (2005) 88:1927–40. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(05)72868-X
39. Bergner EM, Shypailo R, Visuthranukul C, Hagan J, O'Donnell AR, Hawthorne KM, et al. Growth, body composition, and neurodevelopmental outcomes at 2 years among preterm infants fed an exclusive human milk diet in the neonatal intensive care unit: a pilot study. *Breastfeed Med*. (2020) 15:304–11. doi: 10.1089/bfm.2019.0210
40. Gross SJ, David RJ, Bauman L, Tomarelli RM. Nutritional composition of milk produced by mothers delivering preterm. *J Pediatr*. (1980) 96:641–4. doi: 10.1016/S0022-3476(80)80729-3
41. Hesse V. Insektizide und Polychlorierte Biphenyle (PCBs) in der Muttermilch, Kuhmilch und Milchprodukten in Deutschland-Ost und -West vor und nach der Wiedervereinigung - ein Vergleich mit der aktuellen Situation. *Acta Acad Sci*. (2019) 17:29–56.
42. Pajewska-Szmyt M, Sinkiewicz-Darol E, Gadzała-Kopciuch R. The impact of environmental pollution on the quality of mother's milk. *Environ Sci Pollut Res*. (2019) 26:7405–27. doi: 10.1007/s11356-019-04141-1
43. Pfister KM, Gray HL, Miller NC, Demerath EW, Georgieff MK, Ramel SE. Exploratory study of the relationship of fat-free mass to speed of brain processing in preterm infants. *Pediatr Res*. (2013) 74:576–83. doi: 10.1038/pr.2013.138
44. Bell KA, Matthews LG, Cherkerzian S, Palmer C, Drouin K, Pepin HL, et al. Associations of growth and body composition with brain size in preterm infants. *J Pediatr*. (2019) 214:20–26.e2. doi: 10.1016/j.jpeds.2019.06.062
45. Ramel SE, Gray HL, Christiansen E, Boys C, Georgieff MK, Demerath EW. Greater early gains in fat-free mass, but not fat mass, are associated with improved neurodevelopment at 1 year corrected age for prematurity in very low birth weight preterm infants. *J Pediatr*. (2016) 173:108–15. doi: 10.1016/j.jpeds.2016.03.003
46. Pfister KM, Zhang L, Miller NC, Ingolfsson EC, Demerath EW, Ramel SE. Early body composition changes are associated with neurodevelopmental and metabolic outcomes at 4 years of age in very preterm infants. *Pediatr Res*. (2018) 84:713–8. doi: 10.1038/s41390-018-0158-x
47. Singhal A, Cole TJ, Fewtrell M, Kennedy K, Stephenson T, Elias-Jones A, et al. Promotion of faster weight gain in infants born small for gestational age: is there an adverse effect on later blood pressure? *Circulation*. (2007) 115:213–20. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.617811
48. Min JW, Kong KA, Park BH, Hong JH, Park EA, Cho SJ, et al. Effect of postnatal catch-up growth on blood pressure in children at 3 years of age. *J Hum Hypertens*. (2007) 21:868–74. doi: 10.1038/sj.jhh.1002215
49. Ong KK, Kennedy K, Castañeda-Gutiérrez E, Forsyth S, Godfrey KM, Koletzko B, et al. Postnatal growth in preterm infants and later health outcomes: a systematic review. *Acta Paediatr*. (2015) 104:974–86. doi: 10.1111/apa.13128
50. Kashyap S, Forsyth M, Zucker C, Ramakrishnan R, Dell RB, Heird WC. Effects of varying protein and energy intakes on growth and metabolic response in low birth weight infants. *J Pediatr*. (1986) 108:955–63.
51. Kwan C, Fusch G, Rochow N, Fusch C, Kwan C, Fusch G, et al. Milk analysis using milk analyzers in a standardized setting (MAMAS) study: a multicentre quality initiative. *Clin Nutr*. (2020) 39:2121–8. doi: 10.1016/j.clnu.2019.08.028

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Fusch, Fusch, Yousuf, Rochow, So, Fusch and Rochow. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## 9.2 Tabellen

**Tabelle 1:** Zuordnung der verwendeten Fortifier, die in Tabelle 3 und Abbildungen 5 und 6 abgebildet sind.

Nummerierung Fortifier	Name des verwendeten Fortifiers
1	FMS Aptamil (Milupa)
2	FM 85 (Nestlé, alt)
3	FM 85 (Nestlé, neu)
4	Similac (Abbott nutrition)
5	Nutricia (Study fortifier)
6	Infant Vita (DMF)
7	Enfamil (Mead Johnson)
8	TFO-0 SF
9	TFO-1 SF
10	TFO-135 SF
11a	2H2MF (Prolacta)
11b	4H2MF (Prolacta)
11c	6H2MF (Prolacta)
11d	8H2MF (Prolacta)
12	Off label Prolacta

**Tabelle 3:** Frequenzen der Muttermilchanalysen pro Woche und anschließende Targetfortifizierung. Das „X“ verweist auf den Tag der Analyse (MM-Muttermilch, TFO-Targetfortifizierung, Mo-Montag, Di-Dienstag, Mi-Mittwoch, Do-Donnerstag, Fr-Freitag, Sa-Samstag, So-Sonntag)

Vorgehen		Mo	Di	Mi	Do	Fr	Sa	So
		MM Probe	MM Probe	MM Probe	MM Probe	MM Probe	MM Probe	MM Probe
1/Woche	Analyse	X						
	Basis für TFO	Mo	Mo	Mo	Mo	Mo	Mo	Mo
2/Woche	Analyse	X			X			
	Basis für TFO	Mo	Mo	Mo	Do	Do	Do	Do
3/Woche	Analyse	X		X		X		
	Basis für TFO	Mo	Mo	Mi	Mi	Fr	Fr	Fr
5/Woche	Analyse	X	X	X	X	X		
	Basis für TFO	Mo	Di	Mi	Do	Fr	Fr	Fr
7/Woche	Analyse	X	X	X	X	X	X	X
	Basis für TFO	Mo	Di	Mi	Do	Fr	Sa	So

**Tabelle 4:** Makronährstoffgehalt, Energiegehalt sowie das Verhältnis von Protein-zu-Energie und Kohlenhydrat-zu-Nichtproteinenergie in allen Muttermilchproben (n=3338) von 103 verschiedenen Müttern

Muttermilchproben insgesamt			
	Mean ± SD	Median (Q <sub>0.25</sub> , Q <sub>0.75</sub> )	Quantile (Q <sub>0.1</sub> , Q <sub>0.9</sub> )
Fett (g/100 ml)	3.6 ± 0.9	3.5 (3.0, 4.1)	2.6, 4.8
Protein (g/100 ml)	1.1 ± 0.3	1.1 (0.9, 1.3)	0.8, 1.6
Kohlenhydrate (g/100 ml)	6.7 ± 0.8	6.7 (6.2, 7.2)	5.8, 7.7
Energie (kcal/100 ml)	64 ± 9	63 (57, 70)	53, 76
P:E (g/100 kcal)	1.8 ± 0.4	1.7 (1.5, 2.1)	1.3, 2.4
KH/NP-E (%)	46 ± 7	46 (41, 50)	37, 54

**Tabelle 5:** Darstellung der interindividuellen Variabilität und intraindividuellen Variabilität der Makronährstoffe sowie P:E und KH:NPE anhand von Median (min;max)

Variabilität der individuellen Mittelwerte für die verschiedenen Nährstoffgehaltes			
	Interindividuelle Variabilität der Mittelwerte der Mütter Median (min;max)	Intraindividuelle Variabilität dargestellt am	
		intraindividuellen IQR (Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> ) (median; min;max)	intraindividuellen 10-90% Quantile-Range (median; min;max)
Fett (g/100 ml)	3.6 (2.2, 5)	0.8 (0.3, 1.9)	1.5 (0.5, 3.4)
Protein (g/100 ml)	1.1 (0.8, 1.8)	0.3 (0.1, 1.1)	0.6 (0.2, 1.6)
Kohlenhydrate (g/100 ml)	6.6 (5.7, 7.8)	0.7 (0.3, 1.9)	1.3 (0.7, 4.0)
Energie (kcal/100 ml)	64 (50, 78)	8 (2, 18)	15 (5, 31)
P:E (g/100 kcal)	0.4 (0.2, 1.0)	0.8 (0.4, 1.6)	1.8 (1.3, 2.9)
KH/NP-E (%)	46 (37, 58)	6 (3, 13)	12 (6, 26)

**Tabelle 6:** Variation der Makronährstoffkonzentration in g/100ml und des Energiegehaltes in kcal/100ml, Sortierung und Mischen der Proben nach dem höchsten und niedrigsten Wert und so weiter fortlaufend. In der linken Spalte ist die führende Komponente, nach der sortiert wurde und in den folgenden Spalten die resultierende Variation der Konzentration.

Führende Komponente	Variation der Makronährstoffkonzentration in Muttermilch			
	Fett (g/100ml)	Protein (g/100ml)	Laktose (g/100ml)	Energie (kcal/100ml)
Keine	1.5 (0.5, 3.4)	0.6 (0.2, 1.6)	1.3 (0.7, 4.0)	15 (5, 31)
Fett	0.7 (0.5, 1.0)	0.4 (0.3, 0.6)	1.0 (0.8, 1.2)	7.8 (6.2, 10.2)
Protein	1.0 (0.8, 1.0)	0.3 (0.2, 0.5)	0.9 (0.8, 1.2)	10.7 (8.8, 13.9)
Laktose	1.1 (0.8, 1.4)	0.4 (0.3, 0.6)	0.6 (0.5, 0.8)	10.8 (8.2, 14.3)
Energie	0.8 (0.6, 1.0)	0.4 (0.3, 0.6)	0.9 (0.8, 1.2)	7.5 (5.2, 9.9)

**Tabelle 7:** Makronährstoffkonzentration in g/100ml und des Energiegehaltes in kcal/100ml, Sortierung und Mischen der Proben nach den drei höchsten Makronährstoffkonzentrationen und so weiter fortlaufend. In der linken Spalte ist die führende Komponente, nach der sortiert wurde und in den folgenden Spalten die resultierende Konzentration.

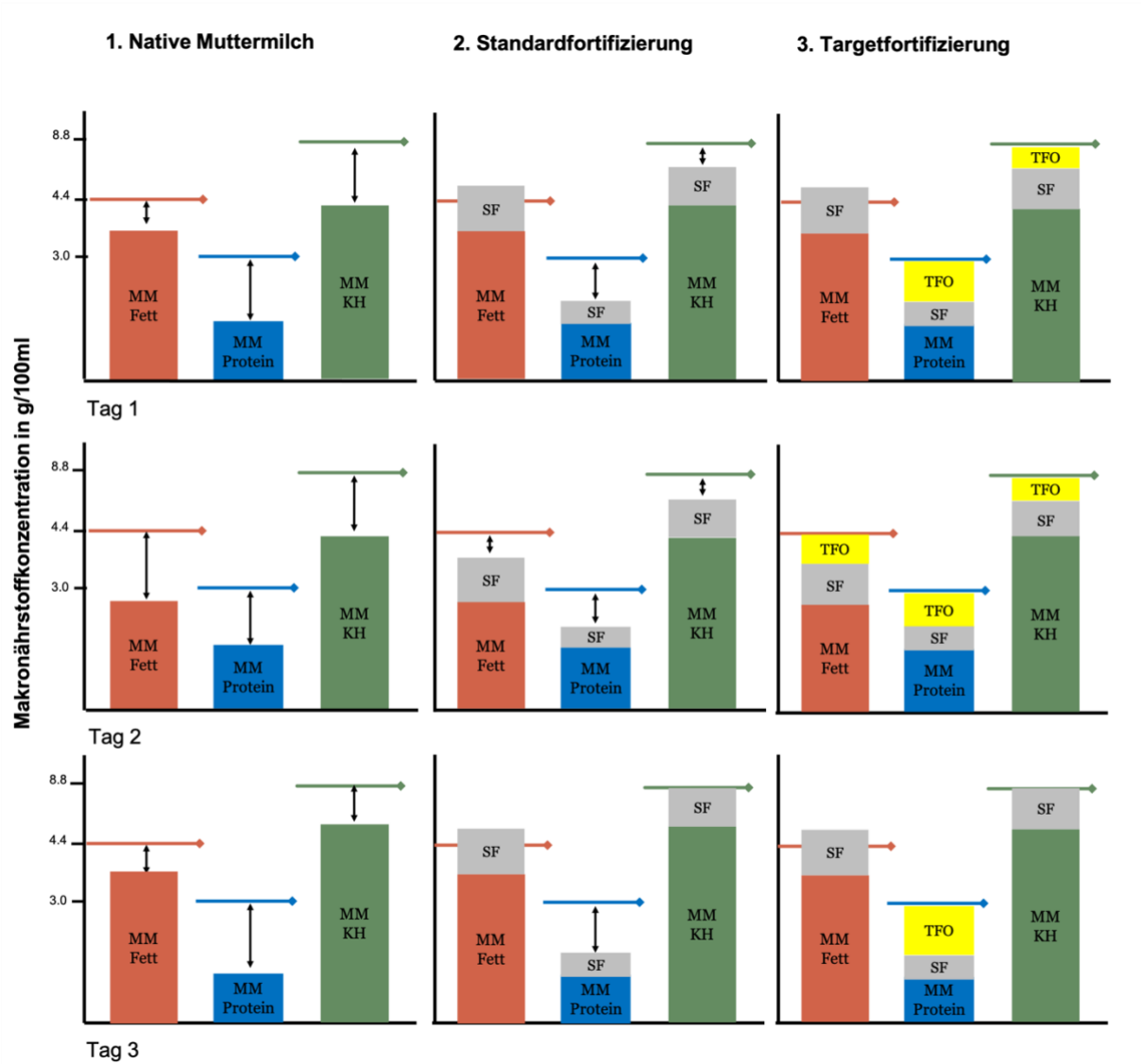
Führende Komponente	Makronährstoffkonzentration in Muttermilch			
	Fett (g/100ml)	Protein (g/100ml)	Laktose (g/100ml)	Energie (kcal/100ml)
Keines	3.5 (3.0, 4.1)	1.1 (0.9, 1.3)	6.7 (6.2, 7.2)	63 (57, 70)
Fett	4.1 (3.6, 4.6)	1.2 (1.1, 1.3)	6.6 (6.3, 7.0)	69 (64, 73)
Protein	3.7 (3.3, 4.2)	1.3 (1.1, 1.4)	6.6 (6.3, 6.9)	65 (62, 71)
Laktose	3.6 (3.1, 4.1)	1.1 (1.0, 1.3)	7.0 (6.7, 7.4)	65(60, 70)
Energie	4.0 (3.6, 4.6)	1.2 (1.1, 1.3)	6.8 (6.4, 7.1)	69 (64, 73)

**Tabelle 8:** Makronährstoffkonzentrationen und Energiegehalt in nativer Muttermilch abhängig vom Lyophilisationfaktor in 150ml. (MM-Muttermilch)

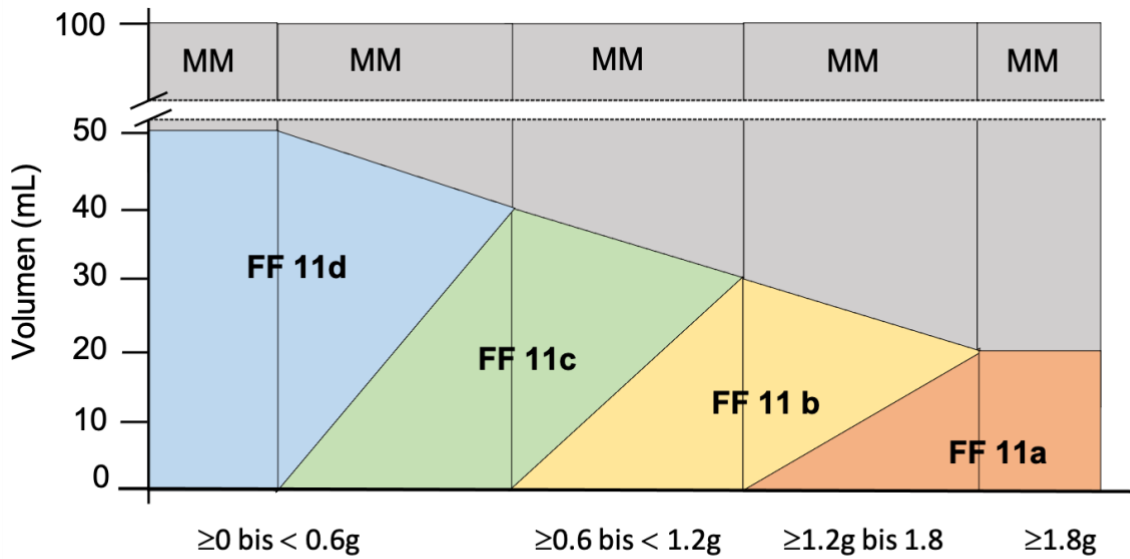
	Lyophilisationsfaktor	Makronährstoffkonzentration			
		Fett (g/150ml)	Protein (g/150ml)	Kohlenhydrate (g/150ml)	Energie (kcal/150ml)
Native MM	1.0	5.4	1.7	10.1	96
Fett	1.2	6.6	2.0	12.3	117
Protein	2.7	14.7	4.5	27.4	262
Kohlenhydrate	1.3	7.1	2.2	13.2	126
Energie	1.4	7.6	2.3	14.1	135



### 9.3 Abbildungen

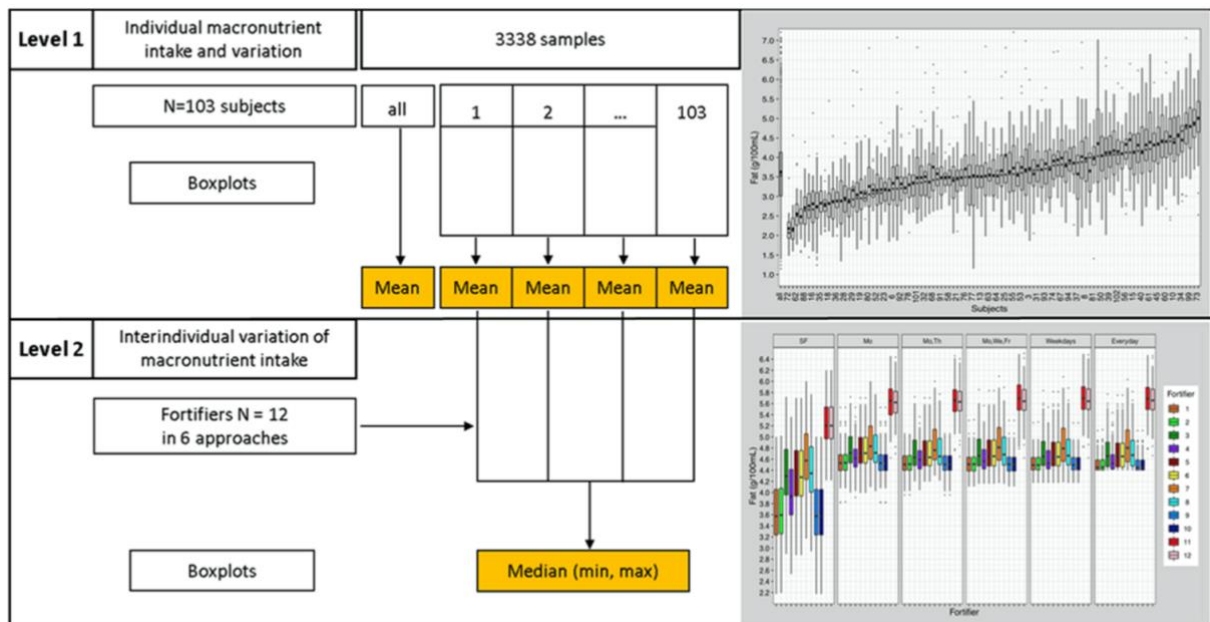


**Abbildung 1:** Makronährstoffkonzentration in g/100ml (y- Achse) in nativer Muttermilch sowie nach Standardfortifizierung und Targetfortifizierung. Zielkonzentrationen nach ESPGHAN von 8.8g/100ml Kohlenhydrate, 4.4g/100ml Fett und 3.0g/100ml Protein. (MM-Muttermilch, KH-Kohlenhydrate, SF- Standardfortifier, TFO-Modulare für Targetfortifizierung).

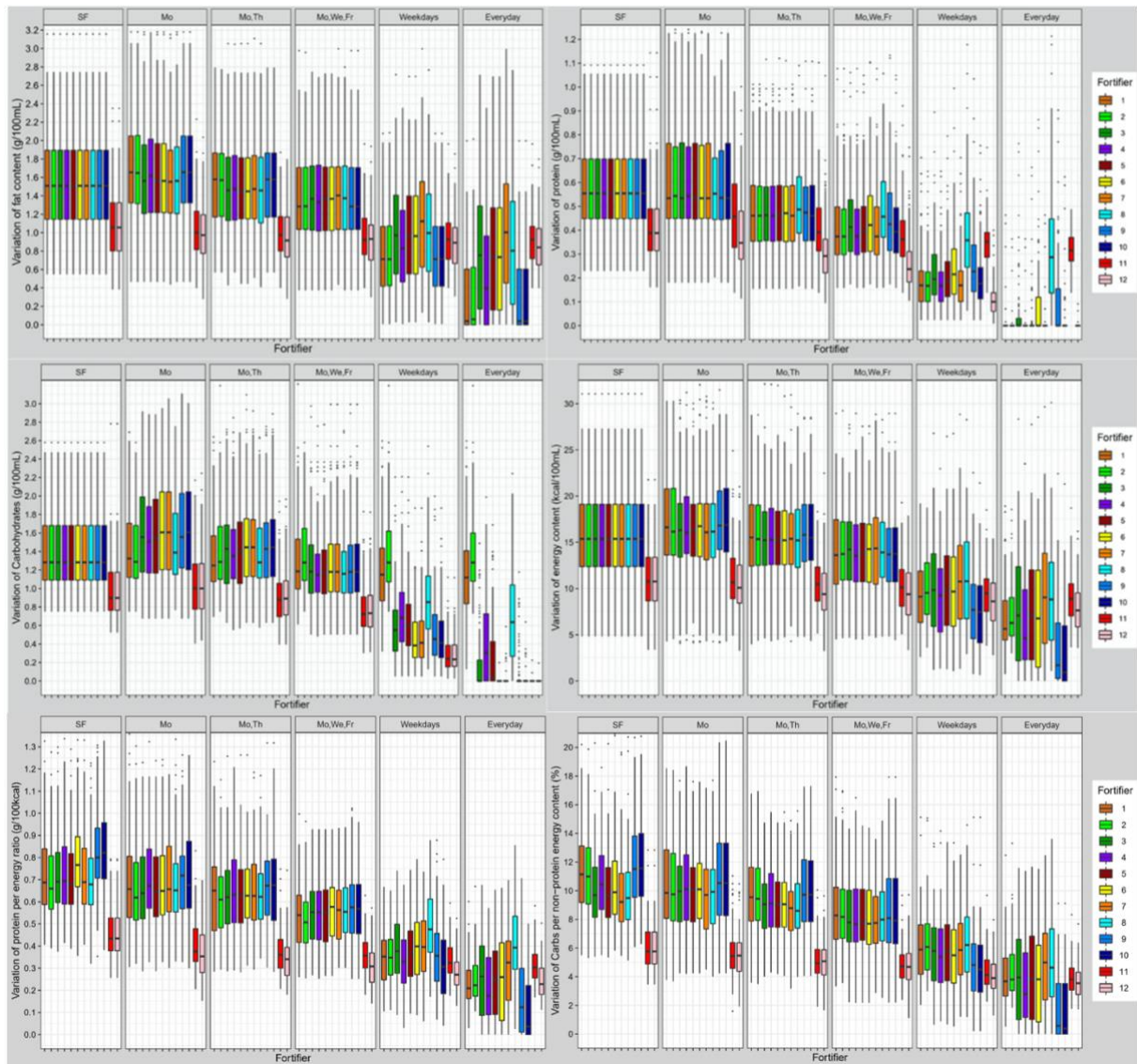


### Fortifizierung nach Proteinkonzentration in g/100ml

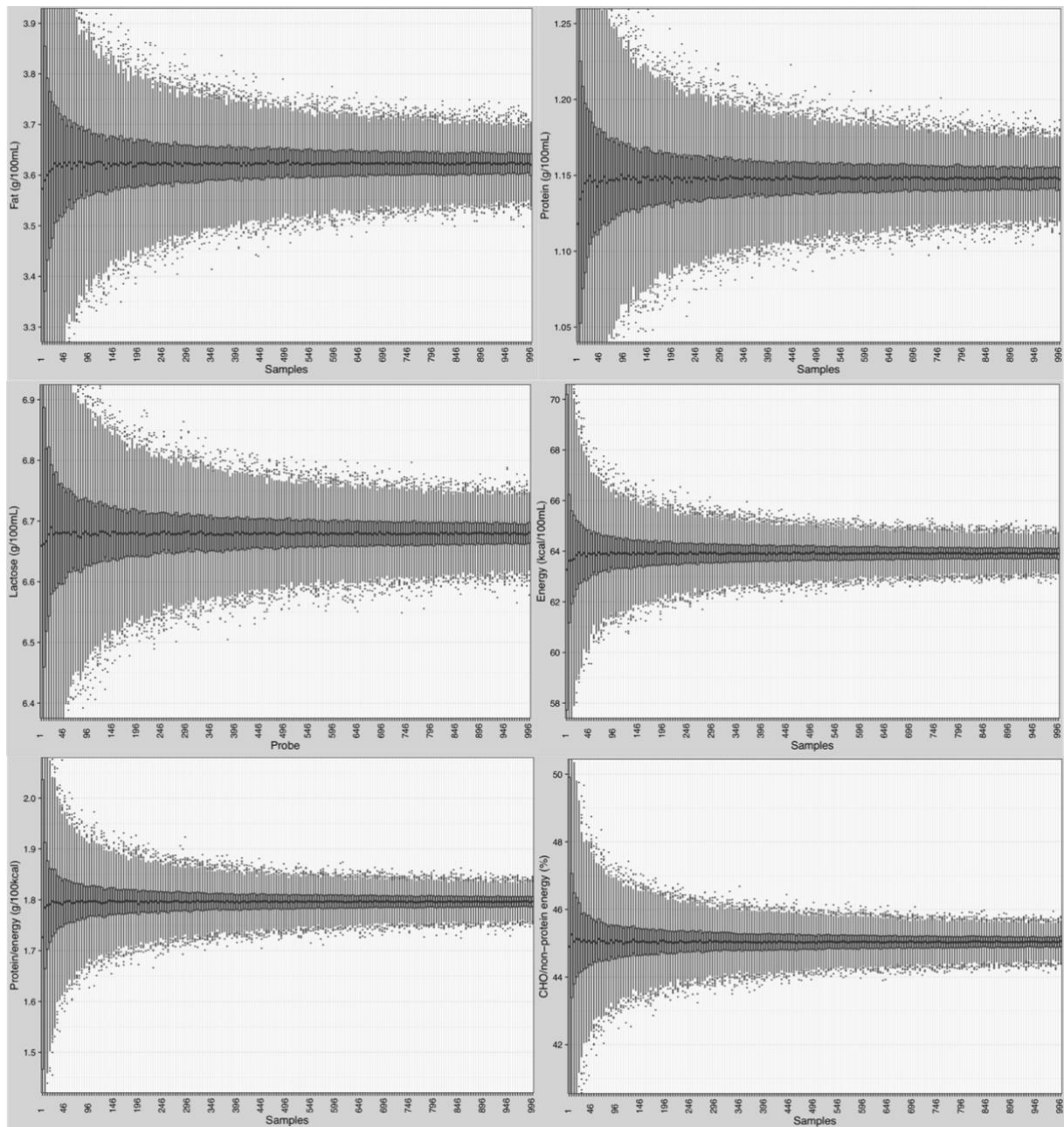
**Abbildung 2:** Off-label Anwendung des flüssigen Fortifiers (#11a bis d, entspricht Fortifizierungsschritt #12) basierend auf der Proteinkonzentration in der Muttermilch. (MM- Muttermilch, FF- Flüssigfortifier)



**Abbildung 3:** Darstellung der deskriptiven Statistik



**Abbildung 6:** Variation der Makronährstoffkonzentration von Fett, Protein und Kohlenhydraten in g/100ml, Energie in kcal/100ml, Protein-zu-Energie in g/100kcal und Kohlenhydrat-zu-Nichtprotein-Energie in % unter Anwendung von 12 Fortifiern (siehe Tabelle 2) an sieben verschiedenen Frequenzen der Muttermilchanalyse. Die Analysen wurden an verschiedenen Wochentagen durchgeführt. Die Boxplots präsentieren die Verteilung der Quantilabstände  $Q_{0.1}$  bis  $Q_{0.9}$ . (Mo- Montag, Th- Donnerstag, Fr- Freitag, Weekdays- wochentags, everyday- täglich).



**Abbildung 8:** Variation von Fett, Protein und Laktose in g/100ml, Energie in kcal/100ml, Protein-zu-Energie in g/100ml und Kohlenhydrat-zu-Nichtproteinenergie in % in einer Milchbank. Die Anzahl der kombinierten Proben wurde Probenentnahme in Fünfer Schritten erhöht und sind auf der X-Achse dargestellt. Die Punkte stellen den Median dar, die dunkelgrauen Boxplots Interquartilabstand (Q<sub>0.25</sub> und Q<sub>0.75</sub>), die hellgrauen Boxplots Interquartilabstand (Q<sub>0.1</sub> und Q<sub>0.9</sub>).

## **10 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum

Stephanie Franziska Fusch

## **11 Danksagung**

Mein erstes und großes Dankeschön gilt Prof. Matthias Heckmann. Vielen Dank, dass Sie mir die Möglichkeit gegeben haben, das Projekt, an dem ich schon vor dem Studium arbeiten konnte, im Rahmen der Promotion fortführen zu dürfen. Ich danke Ihnen sehr für Ihre großartige Unterstützung und Betreuung.

Vielen Dank an Privatdozent Dr. Niels Rochow für die hervorragende Betreuung während der ganzen Zeit. Du warst immer offen für neue Ideen und wir haben die Umsetzung stets gemeistert, auch wenn es mit viel Rechnerei und Überlegen verbunden war, mit deiner Ausdauer und Erfahrung hast du mich stets unterstützt.

Meine liebste Schwester Alexandra, danke, dass du immer und jederzeit für mich da bist, immer ein offenes Ohr für mich und die richtigen Worte parat hast.

Danke an meine Eltern Monika und Christoph. Ihr habt immer an mich geglaubt und keinen Zweifel gelassen, dass ich jede anstehende Herausforderung bewältigen kann. Danke für eure Unterstützung und Zuversicht. Liebe Mama, ich bin dir unendlich dankbar für die wunderbare Zeit mit dir und ich weiß, dass du sehr stolz auf mich wärst.

Schlussendlich möchte ich von Herzen meinem Freund Benedikt danken. Danke für deine Unterstützung über all die Jahre, Danke, dass du immer an mich glaubst, Danke für die wunderbare Zeit, die wir miteinander verbringen.