



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

Composició macromolecular de la llet materna, influència de factors materns, gestacionals i neonatals i impacte en el creixement del nounat prematur

Cristina Borràs Novell



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència [Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons](#).

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia [Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons](#).

This doctoral thesis is licensed under the [Creative Commons Attribution 4.0. Spain License](#).

Composició macromolecular de la llet materna,
influència de factors materns, gestacionals i neonatals i
impacte en el creixement del nounat prematur

Memòria de tesi doctoral presentada per Cristina Borràs Novell per
optar al grau de doctora per la Universitat de Barcelona

Dirigida per Dra. Isabel Iglesias Platas (Servei de Neonatologia. BCNatal - Centre de Medicina Maternofetal i Neonatologia de Barcelona. Hospital Sant Joan de Déu, Universitat de Barcelona i *Neonatal Intensive Care Unit, Norfolk and Norwich University Hospital, United Kingdom*) i Dra. Ana Herranz Barbero (Servei de Neonatologia. BCNatal - Centre de Medicina Maternofetal i Neonatologia de Barcelona. Hospital Clínic, Universitat de Barcelona).

Tutor Dr. Martí Iriando Sanz (Servei de Neonatologia. BCNatal – Centre de Medicina Maternofetal i Neonatologia de Barcelona. Hospital Sant Joan de Déu, Universitat de Barcelona).

Programa de Doctorat Medicina i Recerca Translacional

Facultat de Medicina i Ciències de la Salut. Universitat de Barcelona.

AGRAÏMENTS

Agraeixo a la Dra. Ana Herranz, directora d'aquesta tesi, la seva col·laboració des d'un bon començament, la seva paciència infinita i la seva companyia en els bons i mal moments; d'ella he après a ser minuciosa i estructurada en la investigació.

Agraeixo a la Dra. Iglesias, també directora d'aquesta tesi, per compartir amb mi la seva idea original del projecte, el seu saber fer i per donar-me l'empenta necessària per completar la tesis; d'ella he après a ser perseverant i crítica amb la investigació.

Agraeixo a tots els meus companys del Servei de Neonatologia de l'Hospital Clínic tot el seu suport i acompanyament, especialment a la Dra. Aldecoa per compartir els seus coneixements estadístics i el seu sentit comú, al Dr. Alsina per ajudar-me a creure en mi mateixa i a la Dra. Salvia per la seva immensa saviesa; i als companys del Servei de Neonatologia de l'Hospital Sant Joan de Déu, especialment a la Dra. Carla Balcells, la Dra. Montserrat Izquierdo i la Sra. Miriam López per tot el treball de camp realitzat. Agraeixo també l'ajuda dels infermers/es i TCAEs dels Serveis en la recollida de mostres.

Moltes gràcies als nounats prematurs i a les seves famílies per la seva participació en l'estudi, perquè sense ells aquesta tesi no hagués sigut possible.

M'agradaria remarcar el paper de la meva família i els meus amics. Moltes gràcies als meus pares Victor i Cristina i el meu germà Roger per l'educació i els valors inculcats, als meus avis per estar sempre allí, als meus sogres Jordi i Coia (en pau descansi) i cunyats Ricard i Anna pel seu suport incondicional i afecte. Moltes gràcies als meus amics, especialment a l'Hugo per la seva motivació.

Finalment moltes gràcies a les meves tres filles Marta, Clara i Helena perquè elles m'han ensenyat més que ningú altre. I, per sobre de tot, moltes gràcies Ignasi, perquè sense tu no seria qui sóc ara, gràcies per acompanyar-me en el camí i animar-me a fer realitat els meus somnis.

FINANÇAMENT

Aquest treball forma part del projecte d'Investigació en Salut "*Instituto Nacional Carlos III (Ministerio de Ciencia e Innovación, Gobierno de España)*" titulat *Leche humana: nutrientes y factores bioactivos. Relación con el desarrollo de la microbiota intestinal, el crecimiento y la salud del recién nacido prematuro* de la Dra. Isabel Iglesias Platas amb el suport del "*Plan Nacional en R+D+I (PI 17/00107) de ISCIII (Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación Sanitaria)*", finançat pel Fons de Desenvolupament Regional de la Unió Europea (FEDER).

ÍNDIX

INTRODUCCIÓ.....	1
1. La prematuritat i les seves comorbiditats.....	1
2. Recomanacions nutricionals en el nounat molt prematur.....	4
2.1. Nutrició parenteral.....	5
2.2. Nutrició enteral.....	6
3. Llet materna.....	8
3.1. Glàndula mamària i producció de llet.....	8
3.1.1. Mamogènesi.....	8
3.1.2. Lactogènesis.....	9
3.1.3. Galactopoesi.....	10
3.2. Composició de macronutrients de la llet materna.....	11
3.2.1. Analitzadors de llet materna.....	13
3.2.1.1. Bases de funcionament dels analitzadors de llet	13
3.2.1.2. Característiques de MIRIS <i>Human Milk Analyzer</i> ®	13
3.2.1.3. Influència de la recollida i el processat de la llet materna en els resultats dels anàlisis.....	15
3.2.2. Variabilitat al llarg de les setmanes de lactància. Característiques del calostre, la llet de transició i la llet madura	17
3.2.3. Canvis en la composició de macronutrients en relació factors materns, gestacionals i neonatals.....	30
3.2.3.1. Associació de característiques maternes amb la composició de macronutrients de la llet	30
3.2.3.2. Associació de característiques gestacionals amb la composició de macronutrients de la llet	32
3.2.3.3. Associació de característiques neonatals amb la composició de macronutrients de la llet.....	34
3.3. Llet de donant.....	37
3.4. Fortificació de la llet humana.....	38
4. Importància de la nutrició pel creixement del nounat molt prematur.....	41
4.1. Creixement del nounat molt prematur.....	42
4.1.1. Valoració del creixement del nounat molt prematur.....	42

4.1.2. Corbes de creixement.....	43
4.2. Fracàs del creixement postnatal	46
4.3. Variabilitat en la composició de macronutrients en la llet materna i afectació del creixement del nounat molt prematur.....	48
5. Importància de la nutrició i el correcte creixement del nounat molt prematur en les comorbiditats i el neurodesenvolupament.....	50
HIPÒTESI.....	75
OBJECTIUS.....	77
MATERIALS I MÈTODES.....	79
1. Disseny de l'estudi.....	79
2. Població d'estudi	80
3. Càlcul de la mida de la mostra.....	81
4. Recollida i anàlisi de mostres de llet materna.....	82
4.1. Punts temporals de recollida i anàlisi de llet materna.....	84
5. Variables estudiades referents a la mare.....	85
6. Variables estudiades referents al nounat molt prematur.....	87
7. Protocols de nutrició parenteral i enteral dels nounats molt prematurs dels nostres centres.....	88
7.1. Variables estudiades referents a la nutrició del nounat molt prematur.....	89
8. Valoració del creixement del nounat molt prematur.....	90
9. Valoració de les complicacions i comorbiditats associades a la prematuritat.....	92
10. Gestió de les dades i anàlisi estadístic	93
11. Consideracions ètiques.....	95
12. Finançament.....	96
RESULTATS	97
1. Descripció de la població d'estudi.....	97
1.1. Característiques maternes.....	99
1.1.1. Característiques demogràfiques, socioeconòmiques i de salut.....	99
1.1.2. Característiques obstètriques.....	101
1.1.3. Història de la lactància i cirurgia mamària.....	103
1.2. Característiques dels nounats molt prematurs.....	103
1.3. Característiques de les mostres de llet materna	106
2. Descripció de la composició de macronutrients de la llet materna i associació amb les setmanes de lactància	109

2.1. Variabilitat interindividual i intraindividual en les concentracions de macronutrients.....	113
3. Descripció de la composició de macronutrients de la llet materna i associació amb les característiques maternes, gestacionals i neonatals	115
3.1. Anàlisi de l'associació de la composició de macronutrients de la llet i les característiques maternes.....	115
3.1.1. Edat materna	115
3.1.2. Índex de massa corporal matern.....	117
3.1.3. Consum de substàncies.....	119
3.1.4. Altres característiques maternes.....	120
3.2. Anàlisi de l'associació de la composició de macronutrients de la llet i característiques gestacionals.....	120
3.2.1. Gestació múltiple	120
3.2.2. Trastorn hipertensió de l'embaràs.....	122
3.2.3. Retràs de creixement intrauterí	124
3.2.4. Via de part i presència de treball de part	125
3.2.5. Lactàncies prèvies.....	126
3.2.6. Altres característiques gestacionals.....	126
3.3. Anàlisi de l'associació de la composició de macronutrients de la llet i característiques neonatals	127
3.3.1. Edat gestacional	127
3.3.2. Pes al néixer	129
3.3.3. Sexe	129
3.4. Anàlisi multivariant.....	129
4. Descripció del creixement de la cohort de nounats molt prematurs.....	132
4.1. Comparació de l'evolució del creixement entre els nounats molt prematurs i extremadament prematurs.....	135
4.2. Anàlisi segons el diagnòstic de retràs de creixement intrauterí.....	140
5. Descripció de l'alimentació rebuda.....	142
5.1. Nutrició parenteral.....	142
5.2. Nutrició enteral.....	142
5.3. Ingesta enteral de macronutrients	144
6. Afectació del creixement segons la concentració en llet materna i la ingesta enteral de proteïnes i energia.....	147

6.1. Anàlisi multivariant.....	148
6.1.1 Als 28 dies de vida.....	148
6.1.2 A les 36 setmanes d'edat postmenstrual i a l'alta.....	148
DISCUSSIÓ.....	151
1. Composició de macronutrients de la llet materna i associació amb les setmanes de lactància.....	152
1.1. Variabilitat interindividual i intraindividual.....	162
2. Composició de macronutrients de la llet materna i associació amb les característiques maternes, gestacionals i neonatals	164
2.1. Maternes.....	164
2.1.1. Edat materna.....	164
2.1.2. Índex de massa corporal matern.....	165
2.1.3. Consum de substàncies.....	167
2.1.4. Altres característiques maternes.....	168
2.2. Gestacionals.....	169
2.2.1. Gestació múltiple.....	169
2.2.2. Trastorn hipertensiu de l'embaràs.....	170
2.2.3. Retràs de creixement intrauterí.....	170
2.2.4. Via de part i presència de treball de part previ al naixement.....	171
2.2.5. Lactàncies prèvies.....	172
2.2.6. Altres característiques gestacionals.....	173
3.3. Neonatals.....	174
3.3.1. Edat gestacional.....	174
3.3.2. Pes al néixer.....	175
3.3.3. Sexe del nounat.....	176
4. Descripció del creixement de la nostra cohort de nounats molt prematurs.....	177
4.1. Diferències entre els nounats molt prematurs i extremadament prematurs.....	180
4.2. Diferències entre pacients afectes de retràs de creixement intrauterí i no.....	181
5. Descripció de la nutrició rebuda.....	184
5.1 Nutrició parenteral.....	184
5.2 Nutrició enteral.....	185
5.3 Ingesta enteral de macronutrients.....	185

6. Afectació del creixement segons la ingesta de proteïnes i energia.....	189
7. Fortaleses i limitacions.....	195
8. Aplicabilitat i utilitat dels resultats obtinguts.....	198
CONCLUSIONS.....	201
BIBLIOGRAFIA.....	203
ANNEXES	229

ÍNDEX DE TAULES

	Pàgina
Taula 1. Concentració de proteïnes (g/dl) segons el temps de lactància després d'un part prematur en treballs que analitzen la llet per infrarojos.	19
Taula 2. Concentració de carbohidrats (g/dl) segons el temps de lactància després d'un part prematur en treballs que analitzen la llet per infrarojos.	22
Taula 3. Concentració de lípids (g/dl) segons el temps de lactància després d'un part prematur en treballs que analitzen la llet per infrarojos.	25
Taula 4. Concentració d'energia (kcal/dl) segons el temps de lactància després d'un part prematur en treballs que analitzen la llet per infrarojos.	28
Taula 5. Adaptació de Arslanoglu <i>et al.</i> amb les recomanacions de l'Associació Europea de Bancs de Llet dels diferents tipus de fortificació.	39
Taula 6. Comparació de les eines disponibles per a la valoració del pacient prematur disponibles en el projecte <i>Intergrowth-21st</i> (www.intergrowth21.org.uk). Taula adaptada de l'article <i>Updates on Assessment and Monitoring of the Postnatal Growth of Preterm Infants</i> de Cordova i Belfort, 2020.	45
Taula 7. Classificació prenatal de la gravetat del retràs de creixement intrauterí.	87
Taula 8. Edats gestacionals dels nounats participants a l'estudi.	104
Taula 9. Prevalença de comorbilitats en la nostra cohort de nounats molt prematurs.	105
Taula 10. Límits que es van tenir en compte en la eliminació de valors extrems per a cada nutrient.	107

INTRODUCCIÓ

Taula 11. Número de mostres analitzades per cada aparell per setmanes. HCM Hospital Clínic-Seu Maternitat, SJD Hospital Sant Joan de Déu. (n=625).	108
Taula 12. Característiques de distribució de cada una de les variables de concentració de macronutrients i energia.	110
Taula 13. Concentració de macronutrients i d'energia en les mostres de llet materna corresponents a les recollides de 24 hores de les setmanes 1, 2, 4 i 8.	111
Taula 14. Coeficients de variació (CV) intraindividuals i interindividuals per macronutrient de les mares que van proporcionar mostra de llet la setmana 1, 2 i 4.	113
Taula 15. Associació de la edat materna amb la composició de la llet en les setmanes 1, 2, 4 i 8 i durant el primer mes, considerant edat avançada aquelles mares amb una edat igual o major a 35 anys.	116
Taula 16. Associació de IMC \geq 25 amb la composició de la llet en les setmanes 1, 2, 4 i 8 i durant el primer mes, respecte a les mares amb pes normal. Excloses les mares amb malnutrició.	118
Taula 17. Associació de la gestació múltiple amb la composició de la llet en les en les setmanes 1, 2, 4 i 8 i durant el primer mes.	121
Taula 18. Associació de la malaltia hipertensiva de l'embaràs en la composició de la llet en les setmanes 1, 2, 4 i 8 i durant el primer mes.	123
Taula 19. Associació de la presència de treball de part amb la composició de la llet en les setmanes 1, 2, 4 i 8 i durant el primer mes.	125
Taula 20. Anàlisi multivariant dels factors perinatals que influeixen en la composició de la llet materna.	131
Taula 21. Valors de puntuació Z de pes, longitud i perímetre cranial amb les respectives caigudes acumulades des del naixement fins als 28 dies de vida, a les 36 setmanes d'EPM i a l'alta.	133
Taula 22. Incidència del fracàs de creixement i classificació de la gravetat en funció de la caiguda de puntuació Z.	135

Taula 23. Valors de puntuació Z de pes, longitud i perímetre cranial amb les respectives caigudes acumulades des del naixement fins als 28 dies de vida, a les 36 setmanes d'EPM i a l'alta estratificada segons edat gestacional (molt prematur vs extremadament prematur).	137
Taula 24. Incidència del fracàs de creixement i classificació de la 143gravetat en funció de la caiguda de puntuació Z estratificada segons edat gestacional (molt prematur vs extremadament prematur).	139
Taula 25. Ingesta enteral de proteïnes (g/kg/dia), energia (kcal/kg/dia) i ràtio proteïnes/energia per setmana (inclou el fortificant) del primer mes de tots els participants, i d'aquells amb enteral total.	145
Taula 26. Anàlisi multivariant dels factors nutricionals i no nutricionals que influenciaven en el creixement del nounat molt prematur.	150

ÍNDEX DE FIGURES

	Pàgina
Figura 1. Representació de la concentració de proteïnes (g/dl) referenciats en la taula de la pàgina 19 segons el temps de lactància després d'un part prematur en treballs que analitzen la llet per infrarojos	20
Figura 2. Representació de la concentració de carbohidrats (g/dl) referenciats en la taula de la pàgina 22 segons el temps de lactància després d'un part prematur en treballs que analitzen la llet per infrarojos.	23
Figura 3. Representació de la concentració de lípids (g/dl) referenciats en la taula de la pàgina 25 segons el temps de lactància després d'un part prematur en treballs que analitzen la llet per infrarojos	26
Figura 4. Representació de la concentració d'energia (kcal/dl) referenciats en la taula de la pàgina 28 segons el temps de lactància després d'un part prematur en treballs que analitzen la llet per infrarojos.	29
Figura 5. Concentració de proteïnes (g/dl) segons el temps de lactància materna després d'un part prematur segons estudis que analitzen llet per infrarojos en funció de l'edat gestacional	36
Figura 6. Punts temporals de recollida de llet materna exemplificat en un nadó de 28 setmanes.	84
Figura 7. Flux de pacients durant el període d'estudi.	98
Figura 8. Categories d'IMC de les mares participants segons l'Organització Mundial de la Salut.	99
Figura 9. Nivell acadèmic dels progenitors.	100
Figura 10. Paritat de les mares participants a l'estudi.	101
Figura 11. Concentració mitjana de macronutrients (g/dl) per setmana (n=625).	112

Figura 12. Concentració mitjana (IC95%) de proteïnes reals (g/dl) durant els dos primers mesos entre les mares amb edat avançada (mares amb una edat igual o major a 35 anys) o no.	117
Figura 13. Concentració mitjana de proteïnes (g/dl) (IC95%) durant els dos primers mesos entre les mares amb sobrepès o obesitat (IMC \geq 25 kg/m ²) i les mares amb pes normal.	119
Figura 14. Concentració mitjana de proteïnes reals (g/dl) (IC95%) durant els dos primers mesos entre les mares amb gestació múltiple o no.	122
Figura 15. Concentració mitjana de proteïnes reals (g/dl) (IC95%) durant els dos primers mesos entre mares amb malaltia hipertensiva de l'embaràs o no.	124
Figura 16. Gràfic de dispersió simple amb ajust de línia de edat gestacional al néixer (setmanes) i concentració de proteïnes (g/dl) durant el primer mes (esquerra) i concentració d'energia (kcal/dl) (dreta).	127
Figura 17. Comparació de la concentració de proteïnes (g/dl) a la mateixa edat postnatal (dies de vida) i postmenstrual (setmanes) entre nounats molt prematurs (verd) i extremadament prematurs (blau). El diagrama de caixes mostra la mitjana, els percentils 25 i 75, el rang (mínim i màxim) i els valors extrems.	128
Figura 18. Increment setmanal mitjà de pes (en gris) i puntuació Z mitjana de pes en diferents punts temporals (en blanc) dels participants. Les barres d'error indiquen l'interval de confiança del 95%.	134
Figura 19. Evolució de la puntuació Z mitjana de pes en diferents punts temporals per a prematurs extrems (B) i molt prematurs (A). Les barres d'error indiquen l'interval de confiança del 95%.	138
Figura 20. Evolució de la puntuació Z mitjana de pes en diferents punts temporals segons la presència (B) o absència (A) el diagnòstic retràs de creixement intrauterí. Les barres d'error indiquen l'interval de confiança del 95%.	141
Figura 21. Progressió en la nutrició enteral (volum en ml/kg/dia) i percentatge de llet materna pròpia durant el primer mes.	143

- Figura 22. Integració de les dades de concentració de proteïnes (g/dl) 154
segons el temps de lactància després d'un part prematur en
treballs que analitzen la llet per infrarojos i el present estudi. Les
barres d'error mostren l'interval de confiança del 95%.
- Figura 23. Integració de les dades de concentració de carbohidrats (g/dl) 157
segons el temps de lactància després d'un part prematur en
treballs que analitzen la llet per infrarojos i el present estudi. Les
barres d'error mostren l'interval de confiança del 95%.
- Figura 24. Integració de les dades de concentració de lípids (g/dl) segons el 159
temps de lactància després d'un part prematur en treballs que
analitzen la llet per infrarojos i el present estudi. Les barres d'error
mostren l'interval de confiança del 95%.
- Figura 25. Integració de les dades de concentració d'energia (kcal/dl) 160
segons el temps de lactància després d'un part prematur en
treballs que analitzen la llet per infrarojos i el present estudi. Les
barres d'error mostren l'interval de confiança del 95%.

ABREVIATURES I ACRÒNIMS

AOAC: Associació de Químics Analítics Oficials

APCM: Índex de pulsatilitat de l'artèria cerebral mitja

AU: Artèria umbilical

Aut: Artèria uterina

BUN: Nitrogen ureic en sang

CV: Coeficient de variació

DE: Desviació estàndard

EPM: Edat postmenstrual

ESPGHAN: Comitè de Nutrició de la Societat Europea de Gastroenterologia Pediàtrica, Hepatologia i Nutrició

FEDER: *European Union Regional Development Fund*

ICP: Índex cerebro-placentari

IDF: Federació Internacional de Lleteria

IMC: Índex de massa corporal

IP: Índex de pulsatilitat

LCPUFAs: Àcids grassos poliinsaturats de cadena llarga

OMS: Organització Mundial de la Salut

PFE: Pes fetal estimat

RCIU: Retràs de creixement intrauterí

SPSS: *Social Package for Social Sciences*

ENUMERACIÓ DE L'ARTICLE DE LA TESI

Tesi en format clàssic amb 1 article annexat. La tesi consta de sis objectius i un article.

Borràs-Novell C, Herranz Barbero A, Balcells Esponera C, López-Abad M, Aldecoa Bilbao V, Izquierdo Renau M, Iglesias Platas I. *Influence of maternal and perinatal factors on macronutrient content of very preterm human milk during the first weeks after birth*. J Perinatol. 2023 Jan;43(1):52-59.

- doi: 10.1038/s41372-022-01475-6
- factor d'impacte: 2,9
- quartil: Q2 (any 2022)

RESUM DE LA TESI

Títol

Composició macromolecular de la llet materna, influència de factors materns, gestacionals i neonatals i impacte en el creixement del nounat prematur.

Introducció

El fracàs del creixement postnatal és un dels problemes més freqüents dels nadons molt prematurs. S'estima que al voltant del 50% del creixement depèn del suport nutricional que reben. El contingut de macronutrients de la llet humana és característic però variable. Aquesta variabilitat depèn del temps de lactància i de factors tant materns com neonatals, i pot tenir un paper determinant en el creixement i la salut dels nadons molt prematurs.

Hipòtesi

Certs factors materns, gestacionals i neonatals s'associen a canvis en la composició de macronutrients de la llet materna després d'un part prematur, i aquests canvis poden afectar al creixement i a la salut del nounat molt prematur.

Objectius

Descriure la concentració de macronutrients i d'energia de la llet materna de nadons molt prematurs durant les primeres vuit setmanes de vida i analitzar si el temps, certes característiques maternes, gestacionals i neonatals s'associen a canvis en el seva composició; descriure la ingesta enteral proteica i energètica de la nostra cohort, avaluant si s'adhereix a les recomanacions oficials i si hi ha associacions amb el creixement postnatal.

Mètodes

Vam portar a terme un estudi prospectiu de cohorts entre el gener del 2018 i el gener del 2020. Es van reclutar de forma consecutiva mares i els seus nadons molt prematurs d'edat gestacional igual o inferior a 32 setmanes i es van determinar les concentracions de macronutrients de la llet materna a la setmana 1, 2, 4 i 8 mitjançant l'analitzador de llet materna MIRIS *Human Milk Analyzer* (Uppsala, Sweden).

Principals resultats

Vam analitzar 625 mostres (de 117 mares i 130 nadons molt prematurs). Les concentracions mitjanes van ser: proteïnes $1,3 \pm 0,3$ g/dl, carbohidrats $7,3 \pm 0,6$ g/dl, lípids $3,7 \pm 1,0$ g/dl i energia $70,7 \pm 9,8$ kcal/dl. La variabilitat intra/interindividual va ser elevada. L'edat gestacional va correlacionar negativament amb la concentració de proteïnes (ρ : -0,307, $p < 0.001$) i d'energia (r : -0,193, $p = 0.003$). L'edat materna avançada, l'edat gestacional i la restricció del creixement intrauterí es van associar de manera independent amb el contingut de proteïna de la llet durant els primers 28 dies de vida (R^2 ajustat: 0,113, $p = 0,002$). El creixement de la cohort va ser coherent amb el descrit en la literatura. Els pacients afectes de retard del creixement intrauterí van presentar un comportament diferent a la resta de la cohort. Després d'ajustar pels factors de confusió que poden influir en el creixement o en l'alimentació enteral, els macronutrients provinents de l'alimentació enteral només s'associaven de manera

independent, amb una menor rellevància, amb l'evolució del pes al 28 dies i, amb més força, amb evolució del perímetre cranial a les 36 setmanes postmenstrual.

Conclusions

La composició de macronutrients i d'energia de la llet materna del nounat molt prematur canviava al llarg de les primeres 4 setmanes de lactància; la concentració de proteïnes, lípids i energia disminuïa i la concentració de carbohidrats augmentava. La llet produïda per les mares més joves, amb índexs de massa corporal més baixos, amb gestacions múltiples i amb creixement intrauterí normal tendien a una menor densitat proteica. L'edat gestacional es correlacionava negativament amb el contingut de proteïnes i d'energia. Més de la meitat dels nounats molt prematurs presentaven un fracàs del creixement ponderal postnatal (d'acord amb la definició establerta - caiguda de la puntuació Z des del naixement major a 1,2). Tot i que l'aportació energètica semblava seguir les recomanacions nutricionals oficials, en el cas de les aportacions proteiques, aquestes no s'assolien fins a la tercera setmana. El creixement es veia afectat tant per factors nutricionals com per factors no nutricionals com l'edat gestacional, el diagnòstic previ de retràs de creixement intrauterí i les malalties relacionades amb la prematuritat.

INTRODUCCIÓ

1. LA PREMATURITAT I LES SEVES COMORBIDITATS

La prematuritat segueix sent un important problema de salut a nivell mundial. És la primera causa de mortalitat infantil als països desenvolupats i una important causa de discapacitat durant la infància (1). La incidència de prematuritat oscil·la entre el 5% i el 18% en funció del país (2). A Catalunya, l'any 2020, hi va haver 3.113 (5,5%) parts prematures d'un total de 57.203 (3). Durant les últimes dècades, els avenços en medicina perinatal i neonatal han augmentat la supervivència dels nounats prematures. Malgrat aquests progressos, la prematuritat segueix suposant un risc de seqüeles que es poden manifestar al llarg de tota la vida.

Es defineix com nadó prematur aquell que neix abans de les 37 setmanes de gestació, i es classifica en (4):

- Prematur tardà: nascut entre les 34 i 36 setmanes de gestació
- Prematur moderat: nascut entre les 32 i 33 setmanes de gestació
- Molt prematur: nascut entre les 28 i 31 setmanes de gestació
- Extremadament prematur: nascut abans de les 28 setmanes de gestació

Les principals comorbilitats associades a la prematuritat són:

- Displàsia broncopulmonar

La displàsia broncopulmonar es defineix com a necessitat d'oxigen a les 36 setmanes d'edat postmenstrual (EPM), a conseqüència del dany que pateix el pulmó prematur al desenvolupar-se fora de l'úter matern i ser exposat a teràpies ventilatòries (5). Existeixen diferents classificacions, però els criteris més utilitzats en el nostre entorn són: lleu (necessitat d'oxigen als 28 dies de vida però no a les 36 setmanes d'edat postmenstrual), moderada (necessitat d'oxigen als 28 dies de vida i menor al 30% a les 36 setmanes d'edat postmenstrual) i greu (necessitat

INTRODUCCIÓ

d'oxigen als 28 dies de vida i igual o major al 30% a les 36 setmanes d'edat postmenstrual) (6). Es calcula que afecta aproximadament un 20% dels nounats nascuts abans de les 30 setmanes de gestació i 1500 g de pes (7).

- Enterocolitis necrosant

L'enterocolitis necrosant és una necrosi intestinal d'etiopatogènia complexa i no del tot coneguda, en la què conflueixen factors com la immaduresa, mecanismes d'hipoxia-isquèmia i d'inflamació-infecció (8). Es classifica en funció de la clínica i la imatge radiològica en 3 estadis: estadi I (sospita clínica), estadi II (diagnòstic establert) i estadi III (malaltia avançada) (9). La incidència d'enterocolitis necrosant entre els nounats molt prematurs és d'aproximadament el 7%, amb una mortalitat d'entre el 20 i el 30%, major en els casos que requereixen tractament quirúrgic (10).

- Sèpsia nosocomial

La sèpsia nosocomial es defineix com la presència de signes clínics o analítics d'infecció juntament amb un hemocultiu positiu més enllà de les 72 hores de vida. Els nounats prematurs són molt susceptibles a la sèpsia nosocomial degut a la seva immunodeficiència relativa i al fet d'estar sotmesos a tècniques invasives (ús de catèters centrals, necessitat de nutrició parenteral, assistència respiratòria...). En una cohort de 5.100 nadons extremadament prematurs, el 34% van patir almenys un episodi de sèpsia nosocomial (que es va associar amb 18 % de mortalitat) (11).

- *Ductus* arteriós persistent

El *ductus* arteriós és una estructura vascular present durant la circulació fetal, la constricció del qual es veu endarrerida en cas de part prematur per un major nivell de prostaglandines circulants. Les seves conseqüències hemodinàmiques es defineixen en funció de criteris clínics, radiològics i analítics; així, el considerem significatiu quan implica hipotensió sistèmica, oligúria, edema pulmonar o hipoperfusió intestinal (12). Aproximadament el 50% dels nadons nascuts abans de les 29 setmanes de gestació poden presentar un *ductus* arteriós persistent, però tant sols una minoria requeriran tractament (12).

- Retinopatia de la prematuritat

La retinopatia del prematur és un trastorn del desenvolupament vascular de la retina que pot causar una discapacitat visual greu i que afecta aproximadament un 10% dels nounats molt prematurs (13). Es classifica en 5 graus: grau I (creixement lleugerament anormal dels vasos sanguinis), grau II (creixement dels vasos sanguinis moderadament anormal), grau III (creixement anormal dels vasos sanguinis [III *plus* si presenta vasos hipertròfics i tortuosos]), grau IV (despreniment parcial de retina) i grau V (despreniment complet de retina) (14).

- Hemorràgia intraventricular, lesió de substància blanca periventricular i alteració del neurodesenvolupament

En el nounat prematur la matriu germinal situada entre el nucli caudat i el tàlem pot sagnar donant lloc a una hemorràgia intraventricular que es classifica en quatre graus: grau I (sagnat limitat a la matriu germinal o que afecta <10% del volum del ventricle lateral), grau II (contaminació intraventricular entre el 10-50% del volum del ventricle lateral), grau III (contaminació intraventricular >50% del volum del ventricle lateral i ventriculomegalia) i grau IV (infart hemorràgic periventricular degut a la obstrucció del drenatge venós de les venes medul·lars de la substància blanca, que pot evolucionar a una porencefàlia) (15,16). Per lesió de substància blanca periventricular s'entén el dany de substància blanca encefàlica en forma o no de quists (deguts a una afectació dels oligodendròcits per un procés d'inflamació-infecció), i comporta el risc de desenvolupar posteriorment una paràlisi cerebral infantil, entre altres trastorns del neurodesenvolupament (17).

2. RECOMANACIONS NUTRICIONALS EN EL NOUNAT MOLT PREMATUR

La nutrició durant les primeres setmanes de vida és un factor determinant per la supervivència, el creixement, el neurodesenvolupament i la salut a llarg termini dels nounats prematurs (18,19). Tot i la seva importància, el suport nutricional òptim suposa encara un desafiament per als neonatòlegs (20,21). L'objectiu més acceptat en el maneig nutricional dels nounats molt prematurs és el de proporcionar tots els nutrients necessaris per aconseguir que la seva velocitat de creixement i la seva composició corporal siguin similars a la d'un fetus sa de la seva mateixa edat gestacional (22–24). Tot i això, el fracàs de creixement postnatal en les Unitats Neonatals és un problema universal i s'associa a un pitjor neurodesenvolupament (20,25). Horbar *et al.* van descriure l'any 2015 que la meitat dels nounats amb un pes al néixer entre 500-1500g presentava un fracàs de creixement postnatal, i en un 25% era greu (22). Ehrenkranz *et al.* van descriure l'any 2006 que la velocitat de creixement durant l'hospitalització exerceix un efecte significatiu, i possiblement independent, sobre els resultats del desenvolupament neurològic i del creixement als 18-22 mesos d'edat corregida (19).

En el moment del naixement, el nounat prematur queda desproveït de forma abrupta dels nutrients que li aportava la placenta. El part prematur es pot considerar una urgència metabòlica i és important iniciar el més aviat possible el suport nutricional adequat. Cal tenir en compte, però, que el part prematur compromet la capacitat digestiva i absorbiva del tracte gastrointestinal, la motilitat intestinal i la colonització microbiana (26), augmentant el risc d'intolerància enteral i enterocolitis necrosant (27). Per aquest motiu, en els pacients molt prematurs s'inicia l'alimentació en règim parenteral i progressivament s'introdueix l'alimentació enteral segons tolerància.

2.1. NUTRICIÓ PARENTERAL

Les últimes guies de nutrició parenteral per a prematurs van ser publicades l'any 2018 pel Comitè de Nutrició de la Societat Europea de Gastroenterologia Pediàtrica, Hepatologia i Nutrició (ESPGHAN) (28) i recullen la millor evidència disponible juntament amb el consens d'experts. La recomanació és iniciar l'alimentació parenteral immediatament després del naixement amb els següents macronutrients:

- Proteïnes (en forma d'aminoàcids): s'haurien d'iniciar a almenys 1,5 g/kg/dia per aconseguir un estat anabòlic. A partir del segon dia de vida, s'haurien d'administrar entre 2,5-3,5 g/kg/dia, sense sobrepassar aquest màxim (29).
- Lípids: s'haurien d'iniciar a 1-1,5 g/kg/dia i augmentar fins un a màxim de 4 g/kg/dia (30).
- Carbohidrats: la glucosa s'hauria d'iniciar a 5,8-11,5 g/kg/dia, amb un augment progressiu cada 2-3 dies fins a una dosi habitual de 14,4 g/kg/dia. Les aportacions de glucosa mínimes haurien de ser 5,8 g/kg/dia, i les màximes de 17,3 g/kg/dia (31).
- Energia: entre 110-120 kcal/kg/dia (32).

Les quantitats anteriorment mencionades s'han d'augmentar progressivament, en funció de les circumstàncies clíniques del pacient, tenint en compte les següents consideracions (33):

- Nounats en fase de transició: en el nounat prematur de molt baix pes sembla adequada una pèrdua de pes entre 7-10% respecte al naixement tenint en compte el un major contingut d'aigua corporal i els efectes deleteris de la sobrecàrrega hídrica.
- Nounats en fase intermèdia: el pes al néixer es sol recuperar entre els 7 i 10 dies de vida.
- Nounats en la fase de creixement estable: s'ha de mantenir l'homeòstasi de líquids i electròlits.

2.2. NUTRICIÓN ENTERAL

En el moment de la realització d'aquesta tesi les guies de nutrició enteral per a prematurs del Comitè de Nutrició de la Societat Europea de Gastroenterologia Pediàtrica, Hepatologia i Nutrició (ESPGHAN) vigents corresponien a les publicades l'any 2010 (34). Els requisits per a la majoria de nutrients derivaven de les taxes d'acreció de proteïnes, greixos i minerals obtinguts per l'anàlisi de la composició corporal fetal en diverses etapes de gestació (25). Les recomanacions eren les següents (34):

- Proteïnes: 4,0 – 4,5 g/kg/dia en nadons de fins a 1000g i 3,5–4,0 en nadons de 1000 a 1800g
- Lípids: 4,8 - 6,6 g/kg/dia
- Hidrats de carboni: 11,6 - 13,2 g/kg/dia
- Ingesta energètica de 110 – 135 kcal/kg/dia

La primera opció per a l'alimentació de qualsevol nounat, i encara més en el nounat prematur, és la llet materna de la seva pròpia mare (35). La llet materna és la que presenta un millor perfil nutricional i metabòlic, i conté múltiples factors bioactius que protegeixen al nadó contra la infecció i la inflamació, contribueixen a la maduració immunològica, al desenvolupament dels òrgans i a la colonització per flora microbiana saludable (36). En el camp de la prematuritat, l'alimentació amb llet materna ha demostrat disminuir la incidència d'enterocolitis necrosant (37), de sèpsia nosocomial (38), de retinopatia del prematur i de displàsia broncopulmonar (39–41), i millorar els resultats en el neurodesenvolupament (42).

En aquells casos en què no hi ha suficient quantitat de llet de la pròpia mare es recomana l'alimentació amb llet humana de donant (veure apartat 3.3. Llet de donant) (43).

En els darrers anys, la tendència és a una alimentació enteral precoç i progressiva, que s'inicia dins dels primers 4 dies de vida mitjançant alimentació tròfica amb llet materna (amb volums inferiors a aproximadament 24 ml/kg/dia) per a estimular la motilitat de

l'aparell gastrointestinal i la secreció d'hormones gastrointestinals. Això ha demostrat beneficis a nivell de colonització per flora intestinal més saludable, així com una millor maduració del tracte gastrointestinal i de la tolerància (27). Si es comprova una tolerància adequada, es recomana augmentar progressivament el volum, fet que no incrementa el risc de mortalitat o d'enterocolitis necrosant (44–46), fins a assolir volums d'entre 135 i 200 ml/kg/dia (34).

Malgrat això, la llet humana no aporta suficients nutrients per satisfer les elevades necessitats metabòliques dels nounats molt prematurs, i és necessari fortificar-la, complementant-la amb macronutrients i minerals (veure apartat 3.4. Fortificació de la llet humana). Sembla que un volum de llet materna fortificada d'entre 150 i 180 ml/kg/dia podria aportar els nutrients necessaris (34). Aquestes directrius no s'haurien de generalitzar a tots els pacients molt prematurs, i la majoria de guies clíniques proposen individualitzar-ho en cas de nadons de menor edat gestacional, inestables des del punt de vista respiratori o hemodinàmic i en aquells afectes d'una restricció de creixement intrauterí amb alteració dels dopplers prenats, tot i que existeix poca evidència científica sobre quin és el millor règim d'alimentació en aquests subgrups (47).

Respecte a la manera d'administrar l'alimentació enteral (infusió continua versus en bolus), sembla que aquesta darrera és més fisiològica, afavoreix els cicles hormonals del tracte gastrointestinal i pot ser beneficiosa per a l'homeòstasi metabòlica i el desenvolupament del tracte gastrointestinal (48), encara que no hi ha evidència robusta a favor d'un mètode o de l'altre.

3. LLET MATERNA

Al llarg del desenvolupament humà, la lactància ha demostrat tenir una importància cabdal en la supervivència de l'espècie, tan a nivell nutricional com a experiència de vinculació maternofilial. L'embaràs, el part i la lactància són processos coordinats (49). La lactància del nadó molt prematur durant les primeres setmanes de vida presenta reptes específics, alguns derivats de la pròpia fisiologia, que revisarem a continuació.

3.1. GLÀNDULA MAMÀRIA I PRODUCCIÓ DE LLET

3.1.1. Mamogènesi

La glàndula es forma durant la vida fetal a partir de la línia i la fòvea mamària i canvia de composició, mida i forma en la pubertat, l'embaràs i la lactància influenciada per la progesterona i els estrògens.

Durant la pubertat els conductes es ramifiquen, es produeix la diferenciació lobulillar i el desenvolupament de la unitat ductolobulillar terminal. El sistema ductal i lobulillar està revestit per dos tipus de cèl·lules: epitelials (secretores de la llet) i mioepitel·lials (amb la seva contracció permetran l'expulsió de la llet). Cada mama té entre 15 i 25 seccions denominades lòbuls, i cada lòbul té uns 100 lobulets que acaben en alvèols. Aquestes estructures s'uneixen mitjançant conductes que condueixen cap a l'arèola. A l'alçada de l'arèola els conductes es dilaten de forma fusiforme formant els sinus galactòfors (50).

Quan la dona està gestant, gràcies principalment a la progesterona i al lactògen placentari humà, es produeix una proliferació ductal i un desenvolupament lobular anomenat mamogènesi (51,52). En cas de part prematur, aquest procés queda interromput (53).

La involució de les glàndules mamàries es produeix amb el cessament de la lactància i és conseqüència d'una combinació de deprivació d'hormones lactogèniques i senyals autocrins locals. No es produeix una regressió completa, i un nou embaràs provoca un

nou augment de la mida i del nombre de lòbuls conservant el potencial de produir llet en resposta a una estimulació regular. Després de la menopausa, la glàndula s'atrofia definitivament i augmenta la proporció de teixit fibrós i adipós circumdant.

3.1.2. Lactogènesi

La lactogènesi és el procés mitjançant el qual s'inicia la secreció de llet i té lloc en dues etapes (54). La lactogènesi I comença a la setmana 20 d'embaràs i consisteix en la diferenciació citològica i enzimàtica de les cèl·lules epitelials per assolir una capacitat secretora (lactòcits); per aquest motiu, algunes mares refereixen produir calostre durant la gestació. La lactogènesi II (popularment coneguda com "pujada de la llet") implica una producció abundant després de l'expulsió placentària i es deu a un ràpid descens de la progesterona, i a la presència de nivells elevats de prolactina, cortisol i insulina (55). Normalment té lloc entre 48 i 96 hores post part (52).

La lactogènesi II tardana, definida com aquella que apareix més enllà del tercer-quart dia postpart, es pot associar a diferents condicions (56–60):

- Obesitat materna
- Diabetis gestacional
- Primiparitat
- Part per cesària
- Retenció placentària
- Part prematur

En el cas de part prematur, no es coneixen del tot els motius pels quals la lactogènesi II es veu retardada, però es postula que podria deure's a complicacions obstètriques associades i a l'administració d'algunes medicacions durant l'embaràs i el part (60).

3.1.3. Galactopoiesi

Amb el terme galactopoiesi ens referim al manteniment de la producció làctia gràcies a l'extracció repetida de llet i a l'estimulació del mugró per la succió que provoquen l'alliberament combinat de prolactina de l'adenohipòfisi i d'oxitocina de la neurohipòfisi. La prolactina estimula el creixement dels conductes de la glàndula mamària, la proliferació de les cèl·lules epitelials i la síntesi proteica. L'oxitocina participa en la contracció de les cèl·lules mioepitel·lials que ajuden a extreure la llet, té un efecte plaent per la mare i facilita el vincle maternofilial (52,53).

El volum de llet secretada s'ajusta a les necessitats del nadó. Si no s'extreu llet, la pressió intramamària elevada i l'acumulació de l'inhibidor de retroalimentació de la lactància redueixen la producció de llet i inicien la involució mamària. Si s'extreu llet, s'elimina l'inhibidor i es reprèn la secreció (55).

Els components nutricionals de la llet provenen de les reserves maternes, de la dieta materna i de la síntesi dels lactòcits (52). El flux sanguini augmenta durant la lactància per proporcionar les grans quantitats de substrats necessàries per a la síntesi de la llet. La llet es produeix als orgànuls del citoplasma de les cèl·lules epitelials dels alvèols a partir de la sang mitjançant cinc mecanismes diferents (50):

- Exocitosi. S'inicia al nucli amb la síntesi de molècules d'ARNm específiques per a proteïnes de la llet (caseïna, alfa-lactoalbúmina, beta-lactoglobulina). Les molècules d'ARNm madures surten del nucli i s'associen als ribosomes del reticle endoplasmàtic, on es sintetitzen les proteïnes. Aquestes molècules són transportades a través de petites vesícules i emmagatzemades al sistema de Golgi. En el sistema de Golgi també es forma la lactosa a partir de galactosa i glucosa que entren des del citoplasma. Les vesícules secretores es desplacen a la membrana plasmàtica on descarreguen el seu contingut a la llum alveolar per a l'exocitosi.
- Síntesi i secreció de lípids. Els triacilglicerols, sintetitzats al reticle endoplasmàtic llis a partir de glicerol i àcids grassos, es fusionen en gotes que es situen a l'apex de les cèl·lules epitel·lials. Es fusionen amb la membrana plasmàtica sortint de la cèl·lula cap a la llum alveolar en forma de glòbuls.

- Secreció d'ions i aigua a través de la membrana apical.
- Transcitosi d'immunoglobulines. Certes molècules com la immunoglobulina A són endocitades a la base de les cèl·lules epitel·lials, transferides a la membrana apical i posteriorment secretades a la llum.
- Via paracel·lular. Pas de substàncies no a través de les cèl·lules epitel·lials, sinó entre elles; pas que durant la lactància està tancat per les unions intercel·lulars.

Podríem concloure que les dificultats en la lactància associades al part prematur serien (52,53,55):

- Interrupció prematura de la mamogènesi (en cas de ser el primer embaràs)
- Lactogènesi I incompleta i II retardada
- Alteració de la galactopoesi per disminució en la efectivitat i freqüència de la extracció de llet del pit
- Separació mare-nadó

3.2. COMPOSICIÓ DE MACRONUTRIENTS DE LA LLET MATERNA

La llet materna és un fluid biològic extremadament complex i variable destinat a nodrir específicament a cada nadó i protegir-lo mentre el seu sistema immunològic madura (61). En la llet materna trobem tres grups fonamentals de macronutrients: proteïnes, greixos i carbohidrats (36).

Les proteïnes de la llet són essencials per al creixement del nadó, però també actuen com a transportadors d'altres nutrients, promouen el creixement de l'intestí i l'absorció de nutrients, i tenen activitat antimicrobiana (62). Les proteïnes de llet es poden classificar en caseïna, proteïnes del sèrum i mucines. La caseïna és la proteïna més abundant i inclou alfa-, beta- i kappa-caseïna. Les principals proteïnes del sèrum són alfa-lactoalbúmina, lactoferrina, lisozima i immunoglobulina A (63). La concentració mitjana de proteïnes de la llet madura de mares amb gestacions a terme

INTRODUCCIÓ

és entre 0,9 i 1,2 g/dl (36). La llet també conté nitrogen no proteic en forma d'urea, creatinina, nucleòtids i aminoàcids lliures (52).

L'energia de la llet procedeix principalment dels lípids. La concentració mitjana de lípids de la llet madura de mares amb gestacions a terme és entre 3,2 i 3,6 g/dl i d'energia entre 65 i 70 kcal/dl (36). Són, a més, una important font de nutrients essencials com àcids grassos poliinsaturats, vitamines liposolubles i components bioactius (63). Estan organitzats en forma de glòbuls amb un nucli de lípids no polars (sobretot triglicèrids) i una doble membrana de glicerofosfolípids, esfingolípid, esfingomielina, colesterol i proteïnes glicosilades (64). Els triglicèrids representen la majoria de lípids de la llet, i la seva composició d'àcids grassos defineix les seves propietats. La llet materna conté més de 200 àcids grassos (63), especialment importants els poliinsaturats de cadena llarga (LCPUFAs), que exerceixen funcions de membrana i participen en el desenvolupament de la retina i del còrtex cerebral, i en la resposta immunològica (65).

El principal carbohidrat de la llet és el disacàrid lactosa, bàsic per al desenvolupament del sistema nerviós central. La concentració mitjana de lactosa de la llet madura de mares amb gestacions a terme és entre 6,7 i 7,8 g/dl (36). També conté altres disacàrids i monosacàrids en menor quantitat, i oligosacàrids amb funcions prebiòtiques. Els oligosacàrids són importants perquè nodreixen els bacteris intestinals, promovent una flora beneficiosa (66).

Segons la literatura mèdica, tot i els valors de referència descrits en els paràgrafs anteriors, la concentració de macronutrients en la llet materna varia en funció del temps i de nombrosos factors tant materns com neonatals (61,67–74).

3.2.1. Analitzadors de llet materna

Per tal de proporcionar la quantitat adequada de nutrients als nadons prematurs que s'alimenten de llet de les seves pròpies mares o de donants, hem de poder determinar el contingut de macronutrients d'aquest fluid (75). Tot i que els mètodes de laboratori clàssics són els mètodes de referència per aquesta avaluació, aquests són lents, costosos i requereixen un gran volum de llet. Els analitzadors de llet humana d'infrarojos permeten obtenir resultats vàlids amb pocs mil·lilitres de mostra i en poc temps. Per aquest motiu, són útils per mesurar el contingut de macronutrients de la llet humana en la pràctica clínica (76).

3.2.1.1. Bases de funcionament dels analitzadors de llet

Els analitzadors de llet es basen en tecnologia espectroscòpica d'infrarojos, que és el mètode certificat per a l'anàlisi de la llet a la indústria lletera segons ISO 9622: 1999 per l'Associació de Químics Analítics Oficials (AOAC) i la Federació Internacional de Lleteria (IDF) (77,78). Funcionen en base al principi d'absorbància, que es basa en el fet que enllaços químics específics de proteïnes (amida), greixos (carbonil i carboni-hidrogen) i hidrats de carboni (hidroxil) presenten màxima absorció de radiació a longituds d'ona específiques (79). La mostra s'exposa a radiació infraroja (72); aquesta es divideix generalment en tres regions: propera (0,7-2,5 μm), mitjana (2,5-25 μm) i llunyana (25-1000 μm), segons la seva relació amb l'espectre visible. La quantitat d'energia absorbida a les longituds d'ona característiques de cada macronutrient és proporcional a la concentració d'aquest (llei Beer-Lambert) (80).

3.2.1.2. Característiques de MIRIS Human Milk Analyzer®

L'anàlisi del contingut de macronutrients del nostre treball es va realitzar mitjançant l'analitzador de llet humana MIRIS *Human Milk Analyzer*® de MIRIS Solutions (Uppsala, Suècia) seguint un protocol validat (81,82). Aquest analitzador necessita entre 1 i 3 ml de llet materna per fer l'anàlisi de macronutrients, exposant una pel·lícula molt prima de llet a radiació infraroja. L'instrument conté tres filtres per seleccionar les longituds

INTRODUCCIÓ

d'ona corresponents a proteïnes, lípids i hidrats de carboni, i un altre filtre com a filtre de referència (75).

El *MIRIS Human Milk Analyzer*[®] es calibra amb estàndards de llet humana i pot mesurar els lípids i les proteïnes totals, i estimar les proteïnes reals, els hidrats de carboni i l'energia. Les proteïnes totals es calculen multiplicant el nitrogen per 6,38, i les proteïnes reals es determinen assumint un contingut de nitrogen no proteic del 20% (83). La lectura d'hidrats de carboni inclou la lactosa i els oligosacàrids (72), i el seu valor es calcula restant lípids i proteïnes dels sòlids totals. El dispositiu utilitza el contingut de macronutrients per a calcular l'energia en kcal/dl mitjançant la fórmula: 4,4 kcal/g per a proteïnes, 9,25 kcal/g per a greixos i 4 kcal/g per a hidrats de carboni (84).

MIRIS Human Milk Analyzer[®] ha estat utilitzat, validat i reconegut per diferents autors com un mètode precís i fiable per a mesurar macronutrients en llet materna en comparació amb els mètodes de referència, tot i algunes disparitats (69,72,81,85–90). Ha demostrat una repetibilitat de < 0,05% i una exactitud de < 0,1% (72). En la determinació de proteïnes, la presència de nitrogen no proteic en la llet materna (urea, creatinina, nucleòtids, aminoàcids i pèptids lliures), que representa fins a un 25% del nitrogen total, pot generar discrepàncies en la lectura (61). Respecte a l'anàlisi de greixos, el 95% de lípids de la llet materna s'organitzen en glòbuls greixosos (91). L'heterogeneïtat en la mida d'aquest glòbuls pot causar una infraestimació o una sobreestimació del contingut lipídic de la llet (81). La destrucció física d'aquestes estructures mitjançant una bona homogeneïtzació pre-anàlisi de les mostres és fonamental per assegurar la fiabilitat del resultat (69,87). L'homogeneïtzació manual i ultrasònica estaven acceptades per a la lectura de mostres fresques en el moment en què es va iniciar el nostre estudi (69,84). El macronutrient pel què l'analitzador rendeix pitjor són els carbohidrats. La llet humana és rica en oligosacàrids en comparació amb la llet vacuna, representant fins a un 10% del total de carbohidrats (percentatge que és alhora molt variable entre individus) (77,78). Els oligosacàrids contenen un terminal de lactosa, i *MIRIS Human Milk Analyzer*[®] pot no diferenciar-los de la lactosa lliure (89,92). La determinació de lactosa pot ser alhora inexacte, donat que representa

entre un 70 i un 83% dels carbohidrats de la llet materna, i s'ha de tenir present que la llet també conté glucosa i galactosa, entre altres (69,93). El fet que l'energia s'estima a través de la concentració dels altres nutrients pot conduir a determinacions inexactes si s'assumeix que tot el nitrogen és proteic o que l'únic carbohidrat present és la lactosa (67).

A fi d'optimitzar les determinacions de macronutrients amb aquest analitzador és important tenir en compte les instruccions del fabricant: treballar a les temperatures recomanades, tenir una bona rutina de neteja, homogeneïtzar bé les mostres abans de la lectura, i fer un calibratge acurat de l'aparell (76,94,95).

3.2.1.3. Influència de la recollida i el processat de la llet materna en els resultats dels anàlisis

La forma en què es recull i es processa la mostra de llet materna impacta sobre els resultats de concentració de macronutrients; així l'estandardització de la fase pre-analítica dels estudis és molt important per a la correcta obtenció dels resultats (61). La llet és una emulsió de greix en aigua que conté components solubles i cel·lulars (87). Si aquesta emulsió no es processa correctament, els components tendeixen a separar-se i se n'alteren les seves propietats, fet que influeix sobre les mesures de contingut de macronutrients a nivell de recerca i també a nivell de pràctica clínica.

Un aspecte a tenir en compte és quan i com s'extreu la llet materna del pit. Dins d'una mateixa toma el contingut de greix és entre 2 i 3 vegades més alt al final (36,96) i depèn de l'interval de temps des de la última presa (61). Els ritmes circadians també poden afectar a la concentració de macronutrients de la llet materna, de manera que al llarg d'un mateix dia la llet vespertina sembla ser més rica en lípids i energia que la llet matutina (97–100). Respecte al mètode d'extracció, s'ha descrit que les mostres de llet procedents d'extraccions manuals poden tenir una major proporció de llet de final de toma i conseqüentment un major contingut en greix (96,101); pel contrari, també s'ha descrit que la llet procedent d'extracció elèctrica té més greix degut a l'estímul de succió repetit (52).

INTRODUCCIÓ

L'emmagatzematge de la llet materna (tant el material utilitzat, com la temperatura i temps de conservació) poden modificar el contingut de macronutrients (36,69,102–104). Existeixen diferents materials per a emmagatzemar la llet materna: vidre, polietilè, polipropilè, policarbonat o polièter sulfona. El component cel·lular s'adhereix a les parets de vidre, els components aquós i lipídic s'adhereixen al vidre i al polipropilè (52). S'ha de tenir present que els macronutrients poden variar també durant l'emmagatzematge per la persistència de l'activitat enzimàtica o per altres processos de biodegradació (87). La llet materna és sensible a la refrigeració/congelació i a l'escalfament. La congelació de la llet materna provoca una ruptura de les membranes dels glòbuls de greix per l'activació de la lipasa i altera les proteïnes inestabilitzant les micel·les de caseïna i modificant l'estructura quaternària de les proteïnes del sèrum (52,105). Sembla que la ultracongelació conservaria millor la integritat respecte la congelació a -20°C (87,106), i que a major temps de conservació més degradació de proteïnes (107), de lípids i de contingut calòric (sobretot més enllà de 2 mesos) (84). La conservació de la llet refrigerada a 4°C fins a un màxim de 3 o 4 dies sembla que no provoca canvis en el contingut de lípids, proteïnes i lactosa (52,107,108). Respecte al reescalfament de la llet que ha estat prèviament congelada o refrigerada, s'han descrit com a segurs per al posterior consum els següents mètodes: deixar el recipient a la nevera durant 24 hores, posteriorment o directament deixar el recipient a temperatura ambient durant 2 hores o escalfar-lo a 40°C durant 20 minuts (52). Es contraindica l'ús de microones.

Un altre aspecte important que cal tenir en compte és el tipus d'homogeneïtzació de les mostres, ja que la qualitat i la duració d'aquesta afecta a la mida i a la distribució dels glòbuls de greix i evita que aquests s'adhereixen a les parets dels recipients (76,87). Per homogeneïtzació entenem processos manuals com l'agitació dels recipients i processos elèctrics com un l'ús d'un sonicador o d'un mesclador tipus vòrtex. L'homogeneïtzació és important pels anàlisis de llet humana amb finalitats d'investigació, però també en la pràctica clínica. Durant l'emmagatzematge de la llet, com comentàvem prèviament, els glòbuls de greix s'adhereixen a les parets d'alguns recipients i també a les parets de les sondes durant l'alimentació, sobretot en cas de

mostres mal homogeneïtzades (109) i en especial quan la ràtio superfície/volum és alta (87).

No existeix un protocol universal que descriu el circuit òptim per a obtenir i preparar aquests tipus de mostres, i les metodologies de treball difereixen molt segons el propòsit de cada investigador (110). Tot i això, és probable que la mostra de llet materna més representativa sigui aquella que:

- Reflecteixi la producció d'ambdós pits després d'una extracció completa (111)
- S'obtingui com a *pool* de les preses al llarg de tot un dia per evitar la influència dels ritmes circadians
- Sigui fresca o hagi estat refrigerada a 4 °C menys de 96 hores (112)

3.2.2. Variabilitat al llarg de les setmanes de lactància.

Característiques del calostre, la llet de transició i la llet madura

A mesura que passen les setmanes de lactància, la llet canvia la seva composició. El calostre és la primera llet produïda, amb un baix contingut en greix, però un alt contingut en proteïnes del sèrum i factors immunològics. Una de les principals característiques del calostre és l'alta concentració de components bioactius com oligosacàrids, immunoglobulines, lactoferrina i leucòcits (113). La llet de transició (a partir dels 3-5 dies) augmenta gradualment en volum i en concentració de lípids. Al voltant del mes, la llet ja és madura i molt més rica en greixos i energia (61,72). Aquests canvis composicionals es produeixen de forma gradual. Les modificacions en concentracions de macronutrients de la llet són més marcades durant el primer mes; posteriorment la composició s'assumeix més estable (36,52,67,73).

Diferents treballs han descrit les variacions en el contingut de macronutrients de llet materna al llarg de les setmanes de lactància després d'un part prematur (68–73,88,90,114–119).

INTRODUCCIÓ

La concentració de proteïnes disminueix progressivament durant les primeres 12 setmanes de lactància. Els estudis que han treballat amb calostro, que són pocs per la seva escassa disponibilitat i per motius ètics, mostren concentracions aproximades d'entre 2,0 i 2,5 g/dl al tercer dia i entre 1,6 i 2,2 g/dl als 7 dies. En termes generals, a partir del mes la concentració de proteïnes oscil·la entre 0,9 i 1,6 g/dl (68–73,88,90,114–119). La Taula 1 i la Figura 1 mostren la concentració de proteïnes en g/dl segons el temps de lactància després d'un part prematur en treballs que analitzen la llet materna per infrarojos.

Taula 1. Concentració de proteïnes (g/dl) segons el temps de lactància després d'un part prematur en treballs que analitzen la llet per infrarojos (68-73,88,90,114-117,119).

	Dia 3	Dia 7	Dia 14	Set 3	Set 4	Set 5	Set 6	Set 8	Set 10	Set 12	Tipus de proteïna
Thakur et al. 2021		1,4 ± 0,3	1,2 ± 0,3	1,2 ± 0,3	1,2 ± 0,3						Proteïna real
Sahin et al. 2020	1,9 (1,6-2,1)	1,6 (1,4-1,9)	1,5 (1,2-1,6)		1,4 (1,2-1,7)						No especificat
Bucianova et al. 2019		1,6 (1,4-1,9)	1,3 (1,1-1,5)	1,1 (0,9-1,2)	1,0 (0,9-1,2)	1,0 (0,8-1,1)	0,9 (0,8-1,1)				Proteïna total
Bulut et al. 2019		1,8 ± 0,4	1,5 ± 0,2	1,3 ± 0,2	1,2 ± 0,2	1,1 ± 0,2	1,0 ± 0,2				Proteïna real
Lafuente et al. 2019	2,0 ± 0,1							0,8 ± 0,5		0,7 ± 0,1	Proteïna total
Fischer et al. 2019		2,2 ± 0,3								1,5 ± 0,5	Proteïna total
Hascoet et al. 2019		1,8 ± 0,4	1,4 ± 0,4	1,3 ± 0,3	1,1 ± 0,4	1,0 ± 0,4					No especificat
Dritsasou et al. 2017	2,7 + 1,6	2,2 + 1,2			1,8 + 0,9						Proteïna real
Kreiss et al. 2016			1,7 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,2						No especificat
Hsu et al. 2014		1,7 ± 0,5			0,9 ± 0,3						No especificat
Zachariassen et al. 2013			1,8 ± 0,4		1,5 ± 0,3		1,4 ± 0,3	1,3 ± 0,3	1,3 ± 0,3	1,2 ± 0,2	No especificat

Dades expressades com a mitjana ± desviació estàndard o com a mediana i (rang interquartilic)

INTRODUCCIÓ

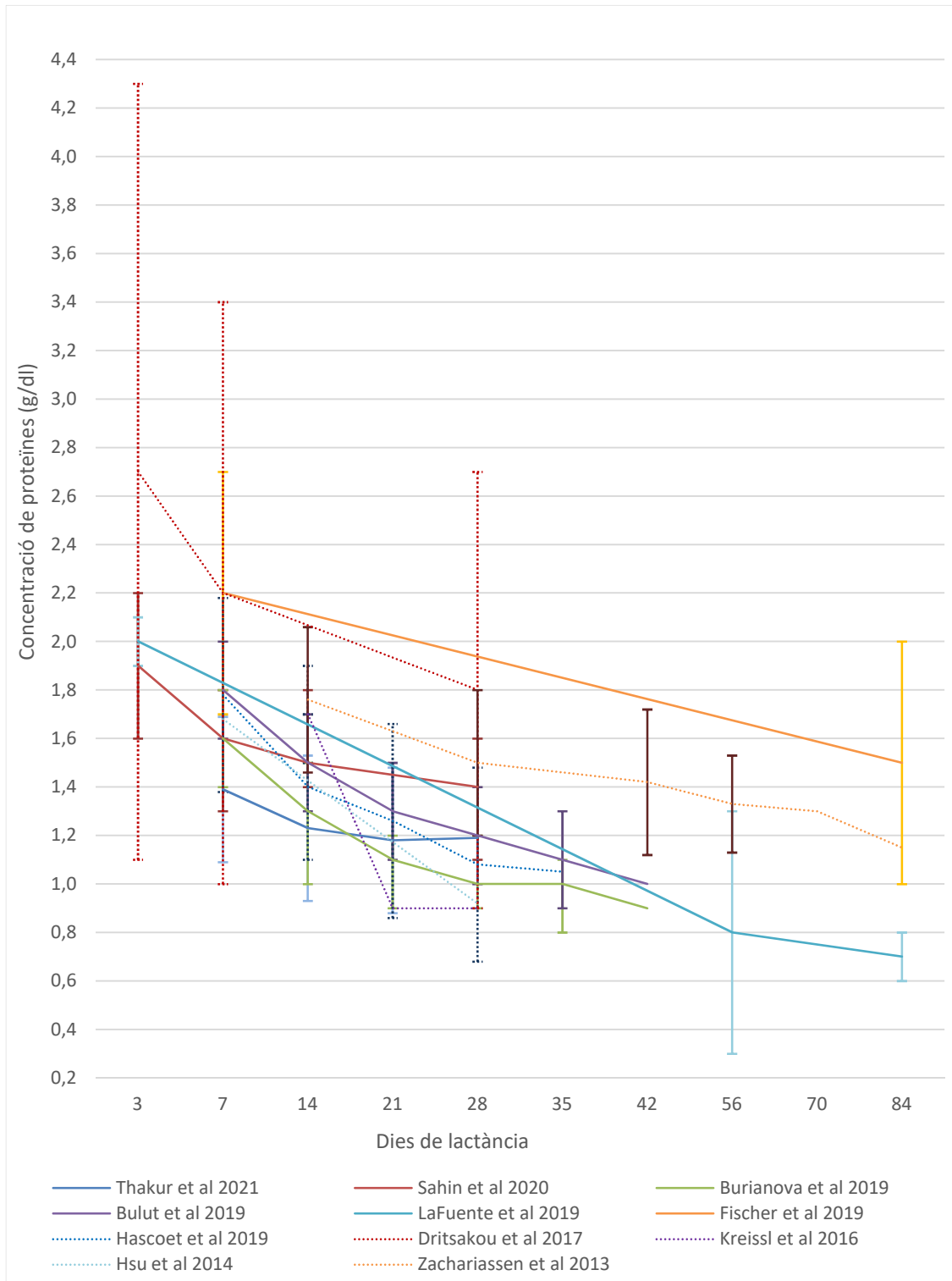


Figura 1. Representació de la concentració de proteïnes (g/dl) referenciats en la taula 1 (pàgina 19) segons el temps de lactància després d'un part prematur en treballs que analitzen la llet per infrarojos (68,70–73,88,90,114–117,119).

La concentració de carbohidrats augmenta fins la quarta - cinquena setmana i després es manté estable. Els estudis mostren concentracions aproximades d'entre 6,2 i 6,6 g/dl entre el tercer i el setè dia, i d'uns 7 g/dl a partir del mes (68–73,88,90,114–119). La Taula 2 i la Figura 2 mostren la concentració de carbohidrats en g/dl segons el temps de lactància després d'un part prematur en treballs que analitzen la llet materna per infrarojos.

Taula 2. Concentració de carbohidrats (g/dl) segons el temps de lactància després d'un part prematur en treballs que analitzen la llet per infrarajos (68–73, 88, 90, 114–117, 119).

	Dia 3	Dia 7	Dia 14	Set 3	Set 4	Set 5	Set 6	Set 8	Set 10	Set 12
Thakur et al. 2021		5,1 ± 0,8	5,3 ± 1,1	5,2 ± 0,7	5,1 ± 0,8					
Şahin et al. 2020	6,3 ± 1,0	6,9 ± 1,2	7,2 ± 1,3		7,2 ± 1,3					
Burianova et al. 2019		6,5 (6,1-6,7)	6,7 (6,5-6,9)	6,8 (6,6-7,1)	6,9 (6,6-7)	6,9 (6,6-7)	6,9 (5,6-7,1)			
Bulut et al. 2019		6,3 ± 0,6	6,8 ± 0,4	7 ± 0,3	7 ± 0,2	7 ± 0,2	7,1 ± 0,2			
Calvente et al. 2019	6,5 ± 0,1		6,7 ± 0,1		5,9 ± 0					
Fischer et al. 2019							6,1 ± 0,5			
Hascceet et al. 2019		6,5 ± 0,43	6,7 ± 0,4	6,7 ± 0,5	6,8 ± 0,4	6,8 ± 0,4				
Dritsakou et al. 2017	6,2 ± 0,9	6,6 ± 0,5			6,9 ± 0,6					
Kreissl et al. 2016			6,5 ± 0,3	6,7 ± 0,2	6,7 ± 0,2					
Hsu et al. 2014		6,4 ± 0,5			6,8 ± 0,4					
Zachariassen et al. 2013			6,9 ± 0,4		7,1 ± 0,3		7,0 ± 0,4	7,0 ± 0,3	6,9 ± 0,3	7,1 ± 0,2

Dades expressades com a mitjana ± desviació estàndard o com a mediana i (rang interquartílic)

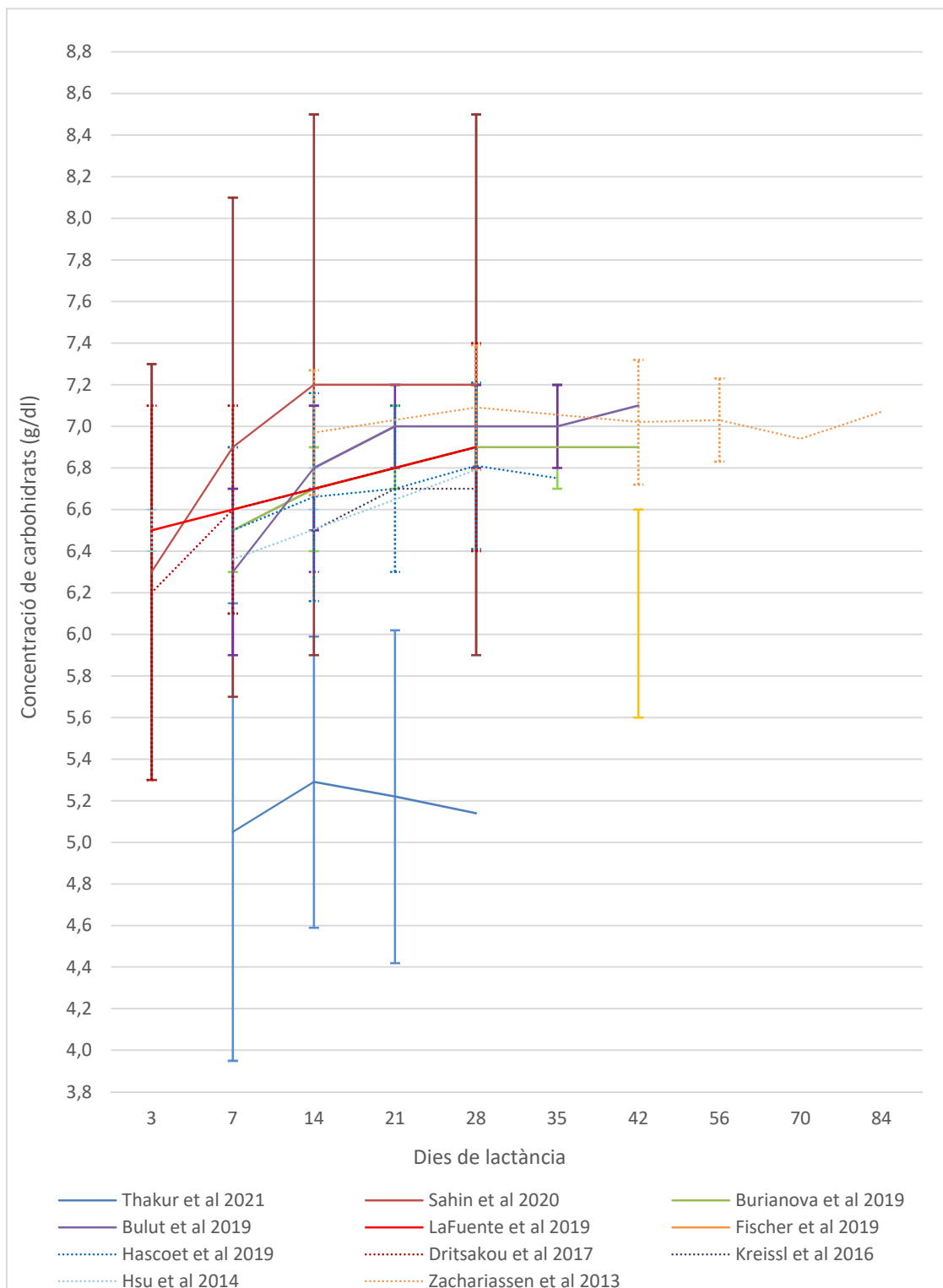


Figura 2. Representació de la concentració de carbohidrats (g/dl) referenciats en la taula 2 (pàgina 22) segons el temps de lactància després d'un part prematur en treballs que analitzen la llet per infrarojos (68,70–73,88,90,114–117,119).

INTRODUCCIÓ

El greix és el macronutrient més variable de la llet (36), la seva concentració augmenta progressivament durant les primeres setmanes de lactància. Els estudis mostren concentracions aproximades d'entre 2,5 i 3,9 g/dl al tercer dia, entre 2,6 i 3,7 g/dl al setè dia, i entre 3,5 i 4 g/dl a partir del mes (68–73,88,90,114–119). La Taula 3 i la Figura 3 mostren la concentració de lípids en g/dl segons el temps de lactància després d'un part prematur en treballs que analitzen la llet materna per infrarojos.

Taula 3. Concentració de lípids (g/dl) segons el temps de lactància després d'un part prematur en treballs que analitzen la llet per infrarojos (68-73,88,90,114-117,119).

	Dia 3	Dia 7	Dia 14	Set 3	Set 4	Set 5	Set 6	Set 8	Set 10	Set 12
Thakur et al. 2021		2,6 ± 1,1	3,0 ± 1,1	3,3 ± 1,0	3,7 ± 1,8					
Sabini et al. 2020	2,9 (1,8-3,2)	3,4 (2,6-4,2)	3,3 (2,3-4,1)		3,4 (2,0-4,7)					
Bucianova et al. 2019		3,7 (2,9-4,7)	4 (3,4-5)	3,9 (3,2-4,8)	3,9 (3,3-4,7)	3,8 (3,1-4,6)	3,7 (3-4,5)			
Bulut et al. 2019		3,1 ± 0,8	3,8 ± 0,6	4 ± 0,5	4,1 ± 0,5	4 ± 0,7	4,1 ± 0,7			
Lafuente et al. 2019	3,9 ± 0,1				3,9 ± 0,1					2,1 ± 0,4
Fischer et al. 2019		2,8 ± 1,1								
Hascquet et al. 2019		3,2 ± 0,8	3,7 ± 1,0	3,6 ± 1,0	3,4 ± 1,0	3,4 ± 1,1				
Dritsakou et al. 2017	2,7 ± 1,0	3,2 ± 1,0			3 ± 1,1					
Kjellss et al. 2016			3,1 ± 1,3	3,6 ± 0,4	3,6 ± 0,4					
Liu et al. 2014		2,7 ± 0,7			4,0 ± 1,0					
Zachariassen et al. 2013			3,5 ± 0,7		3,4 ± 0,7		3,4 ± 0,6	3,5 ± 0,8	3,6 ± 1,0	3,4 ± 1,0

Dades expressades com a mitjana ± desviació estàndard o com a mediana i (rang interquartílic)

INTRODUCCIÓ

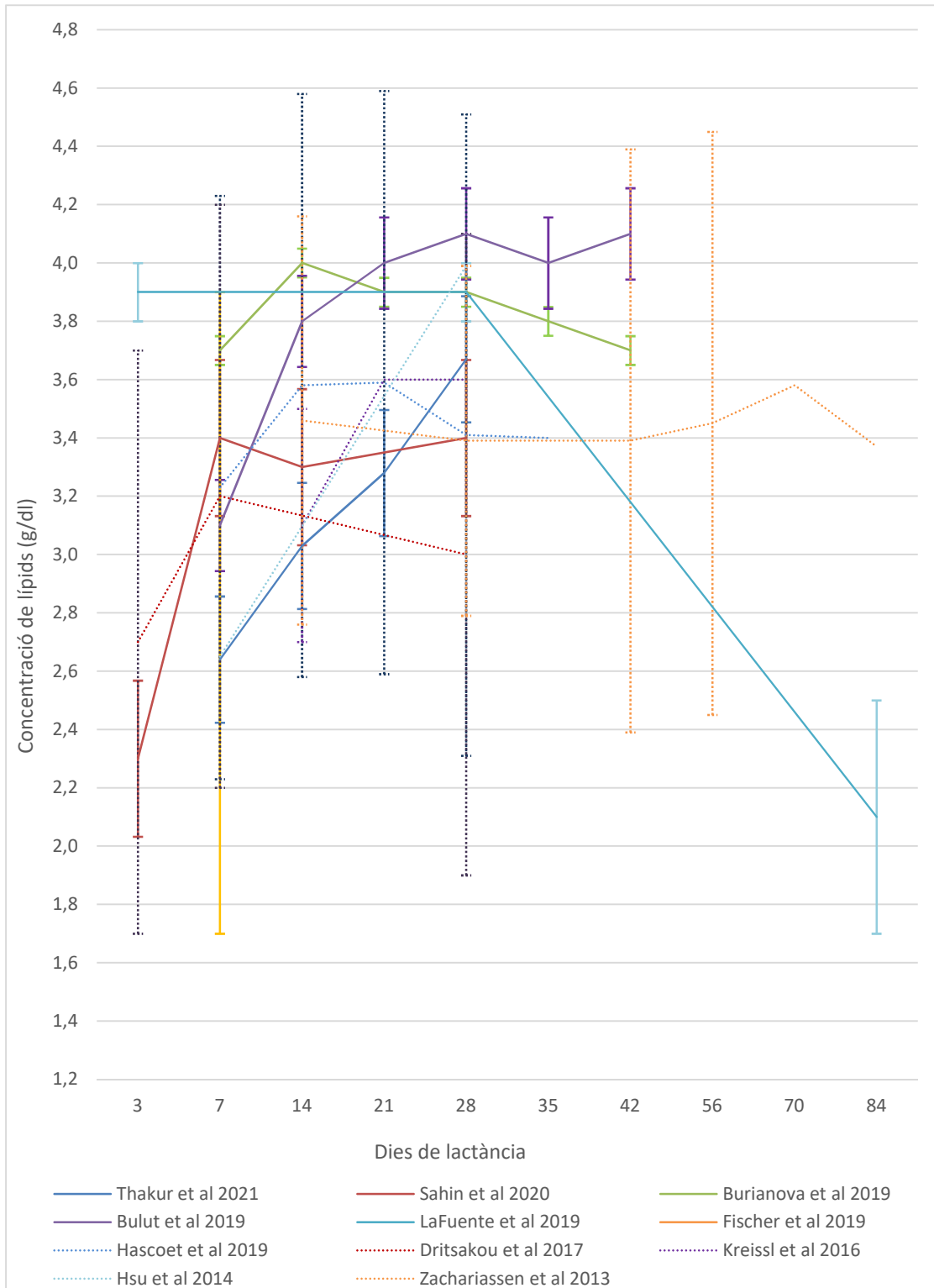


Figura 3. Representació de la concentració de lípids (g/dl) referenciats en la taula 3 (pàgina 25) segons el temps de lactància després d'un part prematur en treballs que analitzen la llet per infrarojos (68,70–73,88,90,114–117,119).

El contingut energètic i el contingut en greixos estan directament relacionats (120) i augmenten progressivament durant les primeres setmanes de lactància. Els estudis mostren concentracions entre 59 i 65 kcal/dl al tercer dia, entre 58 i 69 kcal/dl al setè dia, i en un interval més ampli entre 60 i 75 kcal/dl a partir del mes (68–73,88,90,114–119). La Taula 4 i la Figura 4 mostren la concentració d'energia en kcal/dl segons el temps de lactància després d'un part prematur en treballs que analitzen la llet materna per infrarojos.

Taula 4. Concentració d'energia (kcal/dl) segons el temps de lactància després d'un part prematur en treballs que analitzen la llet per infrarojos (68 73,88,90,114 117,119).

	Dia 3	Dia 7	Dia 14	Set 3	Set 4	Set 5	Set 6	Set 8	Set 10	Set 12
Thakur et al. 2021		52,1 ± 10,9	57,3 ± 13,7	58,4 ± 9,9	61,1 ± 10,5					
Sahin et al. 2020	60,4 ± 12,0	68,7 ± 11,9	67,5 ± 12,3		69,7 ± 18,7					
Quinones et al. 2019		69 (61-77)	71 (65-80)	69 (69-75)	68 (69-75,2)	68,5 (61-75)	67 (60-74,2)			
Bulur et al. 2019		66 ± 7,3	72,2 ± 5,9	73,7 ± 4,8	74 ± 5,1	73,1 ± 6,4	74,1 ± 6,3			
Lafuente et al. 2019	65,5 ± 1,7		74,5 ± 1,6							50 ± 5,1
Fischer et al. 2019		58,7 ± 10,2								
Dritsakou et al. 2017	59,9 ± 8,0	61,1 ± 8,4			57,9 ± 8,5					
Kreissl et al. 2016			61,0 ± 14,0	64,0 ± 4,0	64,0 ± 4,0					
Hsu et al. 2014		59,6 ± 6,0			68,6 ± 8,3					
Lachanassin et al. 2013			62,1 ± 8,9		60,8 ± 7,4		60,4 ± 7,1	61,0 ± 8,7	62,4 ± 11,4	59,8 ± 10,2

Dades expressades com a mitjana + desviació estàndard o com a mediana i (rang interquartílic)

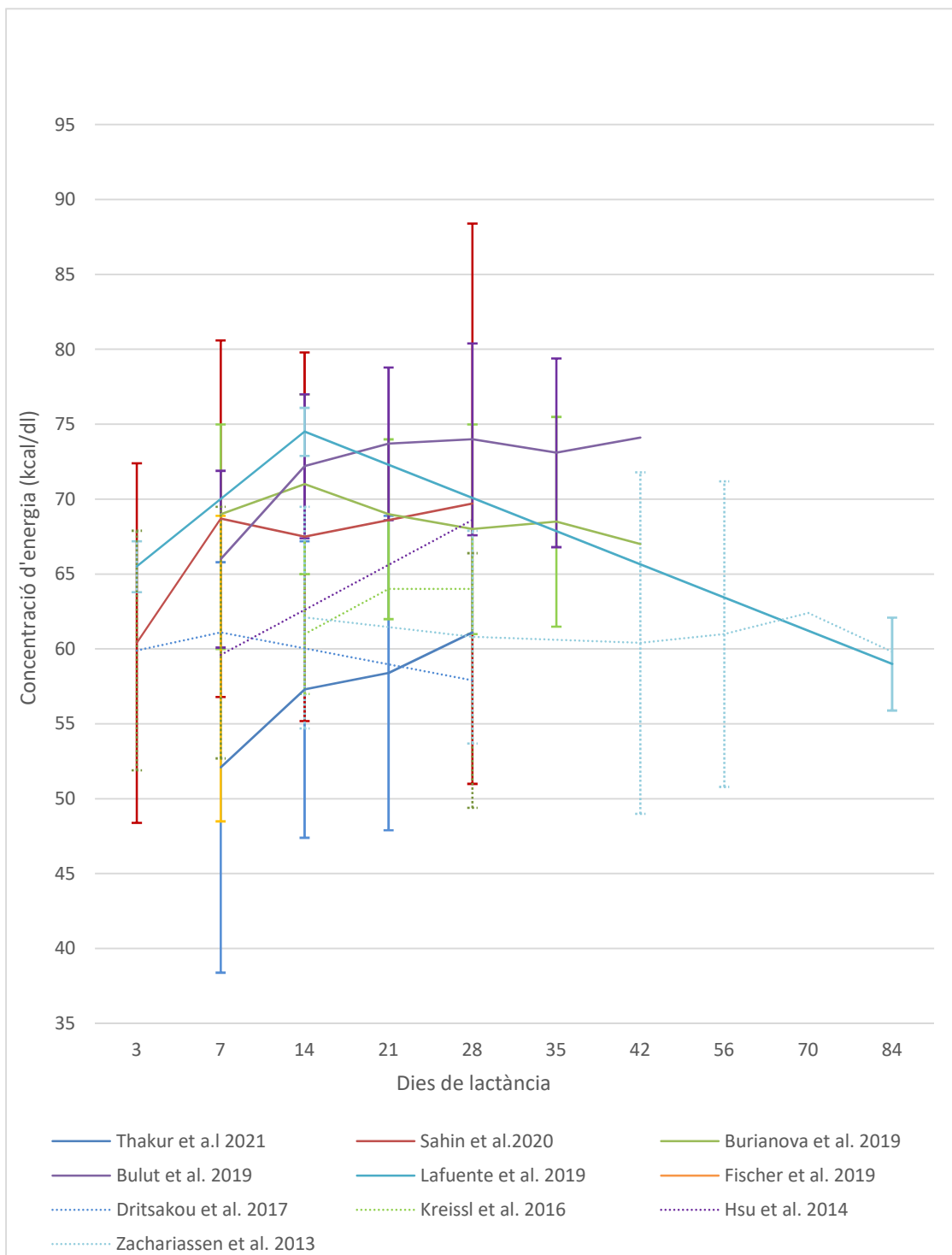


Figura 4. Representació de la concentració d'energia (kcal/dl) referenciats en la taula 4 (pàgina 28) segons el temps de lactància després d'un part prematur en treballs que analitzen la llet per infrarojos (68,70–73,88,90,114–117,119).

3.2.3. Canvis en la composició de macronutrients en relació amb factors materns, gestacionals i neonatals

S'han descrit variacions en el contingut de macronutrients de la llet materna relacionades amb l'edat de la mare, amb característiques obstètriques, antropomètriques i de salut general, i amb certes característiques neonatals (36,61,71,72,78,115–117,121–124). Tot i això, els estudis en aquesta àrea són limitats i transversals, i és difícil extreure conclusions fermes perquè les metodologies són prou dispers (diferents edats gestacionals, mostres úniques o mostres representatives de varies hores, diferents tècniques per determinar la concentració de macronutrients, etc).

3.2.3.1. Associació de característiques materns amb la composició de macronutrients de la llet

Els estudis suggereixen que les mares d'edat avançada poden tenir dificultats en aconseguir una bona producció de llet (125), però l'efecte de l'edat materna sobre la composició de la llet és controvertit i s'ha descrit principalment en el context de parts a terme. Els canvis deguts al pas del temps en la glàndula mamària, que va perdent teixit i capacitat biosintètica, i en la secreció hormonal de prolactina, que disminueix, podrien resultar en una menor producció de volum de llet, però amb un augment relatiu de la concentració de greixos (72,126,127). Al mateix temps, l'augment en sang materna de colesterol, àcids grassos saturats i no saturats, que pot ocórrer amb el pas dels anys, podrien associar-se a un augment del contingut lipídic de la llet. Alguns estudis recolzen aquesta hipòtesi, trobant una correlació positiva entre l'edat materna i el contingut greixós de la llet (72,126,127). Segons Dritsakou *et al.* el calostre conté 0,25 g/dl més de greix, la llet de transició 0,31 g/dl i la llet madura 0,17 g/dl en les mares de més edat (72); i segons el grup de Lubetzky *et al.* existeix una correlació positiva feble entre contingut lipídic i edat materna, descrita primer amb cremàtocrit i posteriorment amb espectroscòpia d'infrarojos (126,127). No obstant, altres autors descriuen l'efecte invers (121) o una absència de relació entre aquestes variables (114,117). És possible que aquestes discrepàncies es deguin a diferents poblacions

d'estudi, la utilització de diferents mètodes de recollida de llet materna i de mesura del contingut de macronutrients (analitzadors de llet per infrarojos, tècnica del crematòcrit) i a diferents definicions de mare d'edat avançada (punt de tall als 25, 30 o 35 anys).

Més estudiada ha estat la influència del sobrepès o l'obesitat materna en la composició de la llet (71–73,82,117,122,128–131). S'especula que aquelles mares afectes de sobrepès o obesitat podrien presentar un augment de triglicèrids i d'aminoàcids de cadena ramificada en sang, una alteració de la lipogènesis i de la síntesi de lactosa i/o una exacerbació de l'estrès oxidatiu i dels estats proinflamatoris que modificarien la concentració de macronutrients de la llet (71,72,117,129,131). Tot i la possible variació composicional no quedaria clar si el creixement a mig termini dels lactants es veuria afectat (129,130).

Es postula que la glàndula mamària de les mares diabètiques presenta un funcionament diferent que condiciona un augment de l'activitat lipasa i una esterificació anormal que provocaria un augment en la concentració de lípids i d'energia (72,132) sense canvis en la concentració de carbohidrats i proteïnes (133). No obstant, hi ha autors que descriuen troballes contràries. Shapira *et al.* descriuen en un grup petit de mares diabètiques una menor concentració de greixos i d'energia en llet madura i especula que podria tractar-se d'un mecanisme protector enfront futurs trastorns metabòlics d'aquests lactants (134). Quan s'investiga la relació entre la composició de macronutrients de la llet i la diabetis materna, és important descriure si es parla de diabetis pregestacional o gestacional, i si en aquest cas són mares dependents d'insulina, i valorar si hi ha solapament entre mares afectes de diabetis i al mateix temps de sobrepès o obesitat.

Aquelles dones que hagin passat per un procés de cirurgia mamària tipus mamoplastia d'augment poden tenir dificultats en la lactància (50), tot i que depèn de la tècnica utilitzada. Les tècniques que preserven la columna del parènquima subareolar semblen tenir més probabilitats d'alletar amb èxit (135). No hi ha articles publicats que estudiïn la relació entre composició de llet materna i antecedent de cirurgia mamària

INTRODUCCIÓ

d'augment. No obstant, és possible que la manipulació de la glàndula mamària pugui alterar la lactogènesi.

S'ha descrit en la literatura que l'exposició al tabac durant la lactància pot disminuir la concentració de macronutrients de la llet materna, però en mides mostrals relativament petites (71,115,122,136). Els metabòlits del tabac, com la nicotina i la cotinina, es distribueixen per tot l'organisme, amb una correlació lineal entre el sèrum i la llet (137–139). S'hipotetitzava que s'emmagatzemarien en el teixit adipós de la glàndula mamària i alterarien el procés de lactogènesi, causant un descens en els nivells de prolactina que afectaria la secreció de proteïnes i/o greixos en la llet (71,122).

S'ha demostrat que la cafeïna es transmet a la llet materna (140). L'Acadèmia Americana de Pediatria considera que el consum de fins a 2 tasses de cafè al dia no genera efectes nocius en el lactant (141,142). La revisió de Nehlig *et al.* de l'any 1994 sobre els efectes de la cafeïna en la composició de la llet materna conclouia que no hi havia canvis (143).

3.2.3.2. Associació de característiques gestacionals amb la composició de macronutrients de la llet

Congiu *et al.* van estudiar la llet materna de prematurs fruit de gestacions múltiples, descrivint un major contingut proteic i un menor contingut lipídic, fet que podria afavorir i mantenir el creixement i el desenvolupament d'òrgans en aquesta població més vulnerable (144). L'estudi es va portar a terme amb només 9 bessons i 28 fills únics de 24 a 28 setmanes de gestació, i el grup de bessons presentava una elevada proporció de nadons de baix pes (18,6% vs 3,7%) que podria haver influït en les troballes.

Pocs estudis han abordat l'efecte de la preeclàmpsia en la composició de la llet materna. Alguns autors han descrit recentment una major densitat energètica i

proteica en les mares afectes d'hipertensió induïda per l'embaràs (145,146); tanmateix, altres autors no descriuen diferències (147). Peila *et al.* conclouen en la seva revisió de l'any 2021 que podria existir una disminució en la concentració de macronutrients en la llet materna de mares primíparaes afectes de preeclàmpsia amb gestacions a terme (148). Aquests resultats discordants es podrien deure a aspectes metodològics entre els que s'inclouen diferents definicions de la patologia preeclàmptica.

Hascoet *et al.* van descriure l'any 2019 que l'absència d'administració de corticoides prenatals en parts abans de les 34 setmanes de gestació tenia una moderada correlació negativa amb la concentració de proteïnes (115). No hi ha altres estudis que abordin l'efecte dels corticoides prenatals sobre la producció de llet materna.

Altres factors com la paritat sembla que també alterarien la composició de la llet materna, provocant un augment del contingut lipídic. Aquest increment en el greix de la llet relacionat amb la paritat es podria atribuir als canvis histològics i anatòmics de la glàndula mamària durant els embarassos successius (122). Aquesta hipòtesi pot estar també recolzada per la correlació creixent de concentració de lípids amb l'edat materna que hem descrit anteriorment. Contràriament, Burianova *et al.* no van descriure canvis en el contingut en greixos i energia del calostre per la paritat, però sí augments en la concentració de proteïnes i hidrats de carboni – tot i que discrets (71).

S'ha publicat que la via de part és un altre factor que modifica la composició de macronutrients de la llet materna. S'hipotetitzava que els factors hormonals associats al treball de part podrien tenir un efecte sobre els macronutrients de la llet, efecte que es podria perllongar setmanes després del part (71). Tot i així, els diferents treballs publicats mostren resultats contradictoris. Dizdar *et al.* van descriure que el contingut proteic en les mares sotmeses a una cesària a l'edat de terme era més baix (121) però Sahin *et al.* van determinar que era més alt (114) - treballs amb recollides en diferents dies de lactància, en diferents hores del dia i en poblacions de diferents edats gestacionals. Cap dels dos autors van trobar diferències en la concentració d'altres macronutrients de la llet, com tampoc ho van fer Fumeaux *et al.* en els seus anàlisis de 500 mostres (70). Centrant-se específicament en una població de nounats prematurs,

INTRODUCCIÓ

Burianova *et al.* van objectivar diferències en les concentracions de proteïnes i carbohidrats entre el calostre i la llet madura de mares amb un part vaginal versus un part per cesària, així les primeres tindrien entre 0,07 i 0,2 g/dl menys respectivament (71).

Segons Zachariassen *et al.* haver lactat prèviament, fet que podria implicar majors quantitats de llet de forma més precoç, es relaciona amb una menor concentració de proteïnes a les dues setmanes del naixement (117).

No hi ha estudis que descriguin canvis en la composició de la llet materna en relació amb l'ús de tècniques de reproducció in vitro.

3.2.3.3. Associació de característiques neonatals amb la composició de macronutrients de la llet

Un punt important, i controvertit en la literatura mèdica, és com la concentració de nutrients de la llet canvia en funció de l'edat gestacional del nounat (54,64,147,148,66,71,109, 116,119,132,143,146). Tenint en ment la idea que la llet que produeix una mare s'adapta a les necessitats particulars del seu nadó, seria plausible que en cas de part prematur la llet materna fos més rica en certs macronutrients com ara en proteïnes i energia (72), especialment durant les primeres 10-12 setmanes de vida, ja que sembla que a partir d'aquest punt l'efecte de l'edat gestacional s'atenuaria (67). Aquesta variació en la composició de la llet materna prematura es podria deure a un menor flux sanguini cap a la glàndula, una diferenciació incompleta de les cèl·lules epitelials i a una absència de les unions intercel·lulars donat que no s'han completat totes les setmanes de gestació (153,154). La majoria d'autors descriuen un augment de proteïnes, lípids i/o energia en les mostres de llet materna de prematurs de menys de 32 setmanes de gestació (en alguns casos de menys de 37 setmanes) en diferents punts temporals de les primeres setmanes de lactància (67,70,72,117,144,151) en comparació amb la llet de mares de nens nascuts a terme. No obstant, hi ha varis autors que no descriuen diferències composicionals entre la llet de nounat prematurs de diferents edats gestacionals o entre la llet de nounat prematurs i de nounat a terme

(88,90,114,149,152). Aquesta troballa es podria deure al fet que l'efecte de l'edat gestacional pot ser dèbil i transitori, i que en molts estudis la edat gestacional no és avaluada com una variable continua sinó que estudien cohorts agrupant varies setmanes (de 24 a 28, de 28 a 32; de 24 a 30, de 31 a 35 setmanes) i aquest efecte es podria veure atenuat per la heterogeneïtat de la mostra. La figura 5 mostra la concentració de proteïnes en g/dl segons el temps de lactància materna després d'un part prematur segons estudis que analitzen llet per infrarojos en funció de l'edat gestacional.

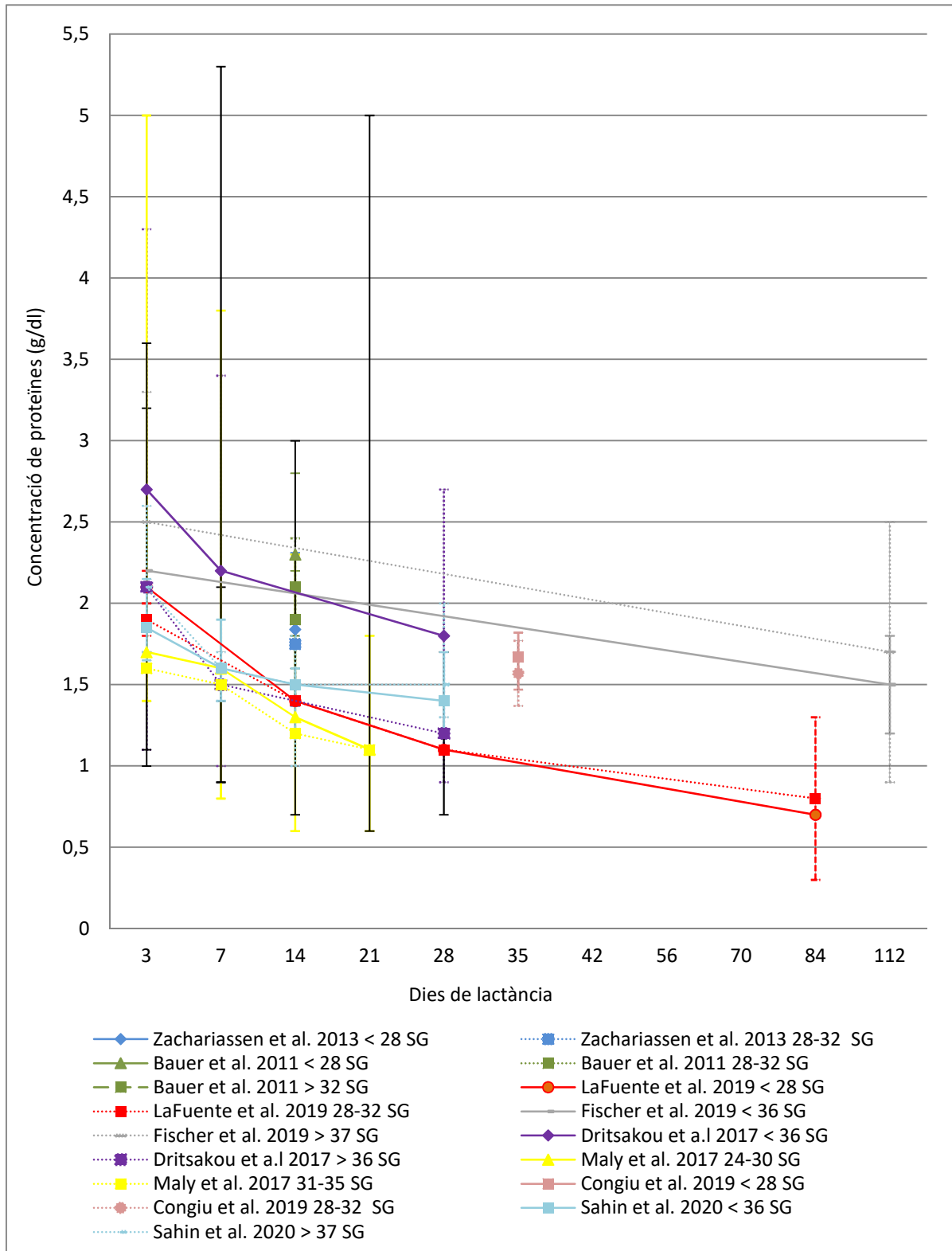


Figura 5. Concentració de proteïnes (g/dl) segons el temps de lactància materna després d'un part prematur segons estudis que analitzen llet per infrarojos en funció de l'edat gestacional (70,72,88,114,117,144,151,152).

Així mateix, semblaria plausible que la composició de la llet materna s'adaptés al pes al néixer del nounat prematur; aquelles mares de nadons amb menor pes produirien una llet més rica nutricionalment. Aquest fet s'ha explorat en alguns estudis amb troballes discordants. Dritsakou *et al.* descriuen que el pes al néixer té una correlació negativa amb el contingut de greix i energia (72), però en canvi d'altres autors no troben diferències rellevants (155,156). Aquest darrers autors, Phattraprayoon *et al.* i Domany *et al.*, treballen amb mostres de nounats a terme i és possible que l'associació del pes i la composició de la llet no sigui tan notòria.

Recentment s'han publicat treballs que investiguen el possible paper que té el sexe del nadó en la composició macronutricional de la llet materna. S'ha descrit que la llet de mares amb lactants masculins és més rica en lípids i/o energia que la llet de mares amb lactants femenins (70,157,158), però no en tots els treballs (159). Es pot hipotetitzar que les glàndules mamàries materns es poden veure afectades prenatalment per factors hormonals determinats del sexe fetal, i adaptar-se per a un teòric major requeriment energètic en cas de nounat masculins (160).

3.3. LLET DE DONANT

En aquelles situacions en què la producció de llet materna no arriba a cobrir els requeriments del nounat molt prematur les societats científiques recomanen l'ús de la llet humana de donant com a primera alternativa (161). La llet de donant ha demostrat beneficis respecte a l'ús de llet artificial per prematurs en termes de millor tolerància digestiva i en disminució de la incidència d'enterocolitis necrosant, displàsia broncopulmonar, retinopatia del prematur i sèpsia nosocomial (40,43,162,163), però no en termes de creixement (162). S'ha de tenir en compte que la majoria de llet de donant correspon a llet madura (164) – probablement amb una concentració de proteïnes més baixa – i està sotmesa a un procés de pasteurització, que també n'altera les propietats, sobretot pel què fa a proteïnes amb funcions immunològiques i antiinfeccioses (165).

La llet de donant que s'utilitza en els hospitals on s'ha portat a terme aquesta tesi prové del Banc de Llet Materna de Catalunya, integrat en el Banc de Sang i Teixits. El Banc de Llet Materna de Catalunya rep, de manera altruista, llet materna procedent de mares sanes no consumidores de tabac, alcohol ni drogues amb excedent de producció.

3.4. FORTIFICACIÓ DE LA LLET HUMANA

La llet materna, tot i ser d'elecció en l'alimentació de qualsevol noutat, no proporciona, als volums habituals de ingesta, suficients nutrients per al noutat molt prematur, pel que la fortificació és una pràctica habitual a les Unitats Neonatals per augmentar el contingut de macronutrients i minerals (83,166). La fortificació s'aplica en llet materna pròpia o en llet de donant. Ha demostrat ser segura i condueix a un major creixement durant l'ingrés hospitalari, però sembla que no existeix evidència suficient respecte als efectes sobre el creixement ni el neurodesenvolupament més enllà (167).

Hi ha diferents productes disponibles per a fortificació que difereixen en l'origen de la llet utilitzada (bovina, humana o d'ase) i en la composició de nutrients (multicomponent o suplementos de proteïnes, lípids o hidrats de carboni per a fortificació individualitzada). Els suplementos d'hidratos de carboni es componen de dextrinomaltsa i els de lípids es componen de triglicèrids de cadena mitjana (166).

Existeixen tres tipus de fortificació: estàndard, ajustada i individualitzada. En la fortificació estàndard s'utilitza la quantitat de fortificant necessari per assolir el percentatge de concentració recomanat pel fabricant, amb l'inconvenient que s'assumeix una composició predefinida de macronutrients de la llet materna (74,86,119). En la fortificació ajustada, el fortificant es dosifica segons l'evolució del BUN (nitrogen ureic en sang) del pacient. Si el nivell de BUN està per sota d'un llindar predefinit, s'afegeix proteïna addicional en forma de suplement proteic; si el nivell de BUN és superior a un valor especificat (fet que suggereix una ingesta proteica excessiva) es redueix el nivell de fortificació (168). Finalment, la fortificació

individualitzada, proposada per primer cop per Polberger *et al.* l'any 1999 (169), fortifica la llet amb les proteïnes i els greixos necessaris en funció de la composició específica de la llet de cada mare (166). La taula 5 mostra els avantatges i inconvenients dels diferents tipus de fortificació i és una adaptació de Arslanoglu *et al.* amb les recomanacions de l'Associació Europea de Bancs de Llet (166).

Taula 5. Adaptació de Arslanoglu *et al.* amb les recomanacions de l'Associació Europea de Bancs de Llet dels diferents tipus de fortificació.

	Avantatges	Inconvenients
Fortificació estàndard	<ul style="list-style-type: none"> Pràctica 	<ul style="list-style-type: none"> Persisteix la desnutrició proteica i un creixement subòptim en els nounats més prematurs
Fortificació ajustada	<ul style="list-style-type: none"> Pràctica Eficaç per optimitzar el creixement i individualitzar la ingesta de proteïnes 	<ul style="list-style-type: none"> Requereix extraccions sanguínies seriades
Fortificació individualitzada	<ul style="list-style-type: none"> Es poden complementar tots els macronutrients 	<ul style="list-style-type: none"> Són necessaris analitzadors de llet Es segueixen recomanacions poblacionals, no individualitzades Es laboriós

En el nostre medi, es porta generalment a terme una fortificació estàndard amb fortificants bovins. Amb la variabilitat inherent en els macronutrients de la llet humana, sobretot pel que fa a greixos i proteïnes, això pot provocar una sobre o una infrafortificació (81,86,170). John *et al.* van trobar que més del 75% de les mostres de llet madura enriquides amb un fortificant proteic no assolien els 3,5 g/kg diaris de proteïnes sense excedir volums de 160 ml/kg/dia (164).

Semblaria que la fortificació individualitzada seria la més precisa, però falten encara estudis que recolzin la seva utilització universal. A més, els recursos econòmics i personals necessaris per aquesta fortificació són considerables (171,172).

INTRODUCCIÓ

En els últims anys, Prolacta Bioscience® ha comercialitzat fortificants derivats de la llet humana (166). El seu ús podria disminuir la incidència d'enterocolitis necrosant, però es necessiten més assaigs clínics per a recomanar aquesta intervenció (173–175). És important avaluar la relació benefici-risc, perquè aquests productes de fortificació són molt cars, i en la seva fabricació s'utilitzen grans quantitats de llet de donant que es podrien utilitzar directament per alimentar nadons ingressats.

4. IMPORTÀNCIA DE LA NUTRICIÓ PEL CREIXEMENT DEL NOUNAT MOLT PREMATUR

Un adequat patró de creixement postnatal tradueix l'adequat funcionament de múltiples processos fisiològics i reflecteix la gravetat de les patologies que ha tingut el nadó prematur i l'adequació de les cures administrades durant l'estància en les Unitats Neonatals. S'estima que el 50% del creixement del nounat prematur depèn del suport nutricional que rep (176). La quantitat de proteïna i d'energia proporcionades a un pacient prematur són uns dels determinants del seu creixement (177).

Des de l'any 1977, l'Acadèmia Americana de Pediatria considera que el creixement d'un nounat prematur hauria de ser comparable al que hagués tingut en ambient intrauterí en cas de què la gestació hagués prosseguit sense incidències (178); però en els últims anys varis autors postulen que el nounat prematur no hauria de ser considerat ni en sentit nutricional, metabòlic ni fisiològic com un fetus, ni tampoc seria adequat tractar-lo com a tal (20).

Les alteracions del creixement postnatal, tant per un creixement deficient com per un creixement excessiu, poden resultar perjudicials. Un creixement postnatal deficient (veure apartat 4.2. Fracàs de creixement postnatal) s'ha associat a un augment de la mortalitat i la mobilitat, i a un pitjor neurodesenvolupament (20,179). Un creixement postnatal excessiu pot conduir a un augment del risc metabòlic i cardiovascular en etapes ulteriors de la vida (20,180).

El creixement postnatal té també relació amb el creixement prenatal. Un creixement prenatal deficient és indicador d'un problema durant la gestació. És important diferenciar aquells fetus que són constitucionalment petits (és a dir aquells fetus que estant creixent correctament però el seu pes es situa en percentils baixos) d'aquells que estan creixent de forma inadequada durant la gestació per problemes materns, placentaris o del propi fetus (181). Aquests darrers fetus, afectes d'una restricció de creixement intrauterí, no hauran assolit tot el seu potencial de creixement al moment de néixer, fet que tindrà múltiples conseqüències en la seva evolució (182), incloent el risc de presentar des d'un retràs ponderal durant la infància fins a una tendència

a l'obesitat en l'adolescència (183). Donades les peculiaritats d'aquesta població, semblaria adequat estudiar de forma separada el creixement dels nounats molt prematurs amb un retràs del creixement intrauterí respecte als que no el van presentar.

Tot i la importància del creixement postnatal, no existeix un clar consens entre els neonatòlegs alhora de valorar-lo i categoritzar-lo (18,184).

4.1. CREIXEMENT DEL NOUNAT PREMATUR

4.1.1. Valoració del creixement del nounat prematur

Fenton *et al.* van publicar l'any 2017 una revisió sistemàtica on examinaven la variabilitat en la valoració del creixement i la definició de restricció del creixement extrauterí en els pacients prematurs (185). Van concloure que el mètode més utilitzat per valorar el creixement era la velocitat de creixement (definida com a g/kg/dia de pes, seguit de g/dia de pes) i el canvi de puntuació Z en relació a una determinada corba de creixement. Els dos punts temporals més utilitzats per a determinar la velocitat de creixement van ser el naixement/ingrés i l'alta hospitalària. La corba més utilitzada per a la mesura de la puntuació Z va ser la de Fenton *et al.* de l'any 2003 (186). La forma més freqüent de definir fracàs de creixement postnatal era un pes per sota del percentil 10 per a certa edat postmenstrual. Malgrat aquesta heterogeneïtat, les darreres publicacions sobre creixement en prematurs, i d'acord amb las directrius de l'Organització Mundial de la Salut (OMS), suggereixen que el millor mètode per a l'anàlisi i la presentació de dades antropomètriques és la puntuació Z (181,187,188).

La puntuació Z representa la distància, mesurada com nombre de desviacions estàndard (DE) per sobre o per sota, d'un determinada dada respecte la mitjana en una població de referència. Pot tenir valors tant positius com negatius i el valor 0 equival a la mitjana de la població.

Es calcula mitjançant la següent fórmula:

$$\text{Puntuació } Z = \frac{[\text{dada observada} - \text{mitjana de la població de referència}]}{\text{DE del valor en la població de referència}}$$

La puntuació Z és una variable continua que permet estadístiques descriptives i càlculs matemàtics i és útil per a la detecció de canvis en els extrems de les distribucions. En canvi, la velocitat de creixement calculada per g/kg/dia de pes pot variar molt en funció dels punts temporals que es seleccionen, i pot magnificar falsament el creixement d'aquells nadons que parteixen de pesos al néixer més baixos, com ara els nounats amb un retràs de creixement intrauterí (189).

La puntuació Z és un bon substitut dels percentils (àmpliament utilitzats en pediatria), però també té les seves limitacions, sent molt important especificar sobre quina referència es calcula (190).

4.1.2. Corbes de creixement

Les corbes de creixement són essencials per valorar el creixement postnatal dels nounats prematurs i serveixen per ubicar un valor antropomètric dins de la distribució d'una població. S'han utilitzat diferents corbes de referència: corbes fetals, corbes transversals o corbes longitudinals (191).

Les corbes fetals es basen en estimacions de pes obtingudes a través de les mesures de les ecografies prenatales (longitud femoral, perímetre abdominal, etc.) (191). Tot i que els nounats prematurs haurien de tenir teòricament una velocitat de creixement i una composició corporal similars a la d'un fetus a la seva mateixa edat gestacional (22), pot ser que aquestes corbes no siguin adequades perquè el pes fetal és una estimació del pes real i es sap que existeixen errors de mesura (192). A més, aquestes corbes de

INTRODUCCIÓ

creixement no tenen en compte la pèrdua de pes fisiològica que es produeix en el període neonatal (192).

Les corbes transversals s'obtenen amb mesures antropomètriques preses una sola vegada (al néixer) en nadons nascuts en diferents edats gestacionals i poden no representar el creixement real que es produeix durant la vida extrauterina (192). L'ambient al què està sotmès el nounat fora de l'úter, on el seu creixement dependrà de les condicions clíniques i de la nutrició rebuda, és molt diferent de l'ambient intrauterí on depèn del suport placentari (193). Segons Villar *et al.* seria millor conèixer-les com "Gràfics de mida al naixement".

Les corbes longitudinals s'obtenen a través de les evolucions longitudinals de les mesures de nounats prematurs. Moltes d'aquestes corbes són observacions no estandarditzades de mostres relativament petites d'un sol centre basades en una datació gestacional inexacte (192). Inclouen també casos amb patologia materna que poden alterar els resultats i el seguiment no sol ser molt llarg (192).

A l'arribar a l'edat de terme, els nounats prematurs poden ser monitoritzats fent servir les noves corbes prescriptives postnatales de la OMS (194). Tot i així, aquestes corbes s'han construït a partir de nadons sans alimentats amb lactància materna exclusiva i pot ser que els nadons prematurs no presentin un creixement equivalent a aquests nadons de referència, pel que es postula la creació de gràfiques pròpies per a ells (192).

L'any 2014, Villar *et al.* van desenvolupar uns estàndards antropomètrics al néixer i longitudinals internacionals per a fetus i nounats destinats a complementar els estàndards OMS de creixement infantil i permetre les comparacions entre poblacions dins del projecte Intergrowth-21st (195). La Taula 6 és una adaptació de Cordova i Belfora *et al.* (197) i mostra una comparativa entre les eines disponibles per a la valoració del pacient prematur disponibles en el projecte *Intergrowth-21st*. Pel projecte es van seleccionar vuit poblacions urbanes dels cinc continents ben definides, amb les necessitats de salut i nutrició satisfetes, amb una atenció prenatal adequada (inclosa una correcta datació de la gestació) i amb absència de factors ambientals que

poguessin influir negativament sobre el creixement. Aquestes darreres corbes de creixement tenen una morfologia peculiar.

Per aquells nounats de menor edat gestacional, l'any 2016 Villar *et al.* van ampliar les corbes per a nounats entre 24-33 setmanes de gestació tot i els factors de risc associats a aquestes gestacions (excepte els casos amb exposició al tabac i casos amb obesitat greu) però amb una n molt menor (196).

Taula 6. Comparació de les eines disponibles per a la valoració del pacient prematur disponibles en el projecte *Intergrowth-21st* (www.intergrowth21.org.uk). Taula adaptada de Cordova i Belfort, 2020 (197).

	<i>Intergrowth-21 st</i> Mida al néixer	<i>Intergrowth-21st</i> Molt prematur Mida al néixer	<i>Intergrowth-21st</i> Creixement postnatal del prematuro
Mètode	Estudi prospectiu internacional multicèntric amb selecció estricta d'embarassos de baix risc sense alteració del creixement fetal (2009-14)		Mesures repetides postnals
Edat gestacional al néixer (setmanes)	33-43	24-32	27-37
Mida de la mostra	1022	408	213
Característiques	Exclusos tots els factors materns i infantils relacionats amb el retràs de creixement intrauterí	Exclusos alguns factors materns i infantils relacionats amb el retràs de creixement intrauterí (no el tabaquisme o l'obesitat severa)	Exclusos tots els factors materns i infantils relacionats amb el retràs de creixement intrauterí

En neonatologia, és fonamental vigilar que els pacients creixin de forma adequada i rebin un suport nutricional òptim, però en aquest escenari de falta de directrius estandarditzades, tant en monitorització com en corbes de referència, la valoració del creixement del pacient prematur és un desafiament (192).

4.2. FRACÀS DEL CREIXEMENT POSTNATAL

Un dels problemes més freqüent dels nounats preterme és el fracàs del creixement postnatal (22,25,198,199). El Comitè de Nutrició de l'Acadèmia Americana de Pediatria (200) i el Comitè de Nutrició de la Societat Europea de Gastroenterologia, Hepatologia i Nutrició Pediàtrica (201) recomanen que els nounats prematurs tinguin una velocitat de creixement i una composició corporal similars a la de un fetus sa de la seva mateixa edat gestacional (22), però a la pràctica això és molt difícil d'aconseguir (20), tal i com hem comentat prèviament.

S'han utilitzat moltes definicions per a fracàs de creixement postnatal (202). Clàssicament, es defineix com pes per sota del percentil 10 entre les 36 o 40 setmanes d'edat postmenstrual o bé a l'alta hospitalària (20,22,203). Aquestes definicions suggereixen que els nadons prematurs haurien de pesar per sobre d'un percentil ≥ 10 a l'edat aproximada de terme sense tenir en compte en el percentil en el que van néixer o quin és el seu potencial de creixement genètic (181). Així, un nadó que va néixer en un percentil 90 i en el moment de l'alta de l'hospital està en un percentil 25, es consideraria que no està afecte d'un fracàs del creixement postnatal, però ha caigut varis percentils de pes. En aquest sentit també, un nadó que va néixer en un percentil 7 i arriba a les 36 setmanes d'edat postmenstrual en el mateix percentil, es consideraria afecte d'una fracàs de creixement postnatal sense presentar caiguda de percentil de pes. Semblaria, llavors, més apropiat definir fracàs de creixement postnatal com caiguda de la puntuació Z des del naixement fins al punt temporal escollit respecte a la gràfica de creixement que s'utilitzi de referència (202). En aquest cas és molt important determinar:

1. A partir de quina diferència es considera un creixement restringit
2. Entre quins dos punts temporals calculem la diferència

L'Acadèmia Americana de Nutrició i Dietètica ha proposat denominar-ho com a "malnutrició neonatal postnatal" i classificar-ho en (204):

1. Malnutrició lleu: diferència de puntuació Z entre 0,8-1,2
2. Malnutrició moderada: diferència de puntuació Z entre 1,2-2
3. Malnutrició greu: diferència de puntuació Z > 2

Respecte als punts temporals, la majoria d'articles parteixen del pes del naixement però alguns autors postulen que el més adequat seria calcular-lo un cop finalitzada la pèrdua fisiològica de pes (205,206).

Per determinar la incidència de fracàs de creixement postnatal en prematurs menors de 1.500 grams al néixer específicament a Espanya, Ávila-Álvarez *et al.* van fer un estudi observacional longitudinal retrospectiu amb 163 nadons i van descriure una incidència de pes menor al percentil 10 a l'alta de 59,2% i una caiguda mitjana de puntuació Z de pes de $0,85 \pm 0,79$ i de longitud de $1,09 \pm 0,65$ (203).

Cal tenir en compte també que limitar-se només al pes és imprecís ja que tant l'evolució de la longitud com l'evolució del perímetre cranial són igualment importants. En la població infantil i adulta, l'índex de massa corporal o la composició corporal són les eines antropomètriques de referència, però donat que no existeixen estàndards de lectura per a prematurs, sembla que l'ús combinat de pes, longitud i perímetre cranial proporciona una valoració raonable del creixement, tot i que no aporten informació exacte sobre la composició corporal ni el desenvolupament cerebral (181).

Les taxes més altes de fracàs de creixement postnatal són al voltant de la setmana 37 d'edat postmenstrual; després d'aquest moment, els nounats prematurs solen experimentar certa recuperació del creixement en comparació amb els seus equivalents a terme (207). Donat que la identificació d'aquells nadons realment afectes d'un fracàs de creixement postnatal serveix per optimitzar el seu suport nutricional, és important intentar ser el més acurats possibles i no infra/sobre diagnosticar-lo (189).

4.3. VARIABILITAT EN LA COMPOSICIÓ DE MACRONUTRIENTS EN LA LLET MATERNA I AFECTACIÓ DEL CREIXEMENT DEL NOUNAT MOLT PREMATUR

El maneig dels requeriments proteics i energètics dels nadons molt prematurs és essencial per optimitzar el seu creixement i la seva evolució clínica postnatal (177). Un cop el seu suport nutricional és completament enteral, la ingesta proteica i energètica depèn bàsicament de la llet materna. Donada la variabilitat en la concentració de macronutrients de la llet materna, és possible que hi hagi pacients que no arriben als requeriments estàndards i el seu creixement es vegi ressentit (197). Una ràtio 30-40 kcal per gram de proteïna administrada semblaria maximitzar la síntesis proteica (171). Tot i això, els estudis que exploren la influència de la variabilitat en la concentració de macronutrients de la llet materna en el creixement del nounat molt prematur són escassos i valoren diferents mesures antropomètriques, en diferents punts temporals i mesclen diferents règims nutricionals (129,208–210). La recent disponibilitat d'analitzadors de llet humana al peu d'incubadora ha permès profunditzar el coneixement en aquesta àrea (208).

Lin *et al.* van descriure l'any 2020 una correlació positiva entre ingesta proteica diària i velocitat de creixement (coeficient de Pearson 0,47, $p < 0,001$) i van definir un model pel què cada g/kg/dia d'ingesta enteral proteica addicional representava una augment en la velocitat de creixement de pes de 3,63 g/kg/dia. No van descriure correlacions amb altres macronutrients (hidrats de carboni, greix). Els autors postulen que una de les principals causes de la ingesta insuficient de proteïnes per part d'alguns pacients és la variabilitat en la concentració de macronutrients de la llet materna, i recomana l'ús periòdic d'un analitzador de llet per proporcionar informació útil i guiar la nutrició enteral (209).

En l'estudi de Belfort *et al.* de l'any 2020, una major ingesta proteica enteral s'associava a una major longitud (0,99 puntuació Z de longitud per cada g/kg/dia de proteïna, IC 95% 0,10 - 1,87), i una major ingesta lipídica i energètica enteral s'associava a un major pes (0,62 puntuació Z de pes per cada g/kg/dia de greix, IC 95% 0,30 - 0,94; 0,62 puntuació Z de pes per 10 kcal/kg/dia d'energia, IC 95% 0,22 - 1,02) a

l'edat a terme. Els seus resultats suggereixen que les diferències d'ingesta proteica i energètica entre els nadons es deuen principalment al contingut de macronutrients de la llet, més que al volum que n'ingereixen (208).

En conjunt, aquests dos treballs apunten que les diferències en la ingesta de macronutrients de la llet materna són clínicament importants, fins i tot en un entorn en què s'utilitzen guies clíniques de nutrició i fortificació estàndard de forma rutinària.

Asbury *et al.* l'any 2018 van explorar les associacions existents entre diferents morbiditats, nutrició i creixement. La ingesta diària de proteïnes en g/kg/dia (tant parenteral com enteral) s'associà amb un augment de pes durant tot el curs hospitalari i amb un augment de longitud i perímetre cranial durant el primer mes. Les ingestes diàries de lípids, hidrats de carboni en g/kg/dia i energia en kcal/kg/dia es van associar amb un augment de pes durant tot el curs hospitalari, i de longitud i perímetre cranial durant la primera setmana (210).

5. IMPORTÀNCIA DE LA NUTRICIÓ I EL CORRECTE CREIXEMENT DEL NOUNAT MOLT PREMATUR EN LES COMORBIDITATS I EL NEURODESENVOLUPAMENT

La nutrició que rep un nounat molt prematur durant la seva estada hospitalària influeix en la seva evolució a curt i llarg termini, tant a nivell de creixement (com hem comentat prèviament) com a nivell de comorbiditats pròpies de la prematuritat (211). Sabem que, després del període inicial de nutrició parenteral, la millor font nutricional és la llet humana, especialment de la pròpia mare. L'evidència disponible suggereix que la llet humana és superior a la llet de fórmula en l'alimentació dels nounats prematurs en quant a disminució de la mortalitat global (212) i en les següents comorbiditats:

- Displàsia broncopulmonar (41)
- Enterocolitis necrosant (40,41,162,213,214)
- Sèpsia nosocomial (38,41)
- Retinopatia de la prematuritat (39,41)
- Neurodesenvolupament ulterior (42,215)

Pocs estudis relacionen la composició en macronutrients de la llet materna amb el risc de comorbiditats en els nounats molt prematurs. És difícil discernir si una aportació insuficient d'un macronutrient es relaciona amb l'aparició o l'empitjorament de complicacions o si l'adequació del suport nutricional en el pacient prematur implica una millor evolució global (216,217).

Diferents estudis han treballat amb la hipòtesi que, a part del paper clau que tenen els oligosacàrids de cadena curta, tant la quantitat com la qualitat de greix que ingereix un nadó, tant a terme com preterme, pot modificar la seva microbiota intestinal (218,219). Hi ha un interès creixent en estudiar la relació entre el microbioma intestinal i la enterocolitis necrosant (220,221). Així, es podria suposar que la ingesta

lipídica, la disbiosis intestinal i la enterocolitis necrosant poden estar relacionades entre elles (222), però encara no hi ha evidència suficient.

L'associació entre nutrició, creixement i retinopatia de la prematuritat és més coneguda (14). Sembla que una ingesta insuficient de macronutrients i sobretot d'energia durant les primeres setmanes de vida augmentaria el risc de retinopatia (217,223), no només pel seu efecte perjudicial sobre el creixement, sinó que també es postula que aquesta ingesta nutricional insuficient podria conduir a una disminució de l'IGF-1 i/o d'altres factors angiogènics o un subministrament deficient de nutrients per als vasos. Sjöström *et al.* van presentar un model pel que un augment de 10 kcal/kg/dia durant les primeres 4 setmanes de vida s'associava amb una disminució del 24% del risc de desenvolupar una retinopatia de la prematuritat greu (223).

L'associació entre nutrició, creixement i displàsia broncopulmonar també és una àrea més estudiada. Un subministrament calòric i proteic insuficient desencadena un estat catabòlic que pot conduir a un desenvolupament alveolar i una producció de surfactant inadequats, a la fatiga del diafragma i a una major susceptibilitat davant d'infeccions nosocomials (216,224,225). És possible que els pacients afectes de displàsia broncopulmonar requereixin una ingesta energètica entre un 20 i un 30% major (226) però falta evidència al respecte (224). El paper dels lípids és controvertit però també podria ser important, tant en quantitat com en perfil d'àcids grassos essencials, ja que augmentarien la ingesta calòrica i limitarien la conversió de carbohidrats a lípids, disminuint la producció de CO₂ (227).

Els nadons prematurs neixen en un moment de desenvolupament cerebral ràpid i complex (228). Varis d'estudis coincideixen en què existeix una relació positiva entre la ingesta precoç (primeres setmanes) acumulada de greixos/energia i el creixement cerebral i el desenvolupament psicomotor ulterior. Aquesta relació no és tan potent amb la ingesta proteica acumulada (229–231). Confirmant la importància a llarg termini de l'alimentació enteral precoç, Isaacs *et al.* van descriure que els nadons prematurs alimentats amb una dieta rica en nutrients presentaven puntuacions significativament més altes de coeficient intel·lectual a l'adolescència (232).

Revisió Borràs-Novell *et al.* 2020 titulada *Infrared analyzers for the measurement of breastmilk macronutrient content in the clinical setting.*



Expert Review of Molecular Diagnostics



ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/iero20>

Infrared analyzers for the measurement of breastmilk macronutrient content in the clinical setting

Cristina Borràs-Novell , Ana Herranz Barbero , Victoria Aldecoa-Bilbao , Georgina Feixas Orellana , Carla Balcells Esponera , Erika Sánchez Ortiz , Oscar García-Algar & Isabel Iglesias Platas

To cite this article: Cristina Borràs-Novell , Ana Herranz Barbero , Victoria Aldecoa-Bilbao , Georgina Feixas Orellana , Carla Balcells Esponera , Erika Sánchez Ortiz , Oscar García-Algar & Isabel Iglesias Platas (2020) Infrared analyzers for the measurement of breastmilk macronutrient content in the clinical setting, Expert Review of Molecular Diagnostics, 20:9, 867-887, DOI: [10.1080/14737159.2020.1816465](https://doi.org/10.1080/14737159.2020.1816465)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14737159.2020.1816465>



Published online: 22 Sep 2020.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 19




View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=iero20>

Infrared analyzers for the measurement of breastmilk macronutrient content in the clinical setting

Cristina Borràs-Novell ^{a,*}, Ana Herranz Barbero^{a,*}, Victoria Aldecoa-Bilbao^a, Georgina Feixas Orellana^a, Carla Balcells Esponera^a, Erika Sánchez Ortiz^a, Oscar García-Algar^a and Isabel Iglesias Platas^b

^aNeonatology Department, BCNatal – Centre De Medicina Maternofetal I Neonatologia De Barcelona, Hospital Clínic, Universitat De Barcelona, Barcelona, Spain; ^bNeonatology Department, BCNatal – Centre De Medicina Maternofetal I Neonatologia De Barcelona, Hospital Sant Joan De Déu, Universitat De Barcelona, Barcelona, Spain

ABSTRACT

Introduction: There is growing interest in the possibility of measuring the macronutrient content of human milk. Several studies that intend to validate commercially available human milk analyzers have been published with inconsistent results. This review will focus on currently available, verified methodologies for analyzing macronutrients in human milk.

Areas covered: A literature search was conducted in the PubMed database. Five milk analyzers were chosen to be included in this review: MIRIS (Uppsala, Sweden) (seven articles found), Calais (Cleveland, United States) (four articles), SpectraStar (Brookfield, United States) (four articles), MilkoScan (Hillerdo, Denmark) (two articles), and Delta LactoScope (Stockholm, Sweden) (one article). The following information was extracted from published manuscripts: measuring device, sample preparation, purpose of the study, type of macronutrients studied, results, and conclusions.

Expert opinion: Infrared spectroscopy can be an accurate and reliable technology for assessing the macronutrient content of human milk, specifically crude protein, and total fat. However, an optimal handling of samples, the development of standardized quality-control protocols, and an improvement in calibration procedures are required before the full implementation of infrared technology in neonatal units.

ARTICLE HISTORY

Received 21 May 2019
Accepted 26 August 2020

KEYWORDS

Human milk macronutrients;
human milk analyzer;
infrared spectroscopy; MIRIS;
Calais; Spectrastar;
MilkoScan; Delta LactoScope

1. Introduction



Human milk is a complex and highly variable fluid with a primordial role in infant nutrition and development. It provides all nutrients required for an infant for the first six months of postnatal growth [1]. While human milk is sufficient to ensure growth of term infants, it may be inadequate to meet the needs of preterm infants regarding protein, energy, and other components [2,3]. At the time of discharge, most very premature infants are substantially growth-restricted in comparison to their term-born peers [4]. In the last decades, human milk banks have been developed with the objective of providing human milk to neonates whose mothers are not able to breastfeed. When compared to formula feeding, donor human milk reduces the incidence and severity of several diseases, particularly necrotizing enterocolitis [5] but due to lower nutritional density when compared to formula and own mother's milk, it might adversely impact growth outcomes [6].

To achieve the high nutritional demands of preterm newborns, fortifiers are added to breast milk in order to increase nutritional density [7]. Currently, fortification is mostly carried out according to manufacturers' instructions, based on an assumed macronutrient composition of human milk [8]; with the inherent macronutrient variability, particularly in terms of fat and protein, this can result in either over- or under-fortification [3,8].

Because of the increasing role of human milk banks [5] and the routine use of fortification, it is becoming essential to be able to determine the nutritional content of the human milk that preterm infants are being fed [9]. This has led to an increasing demand for reliable methods to quantify macronutrients in a large number of milk samples.

However, the study of milk composition is difficult due to the intricacy of the macromolecular organization [10]. Milk is a lipid emulsion organized in fat globules surrounded by a membrane of phospholipids and mucins, and also contains casein micelles, different soluble proteins (including functional ones as immunoglobulins, lactoferrin, or lysozyme), and carbohydrates, including lactose (the most abundant) and complex oligosaccharides, particularly represented in the human species and genetically determined [10]. Further complication for drawing clinically meaningful conclusions arises from the fact that human milk shows a large variation in macronutrient content depending on mother's physiology, length of gestation and across lactation (colostrum, transitional milk, mature milk), during a single feeding (foremilk and hindmilk) and throughout the day [7,11].

Although classical laboratory methods are the gold standard to assess human milk composition, they are time-consuming, expensive, and involve high starting volumes. Moreover, they require a wet lab and occasionally the use of

CONTACT Cristina Borràs-Novell  cborrasn@clinic.cat  Neonatologist BCNatal – Centre De Medicina Maternofetal I Neonatologia De Barcelona Hospital Clínic, Universitat De Barcelona, Barcelona 08028, Spain

*Contributors: Both authors contributed equally to the design, undertaking, writing and editing of this report.

© 2020 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

hazardous chemicals, so that they are not available for bedside testing. Human milk analyzers use infrared spectroscopy to determine the content of macronutrients (carbohydrates, fat, and protein) from which energy and total solids can be calculated [12]. These devices use smaller milk samples, can be used within the neonatal unit and are able to provide results almost in real time, being particularly useful when using donor breast milk or for individualized fortification [11]. Most infrared analyzers are derived from the dairy industry and have been adapted for human milk, which explains the lack of consensus on how to use them appropriately [13].

Several studies that compare methodologies and validate commercially available human milk analyzers have been published with inconsistent results regarding performance, accuracy, and reproducibility [14,15].

The main purpose of this review is to summarize the evidence of interest to milk banks and neonatal clinicians regarding the accuracy of infrared analyzers for measuring macronutrients in human milk when compared to reference methods, including how this might be influenced by sample handling, storage, and preparation.

2. Methodology

A literature search was conducted using the PubMed database, including articles from January 2009 to March 2019. The following keywords were used: 'human milk analyzer' OR 'MIRIS' OR 'SpectraStar' OR 'Calais' OR 'MilkoScan' OR 'LactoScope' OR 'breast milk macronutrients' OR 'breast milk composition' OR 'donor milk macronutrients' OR 'donor milk composition' OR 'mid-infrared spectroscopy' OR 'near-infrared-reflectance-analysis'. Article titles and abstracts were screened for full-text review. Only studies in English and Spanish, and only those referring to human milk, were included. To be included in the review, manuscripts should contain the following information: measuring device, sample preparation, purpose of the study, type of macronutrients studied, results, and conclusions. The following milk analyzers were selected to be included in this review: MIRIS (Uppsala, Sweden) (seven articles found), Calais (Cleveland, United States) (four articles), SpectraStar (Brookfield, United States) (four articles), MilkoScan (Hillerød, Denmark) (two articles), and Delta LactoScope (Stockholm, Sweden) (one article). Reviewer C. Borràs reviewed full-text articles regarding Classic Laboratory Methods; V. Aldecoa reviewed those regarding Human Milk Analyzers; G. Feixas reviewed those involving samples preparation; and A. Herranz, and C. Balcells reviewed those comparing macronutrients analysis. In case of discrepancies between A. Herranz and C. Balcells, discussion and agreement were selected as a solving method. Figure 1 Review flow chart.

3. Classic laboratory methods for the analysis of milk macronutrient content

3.1. Proteins

The internationally approved reference method for measuring protein content in dairy is the Kjeldahl method [16]. We have also reviewed the modified Bradford method, and elemental analysis because they have been used as wet laboratory methods for the study of human milk [3,5,8,11,17,18].

The Kjeldahl method is a wet oxidation to determine total nitrogen, which can then be used to calculate total protein (crude protein) by a conversion factor of 6.38 [19] (volume needed 5–10 ml) [14,20]. This approach does not take into consideration the presence of non-protein nitrogen (urea, amino acids like taurine and glutamine, nucleotides), which accounts for 20–25% of total nitrogen in human milk, so it will overestimate protein content. A corrected Kjeldahl measures the total nitrogen first, and then nonprotein nitrogen after precipitating protein by trichloroacetic acid. Total nitrogen minus nonprotein nitrogen equals true protein [21], after applying a conversion factor of 6.25 in this case, based on the fact that proteins contain approximately 16% of nitrogen [19]. The Bradford method is a spectrophotometric technique that involves the binding of Coomassie Brilliant Blue G-250. It measures protein content or 'true protein', rather than total nitrogen. Upon protein binding, the dye acquires a blue color and its absorbance maximum shifts from 465 to 595 nm, and absorbance at this wavelength is read by the device. For quantification, the absorbance is compared to a standard calibration curve previously constructed from dilutions of a protein solution of known concentration. This procedure is completed in approximately 2 min and requires 1 ml of starting sample [5,22]. It is less susceptible than other assays to interference by compounds such as salts or reducing substances like some carbohydrates, but it is affected by the presence of detergents. Also, the degree of protein-to-protein variation is high, which means the result will be influenced by the selection of standard, most frequently bovine serum albumin [5]. Some authors have proposed to use dilutions of mature human milk or milk proteins as a standard, after previously determining their concentration by another reference method like Kjeldahl [23,24]. Elemental analysis is a technique that uses pure oxygen at a high temperature to achieve complete oxidation of a sample, with ulterior measurement of the combustion products (mainly carbon, hydrogen, nitrogen, and sulfur for organic compounds) present in the sample (volume needed 0.5 ml) [17,25,26,27]. To determine the total protein content in milk, the protein nitrogen content is multiplied by a conversion factor.

3.2. Carbohydrate

The reference method for assessing carbohydrate content of milk in the dairy industry is liquid chromatography (High-Performance Liquid Chromatography- HPLC-, although Ultra Pressure Liquid Chromatography -UPLC- and high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection -HPAEC-PAD- have also been used). Other laboratory methods that have been applied to human milk are lactose IK-Chloramine-T reaction and automated orcinol.

Liquid chromatography is used to separate, identify, and quantify each component of a mixture based on their mass (HPLC, UPLC) or electric charge (HPAEC-PAD) (volume needed 0.1 ml) [25,28,29,30]. The mixture is dissolved in a fluid called the mobile phase, which carries it through a structure holding another material called the stationary phase. The various constituents of the mixture, in this case lactose, travel at different speeds, causing them to separate and this is applied

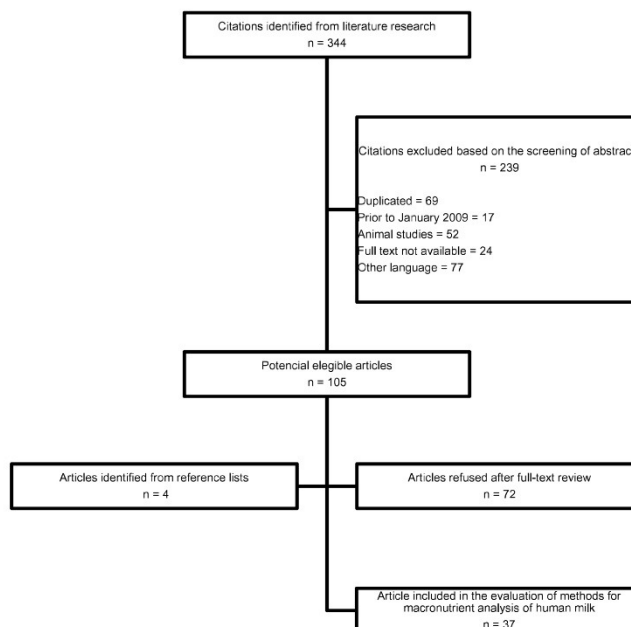


Figure 1. Review flow chart.

to their identification. It can discriminate between lactose and the oligosaccharides that are abundantly present in human milk [31]. In the lactose IK-Chloramine-T reaction, lactose is quantified according to its reducing properties, which are used to produce iodine from 0.04 M thiosulfate [5]. This procedure is completed in approximately 120 min and requires 10 ml [32]. The automated orcinol method analyzes the degradation products obtained during enzymatic hydrolysis of sugars in deproteinized samples. These two last methods will react with both lactose and oligosaccharides [3,5].

3.3. Fat

The fat content of animal milk samples is measured by the Roesse-Gottlieb and the Mojonnier methods. Human milk fat has also been assessed using the Folch and the Bligh and Dyer methods, the creatocrit, and the Gerber methods.

The Roesse-Gottlieb and Mojonnier methods are based on the extraction of fat with a mixture of ethylic ether in the presence of ammonia and ethanol (volume needed 300 µl and 1 ml, respectively) [17,25,27,28,33]. The Folch and Bligh and Dyer methods use a mixture of chloroform, methanol, and water for the extraction and separation of lipids from biological tissues [4,34]. Measuring the creatocrit involves placing a few drops of milk in a capillary tube, and centrifuging it so that the lipid separates from the aqueous part of the milk [35].

The creatocrit is then the percentage of the column's height occupied by fat. This procedure is completed in approximately 15–20 min and requires 75 µl [35]. In the Gerber method, fat is separated from proteins by adding sulfuric acid, with the help of amyl alcohol and centrifugation [36]. This procedure is completed in approximately 30 min and requires 10 ml [36].

3.4. Total energy

Bomb calorimetry is the gold standard for measuring the total energy content of milk, but a large volume of sample is usually required for combustion [1]. However, the energy content of breast milk reported in the different studies has been usually estimated from the concentrations of macronutrients, rather than directly measured.

4. Human milk analyzers

Milk analyzers are based on infrared spectroscopic technology that works on the principle of absorbance at wavelengths that are most sensitive to specific chemical bonds in protein (amide), fat (carbonyl and carbon-hydrogen) and carbohydrate (hydroxyl) [27]. The sample is exposed to infrared radiation [37]; the infrared radiation is generally divided into three regions; near (0.7–2.5 µm), mid (2.5–25 µm), and far (25–1000 µm) infrared, named for their relation to the visible

spectrum. The amount of energy absorbed at the macronutrients specific wavelengths is proportional to the concentration of the macronutrients (Beer-Lambert Law) [31]. The main characteristics of the five human milk analyzer models included in this review are summarized in Table 1 [27,38–45].

4.1. MIRIS human milk analyzer (Uppsala, Sweden)

The MIRIS Human Milk Analyzer from MIRIS Solutions (Uppsala, Sweden) is based on mid-infrared spectroscopic technology. The instrument contains three filters to select the wavelengths that correspond to each macronutrient, and another filter as a reference filter [9,42].

It can measure total fat and crude protein, and it can estimate true protein, carbohydrates, and energy. Crude protein, sometimes called total protein, is calculated multiplying nitrogen by 6.38, while true protein is reported assuming a standard nonprotein nitrogen content of 20% [7,13]. The carbohydrate reading includes lactose and oligosaccharides [37], and its value is calculated by total solids minus lipids, proteins, and minerals [42]. The MIRIS analyzer is specifically developed for human milk [13] and is calibrated by the manufacturer to human milk values on a set of human milk samples [7]. The composition of the factory calibrants was determined by the Roese-Gottlieb method (fat), by the Kjeldahl method (total nitrogen multiplied by 6.38; crude protein), by HPLC (lactose) (ISO 22,662/IDF 128:2007), and by oven drying to constant weight (total solids) (IDF 021B:1987). A commercial kit is available for calibration since 2018 to improve accuracy and quality control [46]. Gross energy values are calculated using the conversion factors of 9.25, 4.4, and 4.0 kcal per 100 ml for fat, protein, and lactose respectively (included in the factory settings of the HMA) [8]. True and crude protein, fat, and carbohydrates are measured in grams per 100 ml of milk, while energy values are measured in kcals per 100 ml. All components can be determined simultaneously, it works using 1–3 ml of milk and the reading takes less than a minute. The pre-analytical phase needs to be carefully considered. Frozen breast milk should be thawed at room temperature (20–30°C) or left overnight at 4°C. To achieve optimal homogenization, milk should be preheated to 40°C and homogenized at 1.5 s/ml using the MIRIS Ultrasonic

Processor. Thawed or fresh milk must be maintained heated in a water bath at 40°C while doing the analysis [35]. Two quality control procedures are required: the check procedure with zero-level adjustment, and a daily validation of the internal calibration using the MIRIS Calibration Control Kit. The check procedure must be performed at start-up and after cleaning the instrument every set of 10 analyzes [42]. Its advantages are its small size and portability, the availability of calibration standards, and the use of small volumes of milk [38,42].

4.2. Calais (Cleveland, United States)

Calais Human Milk Analyzer from Metron Instruments (Cleveland, United States) has been adapted from the dairy industry. Is a filtered based spectroscope that allows quantitation of fat, protein, and carbohydrates [31]. Calculation of total protein from total nitrogen is performed by multiplying by a factor of 6.25, and true protein concentrations are given with an assumption of a 24% of nonprotein nitrogen [7]. The energy is calculated from these values at 9 kcal/g for fat, 4 kcal/g for protein, and 4 kcal/g for lactose [7]. The composition of the factory calibrants was determined on human milk samples using the Mojonnier method for fat analysis, Kjeldahl for protein, and high-pressure liquid chromatography (HPLC) for lactose. It requires a milk aliquot of 8–15 ml and it has an internal 'ball and seat' high-pressure (3500 psi) mechanism that homogenizes the sample before analysis. Its main advantages are the calibration through a human milk matrix, the provision of an auto-rinse cycle for easy cleaning [38,40], the availability of a control solution to check instrument performance, and its speed [40].

4.3. SpectraStar (Brookfield, United States)

The SpectraStar Milk Analyzer from Unity Scientific (Brookfield, United States) is based on near-infrared spectroscopy. As with mid-infrared, near-infrared light affects the C-H, N-H, and O-H molecular bonds from the components of interest and the measurements allow for the determination of fat, protein, and carbohydrate content. The calibration algorithm can be generated to enable the NIR milk analyzer to perform nutrient analysis of

Table 1. Overview of the main characteristics of the five human milk analyzers selected for the present review.

	Technology	Sample volume	Sonication	Analysis time	Availability of calibration standards
MIRIS Human Milk Analyzer	Filtered mid-infrared spectroscopy	1–3 ml	Not integrated. The MIRIS Ultrasonic Processor can be purchased separately	60 seconds	two quality control procedures: – the check procedure with zero-level adjustment – validation of the internal calibration with MIRIS Calibration Control Kit
Calais	Mid-Infrared spectroscopy	8–15 ml	Integrated	60 seconds	control solution is available to check instrument performance
SpectroStar	Near-infrared spectroscopy	1 ml		10–60 seconds	certified calibration IDF calibration development and support for a year
MilkoScan	Fourier-transformed full-spectra mid-infrared spectroscopy	10 ml	Integrated	30 seconds	certified calibration ISO possible to transfer calibrations between instruments
Delta LactoScope	Fourier-transformed full-spectra mid-infrared spectroscopy	10 ml		45 seconds	certified calibration AOAC

human milk [47]. Its key features are: small sample required (1 ml), one-button operation, results in 30 seconds, automatic calculation reports for nutritional supplementation, and universal calibration [38,39,43].

4.4. MilkoScan (Hillerdo, Denmark)

MilkoScan FT2 from MilkoScan HMA (Hillerdo, Denmark) is a Fourier-transformed full-spectra mid-infrared spectrometer that simultaneously collects high-spectral-resolution data over a wide spectral range. The instrument includes calibrations for fat, protein, lactose, total solids, non-fatty solids, freezing point depression, total acidity, density, free fatty acids, citric acids, urea, casein, glucose, and galactose [44]. It has been calibrated for human milk measurements using the Roesse-Gottlieb method for fat, Kjeldahl for protein, HPCL for lactose, and oven method for total solids. It requires 11 ml of milk and provides results in 30 seconds [38,44,48]. An advantage is that MilkoScan has a system that makes it possible to transfer calibrations between instruments [44].

4.5. Delta LactoScope (Stockholm, Sweden)

LactoScope FT from Perten Instruments (Stockholm, Sweden) is a Fourier-transformed full-spectra mid-infrared instrument and uses approved methodology for the analysis of fat, protein, lactose, total solids, and non-fatty solids in milk and milk derivatives. It has been calibrated for human milk measurements using the Roesse-Gottlieb method to determine fat, the Kjeldahl method for protein, HPCL for lactose, and oven method for total solids. It also requires 10 ml per sample and provides results in 45 seconds [41,45,49]. It is designed to analyze milk samples with up to 40% of fat.

SpectraStar, MilkoScan, and Delta LactoScope Milk Analyzers have a certified calibration (IDF, ISO, and AOAC) for the analysis of fat, protein, lactose, and total solids in milk [39,41,50].

5. Evaluation of methods for macronutrient analysis of human milk in the literature

5.1. Considerations regarding sample preparation

Due to inherent variability in milk composition and the complex macronutrient structural organization [10], standardization of the pre-analytical phase is key for interpretation of published results. Despite this fact, there is no universal protocol that describes an optimal circuit to obtain and prepare milk samples before analysis [1]. Work methodologies depend largely on the aim, whether the purpose is for research or for daily clinical practice.

We selected seventeen studies that describe pooling, extraction and storage of human milk and the use of sonication, which are shown in Table 2 [3,5,12,15,37,51–62]. Table 3 provides a summarized overview about the methodology used by investigators in sample preparation [3,5,12,37,51–55,57–62].

Different researchers select different times of the day for milk collection. Most of them use morning hours likely because there is higher milk production [12,52,55,58,61]. Others use pools

collected over 24 hours to account for circadian biorhythms [37,51,62]; pooling is usually built up from milk extracted after a full expression of the breast every 3 hours.

Regarding methods of expression, the most widely used is single or double electric pumping of either one or both breasts at the same time [5,12,37,51,57], and is usually combined with manual expression [7,53,54,59]. Electric pump expression while feeding the newborn from the other breast [60], hand expression after a feed [53], or pooled donor milk from a biobank [3] are other examples of milk collection. There is some evidence suggesting that all these different conditions may impact milk macronutrient composition and can affect milk synthesis during the subsequent feed [63,64].

Storage is another source of potential variability. Most milk samples are frozen [3,5,58] or ultrafrozen at -80°C [52,55,60] immediately or after a period at -20°C [57]. Some authors allowed fresh milk to be refrigerated for a period of 24 hours before freezing [5,59]. Five of the seventeen articles used fresh milk samples, usually stored in the refrigerator [37,51,53,54,61], and this is the usual situation within the neonatal unit.

The amount of human milk used for analysis is also a critical point, especially when dealing with limited production and with the feeding needs in the care of preterm infants, and will mostly be determined by the requirements of the measuring device [37,54,59].

Before analysis, frozen milk needs to be slowly heated to room temperature and then homogenized, whether with ultrasonic vibrators [3,5,11,51,60] or by vortexing [62] to avoid agglutination of fats. In spite of using frozen samples, some authors do not specify any pretreatment of samples before performing measurements [52,55,57,58]. Fresh and refrigerated milk can be directly analyzed, after mixing well by manually shaking the tubes [37,53,54,61], although some authors use homogenization by an ultrasonic vibrator [51]. Fusch et al. have shown a major impact of homogenization protocols and time from preparation to reading in the measured results from frozen milk. No similar studies have been performed on fresh milk [15]. In the case of MIRIS HMA, and since the calibration control kit is only applicable to the validation of the internal calibration for homogenized milk, it is now recommended that all samples are homogenized before measurements, irrespective of previous mode of storage.

Following manufacturer's instructions, the majority of researchers warmed the samples up to 40°C or 50°C [3] in water baths, to optimize solubility of fats. Others did not specify if they had performed any heat treatment [57,58,60,61,65].

In summary, many preanalytical conditions can affect the final results. It is recommended to follow manufacturer's instructions and establish standard operating procedures within each site to minimize inter-operator variability.

5.2. Comparison of macronutrient measurement between analyzers and reference methods

The results of reviewed reports that compare macronutrient quantification between human milk analyzers and classical methods are summarized in Table 4. Accuracy (how close a measured value is to the true value), precision (how close the measured values are to each other under unchanged conditions), reproducibility (agreement between

Table 2. Overview of studies that describe pooling, extraction, storage, and sonication of human milk.

Author Year	Purpose of the study	Pooling	Day of lactation	n	Extraction	Storage	Sonication/ Amount of milk
Maly et al. [58]	Clinical Research	During the day shift from 07:00 to 16:00 h	2 samples on 4–7 day post-partum 2 samples per week from 2nd week to 9th week	1919	Manual expression and electric pump	Complete emptying of breast Immediately analyzed or frozen –18°C	Not specified 2–3 ml aliquots
Hellmut et al. [59]	Clinical Research	No specifications were given to the mothers	Once a month (1st and 4th post-partum)	392	Manual expression or electric pump	Frozen at –20°C at home, transferred on ice and stored at –80°C Fresh milk pooled	Sonicated and heated to 40°C 1–2 ml aliquot for fat analysis Sample diluted 1:3 with water
Zhu et al. [12]	Validation of milk analyzer	From 9 to 11 h	Healthy volunteers <11 month post-partum	37	One breast electric pump	Frozen at –80°C	Not sonicated and heated 40°C 2.5 ml for analysis
De Luca et al. [60]	Clinical Research	From 9 to 11 h	1st month post-partum	100	Electric pump while breastfeeding	Frozen at –80°C	Homogenized for 90s using a Bioruptor sonicator 2.5 ml aliquot
Dritskou et al. [37]	Clinical Research	24 h pooled milk	3rd, 7th and 30th day post-partum	Samples: 630 raw milk, 95 donor milk, 305 pasteurized milk 30	Both breasts with electric pump each 3 hours with complete emptying Electric pump	Refrigerated raw milk	Manually homogenized 5 ml aliquot
Say et al. [61]	Clinical Research	Transitional milk samples from 12:00 to 15:00 h	Transitional milk 7th day post-partum	83	Double electric breast pump 6–8 times/day	Fresh milk collected in Eppendorf tubes	4 ml aliquots in 2 ml each Analyzed twice
Kreissl et al. [62]	Clinical Research	24 h pooled milk	5–131 day	83	Double electric breast pump 6–8 times/day	Frozen	Vortexed to homogenize Warmed to 20–40°C 3 ml aliquot
Andersen et al. [51]	Clinical Research	24 h pooled domestic milk two consecutive days	Second week after birth	120	Electric pump	3 ml in fridge, 2 ml in freezer	Ultrasonic vibrator VCX130 (Sonics & Material, Connecticut) Fresh milk heated to 40°C (1.5 seconds per 1 ml of sample) Measured in duplicate (3 ml per measurement)
Billard et al. [3]	Validation of milk analyzer	30–50 ml from 3 to 5 donors from bio bank	Not specified	5	Taken from bio bank	30–50 ml frozen at –20°C	Homogenized 15 s and sonicated 30 s/ml, 2 times 30 seconds on followed by 15 seconds off and again 15 seconds on ultrasonic vibrator (VCX500; Sonics Materials, Connecticut) 10 min at 50°C on hot water bath 2.5 ml aliquot
Jans et al. [52]	Clinical Research	From 9 to 11 h	4 days after delivery	16	Infants fed 3 minutes before collection of 5 ml manually or with electric pump	Frozen at –80°C	Samples analyzed 24 h before sampling with a food record
Mangel et al. [56]	Clinical Research	48–72 h after birth few minutes of expression	48–72 h after birth	21	Manual and electric pump expression for a few minutes	Frozen at –20°C for 48 h, after at –80°C until analysis	2 ml of fresh Milk Analyzed twice

(Continued)

Table 2. (Continued).

Author Year	Purpose of the study	Pooling	Day of lactation	n	Extraction	Storage	Sonication/ Amount of milk
Moran-Lev et al. [57]	Clinical Research	From 0600 to 0900 h and from 1800 to 2100 h	once a week from 1 st to 7 th week of lactation	266 samples from 32 mothers	Two breasts emptying with electric pump expression	Refrigerated at < 5°C for 24 h maximum. After, frozen at -20°C	Milk thawed and heated to 40°C (1.5 s per 1 ml) by an ultrasonic vibrator VCX130(Sonics & Material, Connecticut)
Dizdjar et al. [53]	Clinical Research	4 ml hand expression after infant feeding	2 nd day post-partum	204	Hand expression after feed	Fresh milk collected in Eppendorf tubes	Measured in duplicate (3 ml per measurement) 4 ml aliquots 2 ml analyzed twice
Hsu et al. [54]	Clinical Research	20 ml each time	Not described	80	Manual or pump expression	20 ml refrigerated	Manually homogenized Heated to 40°C in water bath 5 ml analyzed twice
Silvestre et al. [5]	Validation of milk analyzer	Whole pooling during 10-15 min	Milk donors delivered at term	39	Double electric breast pump with complete emptying of breasts	Frozen at -20°C	Homogenized 1.5 s/ml with Ultrasonic vibrator (VCX 130; Sonics &Material, Connecticut) Warm to 40°C 2 ml aliquot
Yang et al. [55]	Clinical Research	From 900 to 11:00 h	From 5 to 240 days post-partum	5-11 d: n = 86 12-30 d: n = 85 31-60 d: n = 88 61-120 d: n = 90 121-240 d: n = 87 120	One breast manually and electric pump expression	40 ml placed on freezer packs, stored at -80°C	2 ml aliquot thawed and warmed to 40°C
Fusch et al. [15]	Validation of milk analyzer	5 ml of each fore, middle, and hind milk during a single lactation 5 ml of daily 12-h pool	38 ± 36 days 27 ± 18 days	168		Frozen at -80°C	Homogenized for 3 × 10 s using an ultrasonic vibrator (VCX 130; Chemical Instruments AB; Sollentuna, Sweden)

Table 3. Overview of methodologies used by investigators in sample preparation.

Item evaluated	Option founded	Nº of articles
Time pooling	07:00–16:00 h	1
	09:00–11:00 h	3
	24 h pooled milk	3
	12:00–15:00 h	1
	48–72 h after bird	1
Expression	06:00–09:00 h/18:00–21:00 h	1
	Manually expression	1
	Electric pump expression	7
	Manual and electric expression	6
	Electric pump while breastfeeding	1
Storage	Taken from bio bank	1
	Frozen –18°C	1
	–20°C	3
	–80°C	3
	Refrigerator	2
	Fresh milk in Eppendorf tubes	2
	Fresh milk	1
	Frozen (not specified)	2
	Frozen at –20°C for 48 h	1
	Refrigerated for 24 h, after frozen –20°C	1
ml for analysis	2–3 ml	1
	1 ± 2 ml	1
	2.5 ml	3
	5 ml	2
	2 ml	4
Sample thawing	3 ml	2
	40°C	8
	50°C	1
Homogenization technique	Not specified	7
	Sonicator not specified	1
	Bioruptor sonicator	1
	Fresh milk Manually shaken	2
	Not sonicated	1
	Vortexed	1
	VCX130 (Sonics & Material, Connecticut, USA)	3
	VCX500 (Sonics & Material, Connecticut, USA)	1
Not specified	5	

measurements performed by different individuals in independent locations) and repeatability (variation in result of two experiments performed by the same operator under same conditions) have been collected for each analyzer if available.

5.2.1. MIRIS human milk analyzer

Protein measurements have been compared to the Bradford [3,5,8] and Kjeldahl [3,9,12,14] methods and to elemental analysis [11]. Most of the studies report a correlation coefficient (R^2) near or over 0.9 and a concentration difference of around 0.2 g/100 ml (or an error between 13% and 20%) when measuring milk samples [3,8,9,12,15]. Some researchers report that the difference increases with increasing concentration [8]. Two investigations, one using the Bradford method [5] and the other a combination of Kjeldahl, BCA, and amino acid analysis [14] found the MIRIS-HMA to be unreliable for the measurement of protein. Differences in conclusions might arise from the use of different protein standards (human milk protein [8] or bovine seroalbumin [3,5]) in colorimetric methods that are sensitive to protein-to-protein variation. More fundamentally, the conversion of measured nitrogen values into calculated protein implies multiplication by a constant factor that in reality depends on the particular composition of the specific protein. Also, human milk is rich in non-protein nitrogen, which for the purpose of calculation of ‘true protein’ is assumed to be 20% in the MIRIS HMA software, but the actual value will be variable from sample to sample.

Because correlation coefficients between methods are good, most authors suggest that accuracy could be improved by performing a recalibration [5,14]. This is supported by the results of Billard et al. [3], who reported differences in measurements smaller than 15% after recalibrating the MIRIS analyzer, based on coefficients obtained by regression of RM values from samples artificially produced by concentrating and re-mixing different milk components to span a wide range of concentrations. Giuffrida et al. suggest the use of the bicinchoninic acid (BCA) method for recalibration [14], but interference of different substances present in milk that can act as surfactants (like phospholipids) or have reducing capacity (like lactose) could be a cause for concern when using Bradford and BCA assays in milk [66].

Four studies reported inter-assay (reproducibility) and intra-assay (repeatability) variation coefficients lower than 7% for protein quantification with the MIRIS HMA [3,8,15,67].

Fat measurements with the MIRIS HMA have been compared to the Folch, Roesse-Gottlieb, Gerber, Monjonier, and Blich-Dyer methods [3,5,8,9,12,14,15]. Using the same method employed for factory calibration (Roesse-Gottlieb), as is the case in the two most recent studies [12,14] seems to improve agreement between HMA and RM: both described differences smaller than 15%, although one found that the analyzer over-estimated fat content [12], while the other reported the opposite [12,14]. Compared to the Mojonier [15] and to an esterified fatty acid (EFA) method, MIRIS HMA was also

Table 4. Reviewed studies that compare macronutrients determination between human milk analyzers and classical methods.

Macro nutrient	Author Year	Sample size, preparation and measurement conditions	Reference method (RM)	Results
Protein	Menjo et al. [9]	n = 31 Samples frozen at -20°C, thawed, warmed to 40°C. MIRIS calibration setting: unhomogenized milk.	Kjeldahl (nitrogen-to-protein conversion factor: 6.25)	RM = $0.89 \times$ MIRIS value + 0.06 g/100 ml (MIRIS overestimated protein content by approximately 10%, but acceptable accuracy). $r = 0.92$
	Casadio et al. [8]	n = 30 samples of pooled milk from 20 mothers (13 term/7 preterm). Sample processing: Group A: undiluted, Group B: diluted 2-fold, Group D: skimmed, Group C: concentrated (after removal of skimmed aliquot). Samples frozen, thawed, warmed to 40°C, homogenized MIRIS calibration setting: Homogenized milk. The HMA used had a modified calibration designed to measure diluted samples.	Modified Bradford. Protein standards prepared with human milk of known protein concentration (determined by Kjeldahl method)	Group A: MIRIS 1.5 ± 0.5 g/100 ml vs RM 1.2 ± 0.3 g/100 ml, mean difference: -0.2 ± 0.3 g/100 ml, $p < 0.001$. MIRIS slightly overestimated protein content, but acceptable accuracy. Difference was greatest in the concentrated samples. MIRIS intra-assay variation 4% (SD 0.05%).
	Silvestre et al. [5]	n = 39 Samples frozen at -20°C, thawed at room temperature, warmed to 40°C, and homogenized. MIRIS calibration setting: Homogenized milk.	Bradford. Protein standards prepared with bovine serumalbumin.	MIRIS: 0.59 ± 0.29 g/100 ml vs RM: 1.19 ± 0.27 g/100 ml, $p < 0.001$. Yielded a between-test precision 3.08%. $R^2 = 0.9872$
	Billard et al. [3]	Pools of milk from 3-5 donors (term and preterm) where used to produce artificially created calibration samples with a wide range of concentrations of protein, fat and lactose. A Quality Control sample was constructed by pooling 8 different HMs with a macronutrient content ranging between 20-80 th percentiles. Samples: heated, pooled, and homogenized, aliquoted and stored at -20°C, subsequently thawed and sonicated previous to analysis. MIRIS calibration setting: Homogenized milk. Artificially created calibration samples were used to calculate regression equations and to use the coefficients to adjust "slope" and "bias" of the MIRIS internal calibration.	Bradford for true protein. Protein standard prepared with bovine serumalbumin. RM for HMA "true protein" Kjeldahl for total nitrogen (conversion factor for protein 6.38). RM for HMA "crude protein"	True protein regression line: MIRIS = 0.9 RM + 0.23 ($R^2 = 0.98$). Calibration adjustment: α (slope) = 1.111 and β (bias) = -0.256. True protein: Repeatability 6.9%, Reproducibility 6.9%. Total (crude) protein regression line: MIRIS = 0.97 RM + 0.04 ($R^2 = 0.98$). Calibration adjustment ($\alpha = 1.033$ and $\beta = -0.040$). Crude protein: Repeatability 0.0%, Reproducibility 4.2%.
	Zhu et al. [12]	n = 99 Samples from 151 healthy mothers, more than 11 months after delivery of single gestations. Extraction 9-11 am, 30-50 ml. Fresh milk analyzed by MIRIS. Not homogenized. MIRIS calibration setting: unhomogenized.	Kjeldahl (nitrogen-to-protein conversion factor used: 6.25)	MIRIS: 1.0 ± 0.4 g/100 ml vs RM: 1.2 ± 0.3 g/100 ml, $p < 0.001$. $R^2 = 0.88$ ($p < 0.001$) MIRIS not accurate, but total difference between methods around 13%.
	Giuffrida et al. [14]	n = 6 milk samples for validation with RM. n = 150 from 50 healthy mothers of term newborns, collected at 30, 60 y 120 days after delivery.	Kjeldahl (nitrogen-to-protein conversion factor used: 6.25) BCA (bichromic acid) assay Amino acid analyzers Elemental analyzer	MIRIS: 0.68 ± 0.09 g/100 ml vs RM: 1.16 ± 0.01 g/100 ml, $p < 0.05$ Significantly different > 15%. MIRIS not accurate.
	Fusch et al. [11]	n = 1188 5 ml of each fore, middle, and hind milk during a single lactation. Samples were homogenized and frozen (-20°C measured with IR; -80°C measured with wet chemistry) for 14 months. Prior to analysis they were heated and homogenized. MIRIS calibration setting: homogenized. Daily calibration check.	Elemental analyzer	MIRIS $y = 0.78x + 0.05$; $r^2 = 0.73$. Repeatability: 0.04 g/100 ml. Mean precision ± 0.18 g/100 ml. MIRIS systematically underestimates the protein content by 0.2 g/100 ml.

(Continued)

Table 4. (Continued).

MIRIS Human Milk Analyzer (Uppsala, Sweden) Calais (Cleveland, United States) SpectraStar (Brookfield, United States)	Fat	n = 24	Folch	Esterified Fatty Acid (EFA) method	RM = 1.08 × MIRIS value – 0.73 (MIRIS tended to underestimate the amount of fat). r = 0.93 For group A (undiluted milk): MIRIS 3.6 ± 1.1 g/100 ml vs RM 3.2 ± 0.9 g/100 ml (mean difference –0.4 ± 0.3 g/100 ml) p < 0.001. MIRIS slightly overestimated fat, but accuracy good. Intra-assay variation 1.3% (SD 0.04%) MIRIS (4.29 ± 1.46 g/100 ml) vs RM (3.59 ± 1.13 g/100 ml), p < 0.01. Yielded a between-test precision of 5.19%. R ² = 0.9998 MIRIS y = 0.93x + 0.18, R ² = 0.86. Test–retest variability 0.07 g/100 ml for fat. Mean precision ±0.42 g/100 ml. Random error (imprecision) ± 0.5 g/100 ml, accuracy (slope 0.83). The regression line was MIRIS = 0.79 RM + 0.28 (R ² = 0.92) After a calibration adjustment (α = 1.261 and β = –0.354). Repeatability 2.4%, Reproducibility 2.7%. MIRIS (3.7 ± 1.5 g/100 ml) vs RM (3.2 ± 1.4 g/100 ml), p < 0.001 (Fat was approximately 14% higher when measured with MIRIS HMA). R ² = 0.93 (p < 0.001) MIRIS 3.34 ± 0.22 g/100 ml vs RM 3.63 ± 0.19 g/100 ml, p < 0.05 Repeatability 2.5%, Reproducibility 5.5%
Menjo et al. [9]					
Casadio et al. [8]					
Silvestre et al. [5]			Gerber		
Fusch et al. [15]			Mojonnier		
Billard et al. [3]		Centrifugation (15 minutes, 6000 g, 4°C) and cream separated and resuspended with protein phase to produce range fats 0–8 g/100 ml. n = 89	Bligh&Dyer		
Zhu et al. [12]			Röse-Gottlieb		
Gluffrida et al. [14]			Röse-Gottlieb		

(Continued)

Table 4. (Continued).

MIRIS Human Milk Analyzer (Uppsala, Sweden) Calais (Cleveland, United States) SpectraStar (Brookfield, United States)				
Carbohydrate	Menjo et al. [9]	n = 24 to lactose analyzes	High-performance liquid chromatography (HPLC) – lactose	Lactose content measured with MIRIS was different from the HPLC result. RM = $3.05 \times \text{MIRIS value} - 13.4$ $R^2 = 0.72$
	Casadio et al. [8]		Enzymatic spectroscopic method	Group A: MIRIS 6.4 ± 0.6 g/100 ml vs RM 6.9 ± 0.7 g/100 ml, mean difference 0.5 ± 0.5 g/100 ml, $p < 0.001$. Lactose was slightly underestimated by the MIRIS-HMA. Differences were greater in concentrated samples. Intra-assay variation 0.8% (SD 0.04%) MIRIS $(6.9 \pm 0.17$ g/100 ml) vs RM $(6.89 \pm 0.91$ g/100 ml), $p < 0.001$ Yielded a between-test precision 1.40% for lactose. $R^2 = 0.998$
	Silvestre et al. [5]		Lactose IK-Chloramine-T reaction	$y = -0.09x + 6.62$, $R^2 = 0.02$
	Fusch et al. [15]		UPLC-MS/MS (liquid chromatography)	Test-retest variability 0.10 g/100 ml. Measures the variation of lactose concentration only in a small range 5.5–7 g/100 ml.
	Billard et al. [3]	Lactose range 5–8 g/100 ml	Automated orcnol	MIRIS = $0.59 \text{ RM} + 1.86$ ($R^2 = 0.95$) After change of the MIRIS calibration ($\alpha = 1.694$ and $\beta = -3.153$).
	Zhu et al. [12]	n = 100	HPAEC model DX500	Repeatability 1.4% Reproducibility 1.5% MIRIS 6.6 ± 0.4 g/100 ml vs RM 6.7 ± 0.7 g/100 ml, $p > 0.05$. MIRIS not accurate, relation to RM changes across concentration range. $R^2 = 0.10$ ($p > 0.05$)
	Giuffrida et al. [14]		(HPAEC-PAD) – lactose	MIRIS 6.58 g/100 ml vs RM 6.54 g/100 ml, $p > 0.05$ MIRIS was accurate for the measurement of lactose.
Energy	Casadio et al. [8]		Calculated from results of macronutrient concentration with RM, conversion factors of 9.25, 4.4, and 4.0 kcal per 100 ml for fat, protein, and lactose. Formula = $9.25 (\text{Fat}) + 3.95 (\text{Protein}) + 5.65 (\text{Carbohydrates})$	Repeatability 3.8%. Reproducibility 5.6% Group A: MIRIS 65.0 ± 10.4 kcal/100 ml vs RM 62.2 ± 8.8 kcal/100 ml (mean difference: -2.8 ± 3.7 kcal/100 ml), $p < 0.001$
	Miller et al. [1]		Correct total caloric intake determination	

(Continued)

Table 4. (Continued).

MHIS Human Milk Analyzer (Uppsala, Sweden) Calais (Cleveland, United States) SpectraStar (Brookfield, United States)	Protein	10 Mothers of babies <2 kg. 24 h pool collection. 1 cycle freeze (-20°C), thawed overnight in refrigerator, warmed (water bath) 40°C. Diluted with distilled water (1:2; 1:3; 1:5; 1:10). 21 samples frozen HM, thawed and warmed 40°C. 35 mothers, late-preterm and term newborns One-time sample of 100 ml fresh milk from 1 week to 2 year lactation. Frozen - 25°C, thawed overnight in a refrigerator-water-bath 40°C. n = 51 well-mixed of previously frozen expressed milk, after thawing, prewarmed at 40°C. Previously assayed "control" milk samples were thawed and also run with unknowns.	Kjeldahl Total protein = total nitrogen × 6.25, True protein is total protein minus 24% for nonprotein nitrogen. Kjeldahl Kjeldahl True protein = subtracting the nonprotein nitrogen from total nitrogen × 6.25 (conversion factor for human milk). Creatomocrit Mojonnier Mojonnier Mojonnier	Calais 1.18 ± 0.12 (1.01–1.4) g/100 ml vs RM 1.21 ± 0.14 (1.03–1.44) g/100 ml, p = 0.098. Intraclass correlation coefficients 0.987 (0.948–0.997), p < 0.001. Regression coefficients (intercept, slope) protein (0.126, 0.881). Differences for protein in 1:2 and 1:3 dilution were not clinically relevant (5%). Differences were relevant (>10%) with 1:5 and 1:10 dilutions. Protein 10% lower with Calais than RM for native and diluted. Calais 0.74 ± 0.08 (0.59–0.91) g/100 ml vs RM 0.77 ± 0.14 (0.5–1.12) g/100 ml, p < 0.035. Interclass correlation coefficient 0.839 (0.673–0.920), p < 0.001. Difference of means 0.03 g/100 ml. Degree of bias - 0.03. R ² = 0.83 (p < 0.001) Calais coefficient of variation 0.81%. Calais measurements were significantly lower (45%) than RM, (3.2 ± 1.1 g/100 ml vs 3.8 ± 1.9 g/100 ml, p < 0.001). Calais 3.10 ± 0.87 (1.24–3.98) g/100 ml vs RM 3.13 ± 0.89 (1.46–4.23) g/100 ml, p = 0.621. Intraclass correlation coefficients 0.989 (0.955–0.997), p < 0.001. Regression coefficients (intercept, slope) for fat (0.036, 0.998). Differences 1:2 and 1:3, 5%. Differences 1:5 and 1:10 > 10%. Calais: 4.2 ± 1.8 (1.32–8.54) g/100 ml vs RM: 4.1 ± 1.8 (1.16–8.07) g/100 ml, p < 0.05. Interclass correlation coefficient 0.997 (0.992–0.999), p < 0.001. Difference of means 0.01 g/100 ml. Degree of bias 0.09 R ² = 0.99 (p < 0.001) Calais coefficient of variation 1.46%. Calais 6.23 ± 0.32 (5.78–6.79) g/100 ml vs RM 6.12 ± 0.35 (5.41–6.62) g/100 ml, p = 0.098. Intraclass correlation coefficients 0.848 (0.504–0.960) for lactose, p < 0.001. Regression coefficients (intercept, slope) lactose (1.482, 0.776). Differences 1:5 and 1:10 > 10%. Lactose 10% higher with Calais. Calais: 6.5 ± 0.2 (5.89–6.81) g/100 ml vs RM: 6.6 ± 0.3 (6.0–7.05) g/100 ml, p < 0.05. Interclass correlation coefficient 0.776 (0.176–0.916), p < 0.001. Difference of means 0.1 g/100 ml Degree of bias -0.15 R ² 0.614, (p < 0.001) Calais coefficient of variation 0.52%.
Groh-Wargo et al. [7]			High-performance liquid chromatography (HPLC) – lactose	
Smith et al. [69]			High-performance liquid chromatography (HPLC) – lactose	
Parat et al. [31]			High-performance liquid chromatography (HPLC) – lactose	
Groh-Wargo et al. [7]	Carbohydrate			

(Continued)

Table 4. (Continued).	
MIRS Human Milk Analyzer (Uppsala, Sweden)	
Calais (Cleveland, United States)	
SpectraStar (Brookfield, United States)	
Energy	O'Neill et al. [70]
	Groh-Wargo et al. [7]
	Calais 17.1 ± 2.9 g/100 ml vs RM 21.8 ± 3.4 g/100 ml, p < 0.001, difference 22%.
	Calais 57.6 ± 8.2 (40.6–67) g/100 ml vs RM 57.5 ± 8.2 (42.1–67.8) g/100 ml, p = 0.081.
	Intraclass correlation coefficients and 0.982 (0.931–0.996) (p < 0.001).
	Regression coefficients (intercept, slope) energy (1.37, 0.978).
	Chemical analysis of proteins:
	• calibration set, range: 0.98 to 1.97. Correlation with SpectraStar, logistic regression analysis, R ² = 0.96.
	• validation set, the range: 0.96 to 1.86. Correlation with SpectraStar, logistic regression analysis, R ² = 0.95.
	y = 0.55x + 0.54, R ² = 0.67.
	Test-retest variability was 0.08 g/100 ml for protein.
	Mean precision ±0.14 g/100 ml
	Random error (imprecision) of 1.5%.
	Tendency to overestimate samples with low protein content (typically <1 g/100 ml) and underestimate samples with higher protein content by 25%.
	SpectraStar following the correction algorithm.
	unpasteurized (R ² = 0.953) and pasteurized samples (R ² = 0.943), mean precision for protein determination ±0.1 g/100 ml.
	SpectraStar CV = 3.6%.
	EA: protein content native milk 1.45 ± 0.51, skim milk 1.39 ± 0.48 g/100 ml, mean difference 0.06 g/100 ml (IQR –0.01 to 0.11 g/100 ml, p < 0.001), average difference 4%.
	SpectraStar (2009 calibration algorithm): protein content native milk 1.44 ± 0.46 g/100 ml, skim milk 1.17 ± 0.47 g/100 ml, mean difference 0.27 g/100 ml (IQR 0.19–0.42 g/100 ml; p < 0.001), average difference 20%, clinically significant.
	SpectraStar (2015 calibration algorithm): protein content native milk 1.54 ± 0.34 g/100 ml, skim milk 1.44 ± 0.30 g/100 ml, mean difference 0.10 g/100 ml (IQR 0.03–0.17 g/100 ml; p < 0.001), average difference 6%.
	(Continued)
	Creamatocrit
Protein	Sauer et al. [47]
	n = 52
	18 mothers, 5 samples during first week and 2 samples next week post delivery.
	42 samples to calibration, 10 to validation.
	Kjeldahl
	Fusch et al. [15]
	n = 1188, stored breast milk (–20°C measured with IR; –80°C measured with wet chemistry) over a period of 14 months (from 63 term and preterm new-born's mothers, early and late lactation).
	1 st homogenized
	Elemental analyzer
	Katiri et al. [17]
	n = 50, pool of excedent of frozen milk at newborn discharge
	Pasteurized and unpasteurized samples, stored –20°C, thawed, warmed 37°C for 5 min, homogenized.
	Elemental analysis
	Kwan et al. [18]
	n = 25, stored at –20°C, thawed in a water bath at 40°C, and homogenized.
	Group A (n = 20) baseline samples and skin milk (centrifugate 18,000 G x 10 min) completely defatted.
	Elemental analyzer

Table 4. (Continued).

MIRS Human Milk Analyzer (Uppsala, Sweden) Calais (Cleveland, United States) SpectraStar (Brookfield, United States)					
Fat	Sauer et al. [47]	Mojonnier	Chemical analysis of fat: • SpectraStar, logistic regression analysis, $R^2 = 0.96$. • validation set, the range: 1.11 to 5.62 g/100 ml. Correlation with SpectraStar, logistic regression analysis, $R^2 = 0.95$. $y = 0.55x + 1.25$, $R^2 = 0.85$. Test-retest variability was 0.10 g/100 ml for fat. Mean precision ± 0.25 g/100 ml. Random error (imprecision) ± 0.5 g/100 ml, accurately (slope 0.55). Lactose and fat inversely affected by the degree homogenization.		
	Fusch et al. [15]	Mojonnier			
	Kotrii et al. [17]	modified ether Mojonnier extraction	SpectraStar following the correction algorithm. ($R^2 = 0.971$), mean precision for fat determination ± 0.2 g/100 ml.		
	Kwan et al. [18]	Mojonnier	Group B ($n = 5$) – centrifuged at 2000 g for 20 min. – Fat was then gradually taken out for each sample, making samples containing approximately 0%, 25%, 50%, 75% and 100% of fat → total of 30 samples		
Carbohydrate	Sauer et al. [47]	High-pressure liquid chromatography	SpectraStar CV for fat is 2.3%. SpectraStar (2009 calibration algorithm) a gradual decrease in fat content was correlated with a linear decrease in the protein content $R^2 = 0.5302$. SpectraStar (2015 calibration algorithm) this linear relationship was weaker and also not clinically significant. $R^2 = 0.3051$. Mojonnier: no linear relationship was observed $R^2 = 0.0728$. Chemical analysis of carbohydrates: • calibration set, range 5.74 to 7.12 g/100 ml. Correlation with SpectraStar, logistic regression analysis, $R^2 = 0.81$. • validation set, the range: 5.58 to 6.56 g/100 ml. Correlation with SpectraStar, logistic regression analysis, $R^2 = 0.91$.		
	Fusch et al. [15]	UPLC-MS/MS (liquid chromatography)	Showned two distinct concentration levels and measured therefore neither accurately nor precisely ($y = 0.02x + 5.69$), $R^2 = 0.01$. Test-retest variability was 0.16 g/100 ml for carbohydrates. $R^2 = 0.006$ Measures the variation of lactose concentration only in a small range 5.5–6.5 g/100 ml. Lactose and fat inversely affected by the degree homogenization.		

(Continued)

Table 4. (Continued).

MIRIS Human Milk Analyzer (Uppsala, Sweden)		
Calais (Cleveland, United States)		
SpectraStar (Brookfield, United States)		
Proteins	Michaelson et al. [71]	n = 30 from the first week to the first months after delivery. Sample frozen -20°C, heated to 40°C and agitated.
Fat		
Carbohydrate		
Energy		
Delta LactoScape (Stockholm, Sweden)		
Proteins	Smilowitz et al. [49]	n = 115 from 74 mothers of term (69) and preterm (5) newborns Samples collected during 1 st year after delivery 4°C-room T=water bath 38°C=vertezed 1 st : undiluted and analyzed by RM 2 nd : diluted 1:10 and analyzed by MilkoScan™ n = 66
Fat		
Carbohydrate		
Energy		

Values are expressed by mean ± standard deviations or mean ± standard deviations (range).
Samples analyzed by LactoScape FTIR and reference methods were compared by paired samples student's T.
Macronutrients are expressed by g/100 ml, total solid are expressed by percentage and energy is expressed by kcal/100 ml.

accurate and reliable, with higher differences in more concentrated samples [8]. Other studies find the MIRIS HMA inaccurate when comparing fat measurements with the Folch [9] or the Gerber [5] or the Bligh and Dyer [3] methods. In all cases, correlation between methods was still good, so adequate recalibration is suggested as a way to improve accuracy, as shown again by Billard et al. [3]. Sample processing seems to have a particular influence on the determination of fat content. Fat aggregation in casein micelles can occur in frozen samples [68]. Different sizes of fat droplets interfere with radiation readings, so poor or too short homogenization can have a major impact on reliability of the results [15].

Five of the seven studies evaluated inter-assay (reproducibility) and intra-assay (repeatability) variation coefficients from the MIRIS HMA, with results lower than 5.3%. They concluded that it was an accurate and reliable method to quantify fat in mother's milk [3,5,8,14,15].

Carbohydrate measurements from MIRIS HMA have been compared to high-performance liquid chromatography (HPLC), Chloramine-T reaction, UPLC-MS/MS (ultra-performance liquid chromatography), automated orcinol, and high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD). Results are inconsistent when using HPLC as the gold standard. Some authors reported an overestimation of carbohydrate content of up to 27% [9], deeming it unreliable, while Casadio et al. found the MIRIS HMA to be accurate, with differences around 7% [8,9]. The accuracy of the results seems to be greatly influenced by the concentration of the sample [8,9]. Studies using laboratory techniques that are different from the one used for factory calibration of the analyzer (like Chloramine-T reaction, UPLC-MS/MS (liquid chromatography) or automated orcinol) reported good correlation coefficients (up to 0.95) but low accuracy, with differences higher than 20% [3,5,15]. Zhu et al. and Giuffrida et al. used HPAEC-PAD as a reference method. Zhu et al. emphasized that there was no correlation between both methods since HPAEC-PAD systematically reports more extreme values in both high and low lactose concentrations [10]. Researchers using both the UPLC-MS/MS [15] and the HPAEC-PAD method [12] explained these findings because of the chemical differences between human and cow's milk, for which they were initially developed. Human milk has a high concentration of oligosaccharides, while the presence of these in cow's milk is minimal. Oligosaccharides always contain a terminal lactose residue, which the MIRIS HMA cannot differentiate from free lactose [12]. In the hands of Giuffrida et al., however, the MIRIS HMA was accurate and reliable for the measurement of carbohydrates when compared to HPAEC-PAD [14].

Five of the seven studies evaluated the MIRIS HMA as having good reproducibility and repeatability after obtaining coefficients under 6% for inter-assay and intra-assay variation.

The measurement of total solids has only been compared to freeze-drying in three studies. The authors concluded that there were no significant differences between the MIRIS and the RM [3,8,12]. Casadio et al. found that the MIRIS HMA reported slightly higher values, with greater differences in skimmed samples and

smaller differences in concentrated or diluted samples [8]. The correlation coefficients were 0.78 and 0.94 [3,12].

Two studies evaluated the coefficient of variation inter-assay (reproducibility) and intra-assay (repeatability) of the MIRIS HMA, rendering values lower than 7%, and concluding that it had good reproducibility and repeatability in the measurement of total solids in breast milk [3,8].

Only one study has assessed the estimation of the caloric content in breast milk by an RM [8]. They found MIRIS HMA to be reliable, displaying small but significant differences, with a tendency toward overestimation in the most concentrated samples [8]. The more general approach is to calculate energy from macronutrient content. It should be noted that studies do not always use the same coefficients to calculate kcal per gram of each macronutrient [8].

5.2.2. Calais human milk analyzer

Performance of the Calais Milk Analyzer for the measurement of proteins, fats, and carbohydrates has been assessed against Kjeldahl, Monjonier, and HPLC, respectively. The measurement of fat and the calculation of caloric content have also been compared to the creatatocrit method. In general, the results were found to be reliable for the measurement of macronutrients [7,31,69], and any statistically significant differences described lacked clinical relevance, with an underestimation of proteins and carbohydrates by 4% and 2%, and an overestimation of fats by 2% [31]. Consequently, the calculation of energy content was also accurate [7]. As one requirement of the device is an 8 ml sample, Smith et al. assessed the possibility of working with diluted samples. They concluded that, with dilution ratios of 1:5 or higher, accuracy was compromised, with readings for the three macronutrients that were more than 10% below those reference methods [69]. Regarding correlation coefficients between Calais MA and classical methods, reported values are higher than 0.83, 0.98, 0.78, and 0.98 in the measurement of proteins, fats, carbohydrates, and energy respectively [7,31]. Precision has also been shown to be good in the measurement of proteins (CV 0.81%), fats (CV 1.46%) and carbohydrates (CV 0.52%) [31]. O'Neill et al. compared Calais HMA to creatatocrit for fat measurement and for caloric content; however, they rejected the use of creatatocrit as they referred that it overestimated fat measurement [70].

5.2.3. SpectraStar human milk analyzer

Kjeldahl and elemental analysis have been used to compare protein quantification with the SpectraStar Milk Analyzer, and with Monjonier and UPLC-MS/MS to analyze fat and carbohydrate quantification, respectively. Fusch et al. questioned the reliability of the SpectraStar MA for the quantification of proteins and fats even though the differences between methods were lower than 15%. Measurements were greatly influenced by the characteristics of the sample: the device overestimated proteins when the concentration of the sample was low and underestimated proteins when the concentration was high. It also underestimated fat content depending on the degree of homogenization of the milk [15]. Kotrri et al. found

different results, concluding that the SpectraStar MA was accurate and reliable for the measurement of proteins (correlation coefficients higher than 0.94) and fat (correlation coefficient higher than 0.95) in both pasteurized and unpasteurized milk [17].

Both the version of the algorithm used and the sample fat content of the sample can have an impact on protein measurement with the SpectraStar MA [18]. The 2009 calibration algorithm gave a significant difference of 20% in protein measurement between whole and skimmed milk; however, with the 2015 calibration algorithm the difference was 6%. To evaluate the linearity of protein measurements in different fat environments, Kwan et al. removed fat by centrifugation, obtaining samples with different fat concentrations. There was no correlation between fat and protein concentration by elemental analysis ($R^2 = 0.073$). SpectraStar MA protein measurements positively correlated with fat content, but this was only of both statistical and clinical significance when using the 2009 algorithm ($R^2 = 0.53$).

Levels of carbohydrates obtained with the SpectraStar MA have been shown to be inaccurate [15,17], a fact that was again attributed to the high content of oligosaccharides in human milk and to the validation of calibration solutions with cow's milk [15].

Sauer et al. reported good correlation of SpectraStar MA with classical methods in a validation set when using calibration algorithms generated with a previous calibration set. They reported correlation coefficients greater than 0.81 for the three macronutrients. Unfortunately, accuracy or precision of the method was not evaluated [47].

5.2.4. MilkoScan human milk analyzer

Only one study has compared the MilkoScan Milk Analyzer with a laboratory reference, using the Kjeldahl and Roesel-Gottlieb methods and elemental analyses for protein, fat, and carbohydrate measurement, respectively [71]. The results suggest that the MilkoScan MA is reliable for measuring protein content. Correlation with chemical methods was high ($R^2 > 0.97$) and although there was a statistically significant difference, it was not clinically relevant. Precision was also good with a coefficient of variation under 1%.

There was a good correlation of fat quantification between MilkoScan MA and classical methods ($R^2 > 0.98$). Coefficient of variation was also small (<1%) [71].

As with other devices, the correlation coefficient for carbohydrates was lower than those obtained with elemental analysis ($R^2 = 0.79$). Repeatability was good, with variation coefficients within 1%.

Regarding total calories, MilkoScan MA had good correlation with numerical estimation ($R^2 > 0.98$) and was precise, with variation coefficient less than 1%. There were small differences that the authors suggest could be improved with calibration adjustments.

5.2.5. Delta LactoScope human milk analyzer

There is one report on the analysis of breastmilk with the LactoScope Milk Analyzer as compared to the Kjeldahl method for protein measurement, Mojonner method for fat measurement, and UPLC – MS/MS for carbohydrate measurement.

Results suggested that LactoScope MA was reliable for measuring protein content. The correlation with chemical methods was high for the measurement of proteins and fats (both $R^2 > 0.97$), nevertheless there was a significant underestimation of protein concentration (about 9%) and an overestimation of fat content (around 5%). Precision was good with both coefficient of variation under 3% [49].

As with other devices, the correlation coefficient for carbohydrate readings compared with HPLC was low ($R^2 = 0.49$), with an overestimation by 15%. Repeatability was good, with variation coefficient within 2% [49].

Regarding total calories, LactoScope MA had good correlation with numerical estimation ($R^2 > 0.97$) and was precise with variation coefficient less than 1% [49].

5.3. Considerations regarding quality control

It transpires from the above information that the reliability of macronutrient measurements using infrared technology and, consequently, their safe use for the purpose of clinical nutrition of preterm infants will be impacted at several steps of the process.

Good Clinical Laboratory Practices are the norm in the dairy industry and if the technology is going to be applied in the field of neonatal feeding, so should be the governing guidelines. Standard Operating Procedures for the collection, handling, storage, and preparation should be defined, with the necessary adaptations to the constraints of the clinical setting. The devices in use should be provided with appropriate factory calibrations to be used with human milk and quality control samples or solutions should be available as reference for startup and ongoing calibration and adjustment is necessary. This indeed seems to have permeated the field in later years, as most commercial analyzers offer solutions or manufacturer support to maintain calibration standards [40,72]. Because the establishment and maintenance of calibration protocols can be time-consuming and requires a high degree of expertise, monitoring networks have been created within the dairy industry for the surveillance of groups of spectrometers in different locations [73]. A similar model was recently applied in a clinical setting offering promising results [46].

6. Discussion

We have reviewed the relevant literature assessing the performance of human milk analyzers against classical laboratory methods and other information that could be relevant toward clinical applicability. Overall, most authors conclude that infrared milk analyzers are accurate and reliable for measuring macronutrients, specifically crude protein, and total fat, when compared to reference methods, despite some differences. For measuring protein with the MIRIS HMA, correlation and precision were good [3,5,8,15], but the difference with reference methods oscillated between small [3,8] and very high [5,12]. It is important to note that infrared technology was originally developed for the dairy industry. It measures crude protein and it does not differentiate nonprotein nitrogen (i.e. urea, small peptides, amino acids, or nucleotides). In bovine milk, the amount of nonprotein nitrogen is less than 5%, but in

human milk is usually between 20% and 30% and can be up to 50% [13]. Therefore, the mentioned discrepancies might be due to the presence of high percentage of nonprotein nitrogen in human milk [74]. Moreover, the use of different conversion factors can result in variability because the true value will depend on the particular amino acid sequence of the protein. The concentration of samples can also have an influence on the accuracy of the measurements [8].

More than 95% of the lipids contained in milk are organized in milk fat globules, spherical structures with specific characteristics [75]. The heterogeneity derived from the different sizes of these fat droplets can lead to over or underestimation of fat content [3] and their physical destruction allows for a more accurate quantification of fat in the analyzers. Because of this, correct homogenization is fundamental to obtain reliable results [15], especially after freezing. Homogenization also helps reducing fat loss due to its adherence to sample vials [46]. However, authors differ in the use of homogenization conditions, which might explain some of the reported differences. Another matter would be if the measurement of fat in inhomogenized milk could somehow reflect information about its higher organization in milk fat globules, which is known to influence how this fat can be digested and absorbed [75].

Carbohydrates seem to be the component for which the analyzers show the worst performance. According to a recently published study (Perrin et al.) only the Fourier-transformed full spectra mid-infrared instruments like MilkoScan HMA and Delta LactoScope reported accurate carbohydrate values; filtered mid-infrared and near infrared instruments like MIRIS HMA and SpectraStar reported carbohydrate values that were 20–50% higher than reference lactose values [13]. It must be taken into account that infrared technology measures total carbohydrates and does not differentiate between lactose and human milk oligosaccharides [13]. In human milk, oligosaccharides can account for 10–25% of carbohydrates [13]. Oligosaccharides contain a lactose terminal, and the MIRIS HMA cannot differentiate free lactose from a lactose moiety in oligosaccharides [12,14]. It seems that MIRIS HMA struggles with extreme lactose concentrations: Zhu et al. found no correlation in carbohydrate measurement with HPAEC-PAD in the case of low or high lactose concentrations [12], and Menjo et al. reported that the MIRIS HMA overestimated carbohydrate measurement in 27%, concluding that it was not reliable if lactose content was low [9]. However, carbohydrate content might be of relative importance in clinical practice, given that it has a small impact on caloric content when compared to fat. Even though premature infants need a correct glucidic intake and the maintenance of a correct protein/non-protein energy ratio, most fortification practices pivot around increasing the amino acid or lipid content, rather than targeting carbohydrates.

Other milk analyzers, like the Calais and the MilkoScan, are also accurate and reliable, but they need a higher sample volume. This makes them suitable in situations where the amount of milk is not a limiting factor (i.e. milk banks), but they might not be as useful for small volumes in case of individualized feeding plans in neonatal units. They also entail a bigger economic investment. There is little published

evidence with regards to SpectraStar. Authors who studied LactoScope concluded that it produces measurements with good correlation, but that accuracy could be improved with proper calibration.

7. Expert opinion

An optimal nutritional support is the cornerstone of newborns' health, especially in the case of preterms, and constitutes a key factor for appropriate neurodevelopment. Human milk is the preferred source of nutrition, but it introduces variability in enteral nutrient supply due to its changing composition. For this reason, there is an increasing need for technology that readily allows the measurement of macronutrient content of this biological fluid. In research, this will allow for the definition of relevant differences in human milk composition in different populations, or according to maternal characteristics, maternal life habits or duration, and peculiarities of gestation. In clinical practice, it is essential for the implementation of universal individualized fortification of human milk, both own maternal or donor milk, and to calculate the exact macronutrient and energetic supply to premature infants. In general, infrared analysis is a useful tool for assessing milk composition.

Sample selection and preparation will influence the concentration and structure of macronutrients. When planning a systematic approach to individualized nutrition in the neonatal unit, and due to the heterogeneity in milk composition and the effects of freezing, a sample from fresh or refrigerated milk from a 24-hour pool is probably most representative, if available. Freezing increases the content of free fatty acids in milk, which might affect the results depending on the method. However, freezing milk samples is sometimes required due to logistical needs and is the norm in milk banking. For research purposes, the use of fresh milk entails added logistic problems, so most milk samples in the studies assessing human milk analyzers have been frozen and thawed. It has traditionally been recommended that, after freezing, samples should slowly be taken to room temperature and properly homogenized before measurement. Recent studies have beautifully illustrated how differences in homogenization can impact the final structure of milk and, hence, interfere in the reading, so that extensive homogenization should probably precede infrared analysis of fresh or thawed milk [15]. Standardized guidelines as to the best methods for collecting, pooling, storing, and homogenizing breast milk samples for macronutritional analysis are scarce, but essential in order to obtain reliable results. Some of the above-mentioned differences between macronutrient contents might be caused not only by the device itself but also by the procedures to which the milk is subjected. It is crucial to introduce standard operating protocols and good clinical laboratory practice into the milk analysis in neonatal units, with training of the operators, standardized and approved protocols for testing the calibration of equipment, and periodical quality controls to check the performance of the device.

At present, mid-infrared analyzers show the better potential to aid preterm individualized nutrition in the neonatal unit. The technology has been found to be accurate and reliable by most studies regarding protein and fat, the two most determinant

factors for targeted or adjusted fortification [76]. Most of the evidence concerns the MIRIS HMA. Also MIRIS HMA might present some advantages in a clinical setting, like the requirement of small volumes to perform the analyses, the economical affordability, the small size, and the ease of use. Even so, there is room for improvement in the calibration of the analyzer to ensure accuracy of the results, especially concerning carbohydrate content. When the limitation of sample volume is less of a problem, as is the case in milk banks, Fourier-transformed infrared devices might offer more accurate carbohydrate readings, although there are very few studies comparing performance against reference methods. Future progress in the area should mainly focus on the improvement of specific human milk matrices for calibration of human milk analyzers and in the development of common protocols for testing the performance of devices.

In our view, the use of human milk analyzers as a point of care technique will become widespread in neonatal units. Human milk analyzers may hugely contribute to the current trend of offering a more tailored nutrition; with the possibility to take into account, on the one hand, the macronutrient content in a mother's milk and, on the other hand, the specific nutritional needs of her child. In the near future, a thorough understanding of human milk composition should allow neonatologists to cover the specific nutritional needs of each preterm infant, in an attempt to allow for an extrauterine growth that is as comparable as possible to the optimal intrauterine growth. Further studies are needed to investigate the performance of current human milk analyzers and practices in order to promote the use of infrared technology in routine clinical practice.

Funding

This manuscript received no specific Funding. The researchers participate in an ongoing project receiving financial support from the National R+D+I Plan (PI17/00107) of the Instituto de Salud Carlos III- ISCIII (Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación Sanitaria), which was cofunded with the European Union Regional Development Fund (FEDER).

Declaration of interest

The authors have no relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties.

Reviewer disclosures

Peer reviewers on this manuscript have no relevant financial or other relationships to disclose.

ORCID

Cristina Borràs-Novell  <http://orcid.org/0000-0003-3943-7317>

References

Papers of special note have been highlighted as either of interest (*) or of considerable interest (++) to readers.

1. Miller EM, Aiello MO, Fujita M, et al. Field and laboratory methods in human milk research. *Am J Hum Biol.* 2013;25:1–11.
- **Authors reviewed frequently used methods for the analysis of fat, protein, sugars/lactose and specific biomarkers in human milk, including MIRIS Human Milk Analyzer**
2. Radmacher PG, Lewis SL, Adamkin DH. Individualizing fortification of human milk using real time human milk analysis. *J Neonatal Perinatal Med.* 2013;6:319–323.
3. Billard H, Simon L, Desnots E, et al. Calibration adjustment of the mid-infrared analyzer for an accurate determination of the macronutrient composition of human milk. *J Hum Lact.* 2016;32:NP19–NP27.
- **Authors compared MIRIS Human Milk Analyzer results with results from biochemical reference methods to establish a calibration adjustment that allowed accurate measurements in a large range of macronutrient content**
4. Ehrenkranz RA, Younes N, Lemons JA, et al. Longitudinal growth of hospitalized very low birth weight infants. *Pediatrics.* 2004;104:280–289.
5. Silvestre D, Fraga M, Gormaz M, et al. Comparison of mid-infrared transmission spectroscopy with biochemical methods for the determination of macronutrients in human milk. *Matern Child Nutr.* 2014;10:373–382.
- **Authors evaluated the suitability of a rapid method for the analysis of macronutrients in human milk compared with the analytical methods applied by cow's milk industry, and concluded that the use of mid-infrared human milk analyzers might become the standard for rapid analysis of human milk once standardisation and rigorous and systematic calibration were provided**
6. Brownell EA, Matson AP, Smith KC, et al. Dose-response relationship between donor human milk, mother's own milk, preterm formula, and neonatal growth outcomes. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2018;67:90–96.
7. Groh-Wargo S, Valentic J, Khaira S, et al. Human milk analysis using mid-infrared spectroscopy. *Nutr Clin Pract.* 2016;31:266–272.
- **Authors compared mid-infrared spectroscopy to reference laboratory milk analysis methods and concluded that it appeared to provide an accurate assessment of macronutrient content in expressed human milk from mothers of preterm infants and it might be a potentially useful tool for individualized fortification plans**
8. Casadio YS, Williams TM, Lai CT, et al. Evaluation of a mid-infrared analyzer for the determination of the macronutrient composition of human milk. *J Hum Lact.* 2010;26:376–383.
- **Authors compared the macronutrient levels determined by MIRIS Human Milk Analyzer to those derived from traditional laboratory methods and concluded that, with appropriate sample preparation, mid-infrared human milk analyzers could provide practical measurements**
9. Menjo A, Mizuno K, Murase M, et al. Bedside analysis of human milk for adjustable nutrition strategy. *Acta Paediatr Int J Paediatr.* 2009;98:380–384.
- **Authors examined if the macronutrient values measured by MIRIS Human Milk Analyzer were comparable with those measured by conventional methods. They concluded that human milk analyzer could inform us about the amount of major nutrients in breast milk, but when milk was diluted, the lactose content measured was overestimated**
10. Andreas NJ, Kampmann B, Mehring Le-Doare K. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Hum Dev.* 2015;91:629–635.
11. Fusch G, Kwan C, Kotrri G, et al. "Bed side" human milk analysis in the neonatal intensive care unit: a systematic review. *Clin Perinatol.* 2017;44:209–267.
12. Zhu M, Yang Z, Ren Y, et al. Comparison of macronutrient contents in human milk measured using mid-infrared human milk analyzer in a field study vs. chemical reference methods. *Matern Child Nutr.* 2017;13:e12248.
- **Authors compared the accuracy and precision of MIRIS Human Milk Analyzer with fresh milk samples with chemical methods**

- with frozen milk samples. They concluded that human milk analyzer might be used to analyze macronutrients in fresh human milk with acceptable accuracy and precision after recalibrating fat and protein levels of field samples
13. Perrin MT, Festival J, Starks S, et al. Accuracy and reliability of infrared analyzers for measuring human milk macronutrients in a milk bank setting. *Curr Dev Nutr.* 2019;3:1–7.
 - **Authors evaluated the accuracy, reliability and comparability of four commercial infrared analyzers for measuring human milk macronutrients and concluded that they are accurate and reliable methods for measuring crude protein and total fat in a milk bank setting**
 14. Giuffrida F, Austin S, Cuany D, et al. Comparison of macronutrient content in human milk measured by mid-infrared human milk analyzer and reference methods. *J Perinatol.* 2019;39:497–503.
 - **Authors evaluated MIRIS Human Milk Analyzer accuracy and precision in human milk and concluded that it was reliable for the quantification of total fat and lactose content, but not for total protein**
 15. Fusch G, Rochow N, Choi A, et al. Rapid measurement of macronutrients in breast milk: how reliable are infrared milk analyzers? *Clin Nutr.* 2015;34:465–476.
 - **Authors validated SpectraStar and MIRIS Human Milk Analyzers for breast milk analysis with reference methods and determined an effective sample pretreatment. They concluded that milk analyzers had potential to be introduced in clinical routine to measure fat and protein content, but could need major adjustments.**
 16. ICAR. Guidelines for milk analysis - section 12. 2020 [cited 2019 May 14]. Available from: <https://www.icar.org/Guidelines/12-Milk-Analysis.pdf>
 17. Kotrri G, Fusch G, Kwan C, et al. Validation of correction algorithms for near-IR analysis of human milk in an independent sample set—Effect of pasteurization. *Nutrients.* 2016;8:119.
 - **Authors tested a correction algorithm for SpectraStar analyzer for fat and protein measurements, and examined the effect of pasteurization on the infrared matrix and the stability of fat, protein, and lactose. Their conclusions are that fat and protein content could be accurately measured and monitored for unpasteurized and pasteurized breast milk**
 18. Kwan C, Fusch G, Bahonjic A, et al. Infrared analyzers for breast milk analysis: fat levels can influence the accuracy of protein measurements. *Clin Chem Lab Med.* 2017;55:1931–1935.
 - **Authors investigated whether the measurement of protein is dependent on the levels of fat while using an infrared milk analyzer, finding that high fat content could lead to falsely high protein content**
 19. Lönnerdal B, Smith C. CLK analysis of breast milk: current methodologies and future needs. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1984;3:290–295.
 20. Oftedal OT, Verson SJ. Comparative analysis of nonhuman milks. Phylogenetic variation in gross composition of milks. In: Jensen RG, editor. *Handbook of Milk Composition.* San Diego: Academic Press. 1995. p. 749–788.
 21. Wu X, Jackson RT, Khan SA, et al. Human milk nutrient composition in the United States: current knowledge, challenges, and research needs. *Curr Dev Nutr.* 2018;2:1–18.
 22. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248–254.
 23. Mitoulas LR, Kent JC, Cox DB, et al. Variation in fat, lactose and protein in human milk over 24h and throughout the first year of lactation. *Br J Nutr.* 2002;88:29–37.
 24. Polberger S, Lönnerdal B. Simple and rapid macronutrient analysis of human milk for individualized fortification: basis of improved nutritional management of very-low-birth-weight infants? *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1993;17:283–290.
 25. Choi A, Fusch G, Rochow N, et al. Establishment of micromethods for macronutrient contents analysis in breast milk. *Matern Child Nutr.* 2015;11:761–772.
 26. Bloom H, Lewis IC, Noller BNB. Elemental analysis of dried milks used in infant feeding. *J Paediatr Child Health.* 1978;14:259–264.
 27. Horwitz WLG. Official methods of analysis of AOAC international. 18th ed. Gaithersburg: AOAC; 2010.
 28. Fusch G, Choi A, Rochow N, et al. Quantification of lactose content in human and cow's milk using UPLC-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2011;879:3759–3762.
 29. Lee YC. High-performance anion-exchange chromatography for carbohydrate analysis. *Anal Biochem.* 1990;189:151–162.
 30. MingMing C, Qi C, Shuang L, et al. Determination of lactose in human milk by ion chromatography. *J Food Saf Qual.* 2014;5:2054–2058.
 31. Parat S, Groh-Wargo S, Merlino S, et al. Validation of mid-infrared spectroscopy for macronutrient analysis of human milk. *J Perinatol.* 2017;37:822–826.
 - **Authors assessed the accuracy of a filter-based MIR analyzer (Calais Milk Analyzer) when measuring macronutrient density in human milk samples in comparison with standard laboratory tests, concluding that mid infrared spectroscopy can be used to analyze macronutrient composition of human milk**
 - Hinton CL, MacAra T. The determination of aldose sugars by means of chloramine-T, with special reference to the analysis of milk products. *Analyst.* 1927;52:668–688.
 33. Park HS, McKeon JRA. Comparison of the mojonner and roese-gottlieb methods for determining milkfat content of ice cream. *J Food Prot.* 2016;41:424–426.
 34. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction. *Can J Biochem Physiol.* 1959;37:911–917.
 35. Lucas A, Gibbs JAH, Baum JD, et al. Creamatocrit: simple clinical technique for estimating fat concentration and energy value of human milk. *Br Med J.* 1978;1:1018–1020.
 36. Kleyn DH, Lynch JM, Barbano DM, et al. Determination of fat in raw and processed milks by the Gerber method: collaborative study. *J AOAC Int.* 2001;84:1499–1508.
 37. Dritsakou K, Liosis G, Valsami G, et al. The impact of maternal- and neonatal-associated factors on human milk's macronutrients and energy. *J Matern Neonatal Med.* 2017;30:1302–1308.
 38. Wambach K, Riordan J. Breastfeeding and human lactation. 5th edition. Boston: Jones & Bartlett Publishers. 2014.
 39. Unity Scientific L. SpectraStar the new benchmark in next generation NIR analyzers. 2010 [cited 2019 Apr 21]. Available from: http://www.graphis.it/hellma/Cataloghi/Unity_SpectraStar_general.pdf.
 40. Radmacher P. Calais human milk analyzer. *ICAN Infant, Child, Adolesc Nutr.* 2010;2:199.
 41. Perten Instruments. Delta-lactoscope especificaciones. [cited 2019 Jul 11]. Available from: <https://www.perten.com/es/Productos/Delta-LactoScope/Especificaciones/>.
 42. MIRIS Solutions. Human milk analyzer user manual. 2017 [cited 2019 May 21]; Available from: www.MirisSolutions.com/support/user-manual.
 43. Unity Scientific L. Rapid bedside human milk analysis for nutritional value [cited 2019 May 20]. 2011. Available from: https://www.unitys.com/uploads/documents/ES_Neonatal_Analyzer_web.pdf.
 44. FOSS. MilkoScan™ FT2. 2018 [cited 2019 Jul 11]. p. 1–2. Available from: <https://www.fossanalytics.com/es-es/products/milkoscan-ft2>.
 45. Perten Instruments. LactoScope FTIR Mid-IR [cited 2019 Jun 20]. 2017. Available from: https://www.perten.com/Global/Brochures/Delta_LactoScope_FTIR/LactoScope_FTIR_brochure_EN_20160518.pdf.
 46. Kwan C, Fusch G, Rochow N, et al. Milk analysis using milk analyzers in a standardized setting (MAMAS) study: A multicentre quality initiative. *Clin Nutr.* 2019;19:33040–33047.
 - **Authors investigated measurement quality between different human milk analyzers and concluded that it is crucial to follow good clinical laboratory practices when using these devices.**
 47. Sauer CW, Kim JH. Human milk macronutrient analysis using point-of-care near-infrared spectrophotometry. *J Perinatol.* 2011;31:339–343.
 - **Authors demonstrated the feasibility of the use of near-infrared spectrophotometric method for nutrient analysis of human milk and its potential for adjustable fortification**

48. Sjaunja L-O. Studies on milk analysis of individual cow milk samples. *Acta Agric Scand*. 1984;34:249–259.
49. Smlowitz JT, Gho DS, Mirmiran M, et al. Rapid measurement of human milk macronutrients in the neonatal intensive care unit: accuracy and precision of fourier transform mid-infrared spectroscopy. *J Hum Lact*. 2014;30:180–189.
- **Authors evaluated the accuracy and precision of a Fourier transform mid-infrared spectroscope (Delta LactoScope) to measure human milk fat, total protein, lactose and calculated energy compared with standard chemical analyses demonstrating high accuracy in measurement of total protein and fat of preterm and term milk with high precision**
50. FOSS. MilkoScan FT2. [cited 2020 Apr 20]. Available from: <https://www.fossanalytics.com/en/products/milkoscan-ft2>
51. Andersen SH, Lovlund EE, Nygaard EA, et al. Expressing breast milk at home for 24-h periods provides viable samples for macronutrient analysis. *Acta Paediatr Int J Paediatr*. 2015;104:43–46.
52. Jans G, Matthys C, Lannoo M, et al. Breast milk macronutrient composition after bariatric surgery. *Obes Surg*. 2015;25:938–941.
53. Dizdar EA, Sari FN, Degirmencioglu H, et al. Effect of mode of delivery on macronutrient content of breast milk. *J Matern Neonatal Med*. 2014;27:1099–1102.
54. Hsu YC, Chen CH, Lin MC, et al. Changes in preterm breast milk nutrient content in the first month. *Pediatr Neonatol*. 2014;55:449–454.
55. Yang T, Zhang Y, Ning Y, et al. Breast milk macronutrient composition and the associated factors in urban Chinese mothers. *Chin Med J (Engl)*. 2014;127:1721–1725.
56. Mangel L, Ovental A, Batscha N, et al. Higher fat content in breast-milk expressed manually: a randomized trial. *Breastfeed Med*. 2015;10:352–354.
57. Moran-Lev H, Mimouni FB, Ovental A, et al. Circadian macronutrient variations over the first 7 weeks of human milk feeding of preterm infants. *Breastfeed Med*. 2015;10:366–370.
58. Maly J, Burianova I, Vitkova V, et al. Preterm human milk macronutrient concentration is independent of gestational age at birth. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2019;104:F50–F56. Internet]. Available from: <http://fn.bmj.com/lookup/doi/10.1136/archdischild-2016-312572>
59. Hellmuth C, Uhl O, Demmelmair H, et al. The impact of human breast milk components on the infant metabolism. *PLoS One*. 2018;13:1–19.
60. De Luca A, Frasquet-Darrieux M, Gaud MA, et al. Higher leptin but not human milk macronutrient concentration distinguishes normal-weight from obese mothers at 1-month postpartum. *PLoS One*. 2016;11:1–11.
61. Say B, Dizdar EA, Degirmencioglu H, et al. The effect of lactational mastitis on the macronutrient content of breast milk. *Early Hum Dev*. 2016;98:7–9.
62. Kreissl A, Zwiauer V, Repa A, et al. Human Milk Analyser shows that the lactation period affects protein levels in preterm breastmilk. *Acta Paediatr Int J Paediatr*. 2016;105:635–640.
63. De Curtis M, Rigo J. The nutrition of preterm infants. *Early Hum Dev*. 2012;88:2011–2013.
64. Morton J, Wong RJ, Hall JY, et al. Combining hand techniques with electric pumping increases the caloric content of milk in mothers of preterm infants. *J Perinatol*. 2012;32:791–796.
65. Cetinkaya A, Dizdar E, Yarci E, et al. Does circadian variation of mothers affect macronutrients of breast milk? *Am J Perinatol*. 2017;34:693–696.
66. Tomé D, Cordella C, Dib O, et al. Nitrogen and protein content measurement and nitrogen to protein conversion factors for dairy and soy protein-based foods: a systematic review and modelling analysis. Geneva: World Health Organization. 2019.
67. Salcedo J, Gormaz M, López-Mendoza MC, et al. Human milk bactericidal properties: effect of lyophilization and relation to maternal factors and milk components. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2015;60:527–532.
68. García-Lara NR, Escuder-Vieco D, García-Algar O, et al. Effect of freezing time on macronutrients and energy content of breastmilk. *Breastfeed Med*. 2012;7:295–301.
69. Smith RW, Adamkin DH, Farris A, et al. Just add water: accuracy of analysis of diluted human milk samples using mid-infrared spectroscopy. *J Neonatal Perinatal Med*. 2017;10:39–42.
- **Authors determine that 1:2 and 1:3 dilutions of human milk yielded reliable results for protein, fat and lactose when analyzed by mid-infrared spectroscopy**
70. O'Neill EF, Radmacher PG, Sparks B, et al. Creamatocrit analysis of human milk overestimates fat and energy content when compared to a human milk analyzer using mid-infrared spectroscopy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2013;56:569–572.
- **Authors compared Calais Milk Analyzer with creamatocrit. They concluded that creamatocrit appeared to overestimate fat and energy content of human milk samples**
71. Michaelsen KF, Pedersen SB, Skafté L, et al. Infrared analysis for determining macronutrients in human milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1988;7:229–235.
- **Authors evaluated the precision and accuracy of MilkoScan analyzer for measuring protein, fat, carbohydrate, and, indirectly, the energy content of human milk and concluded that it was a valuable method in research and for continuous monitoring of the nutritional values of human milk in milk banks**
72. MIRIS Solutions. The first step in a healthy preterm baby's life is nutrition measure with Miris. And make every drop count. [cited 2019 May 14]. Available from: www.MirisSolutions.com.
73. Subramanian A, Prabhakar V, Rodriguez-Saona L. Analytical Methods. Infrared spectroscopy in dairy analysis. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Second Edition. Academic Press. 2011;115–124.
74. Lonnerdal B, Hernell O. Iron, zinc, copper and selenium status of breast-fed infants and infants fed trace element fortified milk-based infant formula. *Acta Paediatr Int J Paediatr*. 1994;83:367–373.
75. Bourlieu C, Michalski MC. Structure-function relationship of the milk fat globule. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2015;18:118–127.
76. Arslanoglu S, Boquien CY, King C, et al. Fortification of human milk for preterm infants: update and recommendations of the European milk bank association (EMBA) working group on human milk fortification. *Front Pediatr*. 2019;7:1–14.

HIPÒTESI

Després d'un període inicial de nutrició parenteral, l'alimentació enteral del nounat molt prematur s'ofereix en forma de llet, sent la llet de la pròpia mare la millor opció (35), per la seva forta associació en la reducció d'algunes malalties relacionades amb la prematuritat (com l'enterocolitis necrosant) i amb un millor resultat a nivell de neurodesenvolupament (37,42,233). Malgrat tots els beneficis reconeguts de la llet materna, el seu contingut nutricional és insuficient per satisfer les altes demandes dels pacients prematurs estimades per la Societat Europea de Gastroenterologia, Hepatologia i Nutrició Pediàtrica (ESPGHAN) (34), i cal fortificar-la per augmentar la concentració de proteïnes, calci i fòsfor (166).

El contingut de macronutrients de la llet humana és característic però variable. Aquesta variabilitat depèn del temps de lactància (68) i de factors tant materns com neonatals (71,72,78,115,157). La major part de la informació disponible sobre aquest tema prové de parts a terme; només alguns estudis recents exploren la relació entre la composició de la llet prematura i els factors materns, gestacionals i neonatals (72,73,88,90,115,152). Tot i així, la disparitat metodològica i de resultats dificulta l'extracció de conclusions fermes (74).

La variabilitat en la composició de macronutrients de la llet materna pot causar, malgrat la fortificació, dèficits acumulats al llarg del temps en nadons molt prematurs i pot tenir un paper determinant en el creixement i la salut d'aquests nadons (208,234). El fracàs del creixement postnatal és un dels problemes més freqüents dels nadons molt prematurs (22) i s'estima que al voltant del 50% del creixement depèn del suport nutricional (176). Tot i que es postula que la fortificació individualitzada (basada en la quantificació de macronutrients de la llet materna) podria atenuar aquest problema, requereix recursos econòmics i humans molt considerables (171). Disposar d'informació sobre l'impacte de les característiques materns, gestacionals o

HIPÒTESI

neonatal en la composició de macronutrients de la llet podria ajudar a identificar aquelles parelles mare-nadó amb major risc de fracàs del creixement postnatal (24).

La nostra hipòtesi és que certs factors materns, gestacionals i neonatal s'associen a canvis en la composició de macronutrients de la llet materna després d'un part prematur, i aquest canvis poden afectar al creixement i a la salut del nou-nat.

OBJECTIUS

Els objectius primaris d'aquesta tesi doctoral són (corresponents a l'article publicat):

1. Descriure la composició de macronutrients (proteïnes, carbohidrats, greixos) i energia de la llet materna de nounats molt prematurs durant les primeres vuit setmanes de vida
2. Analitzar l'associació entre diferents factors i els canvis en la composició de macronutrients (proteïnes, carbohidrats, greixos) i energia de la llet materna de nounats molt prematurs. Concretament, s'estudiaran:
 - 2.1. El temps des de l'inici de la lactància
 - 2.2. Característiques demogràfiques i de salut de les mares
 - 2.3. Característiques gestacionals com ara la multiplicitat de la gestació i la presència de complicacions a més a més de la prematuritat
 - 2.4. Característiques neonatals, incloent la edat gestacional i el sexe del nadó

Els objectius secundaris d'aquesta tesi doctoral són:

3. Descriure les trajectòries de creixement postnatal durant l'ingrés de una cohort de nounats molt prematurs alimentats fonamentalment amb llet de la seva mare
4. Descriure en detall la nutrició rebuda, i en particular la ingesta enteral de proteïna i energia procedent de la llet, en la cohort de nounats molt prematurs
5. Avaluat si la ingesta proteica i energètica de la nostra cohort compleix amb les recomanacions de la Societat Europea de Gastroenterologia, Hepatologia i Nutrició Pediàtrica (ESPGHAN)
6. Analitzar les associacions que existeixen entre la ingesta enteral de macronutrients i energia de la llet materna dels nounats molt prematurs i el seu creixement postnatal

MATERIAL I MÈTODES

1. DISSENY DE L'ESTUDI

Es va plantejar un estudi observacional de cohorts prospectiu bicèntric. El reclutament de participants i mostres va tenir lloc entre el gener del 2018 i gener del 2020.

Els diferents objectius es van estructurar en quatre dissenys:

- Estudi descriptiu transversal de concentració de macronutrients (globals i en cada setmana)
- Estudi descriptiu longitudinal de l'efecte del temps de lactància sobre la concentració de macronutrients
- Estudi analític observacional cas-control comparant la concentració de macronutrients entre grups definits per la presència/absència d'un determinat factor perinatal
- Estudi longitudinal de cohorts per analitzar l'impacte de la ingesta de macronutrients calculada a partir de les mesures obtingudes en el creixement de nounats molt prematurs

2. POBLACIÓ D'ESTUDI

Es van reclutar de forma consecutiva mares i els seus nadons molt prematurs d'edat gestacional igual o inferior a 32⁰ setmanes, si aquests ingressaven al naixement o durant les primeres 24 hores de vida en les Unitats Neonatals dels centres Hospital Clínic-Seu Maternitat i Hospital Sant Joan de Déu.

L' Hospital Clínic-Seu Maternitat i Hospital Sant Joan de Déu són dos centres de tercer nivell amb un número d'ingressos anuals en la Unitat Neonatal (mitjana dels últims 4 anys) de 470 i 540 respectivament, i un número de pacients molt prematurs (mitjana dels últims 4 anys) de 60/any i 80/any respectivament. Els dos centres formen part de BCNatal (Centre de Medicina Maternofetal i Neonatal de Barcelona) i comparteixen la majoria de protocols i guies clíniques, així com part del personal assistencial.

- Criteris d'inclusió:
 - Mares i els seus nounats molt prematurs d'edat gestacional igual o inferior a 32⁰ setmanes que ingressessin abans de les 24 hores de vida en les Unitats Neonatals dels centres Hospital Clínic-Seu Maternitat i Hospital Sant Joan de Déu
 - Producció de llet materna superior a les necessitats de nutrició enteral del/s nounat/s
- Criteris d'exclusió:
 - Nounats amb malformacions majors, malalties cromosòmiques, genètiques o metabòliques
 - Nounats amb baixa probabilitat de supervivència més enllà de la primera setmana segons criteri clínic.

3. Càlcul de la mida de la mostra

El càlcul de mida de la mostra es va basar en l'objectiu primari de detectar diferències de composició en la llet en associació amb diferents característiques materns i neonatals. Tenint en compte dades prèvies publicades referent a la composició de llet materna prematura i acceptant un risc alfa del 0,05 i un poder estadístic del 80%, vam calcular que necessitaríem una mostra mínima de 33 pacients per grup (en funció de les condicions materns/perinatals) per detectar una diferència de 7 kcal/dl i de 0,15 g/dl de proteïna (ambdues anteriorment demostrades que tenen un impacte en el creixement prematur (235)).

4. RECOLLIDA I ANÀLISI DE MOSTRES DE LLET MATERNA

Es van analitzar mostres representatives de llet materna produïda al llarg de 24 hores i mostres d'extraccions úniques matinals.

La mostra representativa es generava a partir d'un o dos ml de llet de cada una de les extraccions dutes a terme per la mare entre les 10 a.m. d'un dia i les 10 a.m. del dia següent, recomanant-se un mínim de 8 extraccions al dia repartides cada 3 hores tant de dia com de nit. Les extraccions es podien dur a terme mitjançant extracció manual o mitjançant l'ús d'un extractor manual o elèctric. Havien de ser extraccions completes dels dos pits i de mínim 15 minuts de durada. La llet extreta era homogeneïtzada manualment abans de separar la quantitat sol·licitada (1-2 ml) en una xeringa (etiquetada amb data i hora). Les xeringues es conservaven refrigerades a 4°C (no congelades) un màxim de 24 hores. Després d'unificar el contingut de les 8 xeringues s'aconseguia un *pool* representatiu d'entre 8 i 16 ml de llet materna.

Les mares eren instruïdes per a l'extracció, la recol·lecció i la conservació de les mostres representatives de llet materna de forma que podien fer les recollides de forma autònoma. Van rebre informació escrita amb les d'instruccions d'extracció i el calendari personalitzat dels dies que devien fer les recollides.

Per a l'anàlisi dels macronutrients de la llet materna, aquesta s'atemperava lentament a temperatura ambient, posteriorment s'escalfava a 40°C mitjançant plaques tèrmiques i s'homogeneïtzava manualment.

L'anàlisi es va realitzar mitjançant l'analitzador *MIRIS Human Milk Analyzer*[®] (Uppsala, Sweden) que mesura les següents dades:

- Proteïnes totals en g/dl
- Lípids en g/dl

I estima les següents dades:

- Proteïnes reals en g/dl
- Carbohidrats en g/dl
- Energia calculada en kcal/dl

Per a aquest estudi, la proteïna real (reflecteix el nitrogen associat a proteïna) es va estimar restant un teòric 20% de nitrogen no proteic de la proteïna total mesurada (83), i l'energia es va calcular mitjançant la fórmula: $4,4 \text{ kcal} \times \text{g de proteïna} + 9,25 \text{ kcal} \times \text{g de greix} + 4 \text{ kcal} \times \text{g d'hidrats de carboni}$ (84), tal i com té estipulat l'analitzador.

Durant el decurs d'aquesta tesi, la doctoranda va fer una revisió bibliogràfica sobre la precisió per mesurar macronutrients en llet humana de diferents analitzadors d'infrarojos en comparació amb els mètodes clàssics. Es conclou que l'espectroscòpia infraroja pot ser una tecnologia precisa i fiable per avaluar el contingut de macronutrients de la llet humana, especialment per a proteïna total i greix total (236). La revisió (Borràs-Novell *et al.* 2020 titulada *Infrared analyzers for the measurement of breastmilk macronutrient content in the clinical setting*) està inclosa al final de l'apartat Introducció (pàgina 52). Atès que algunes de les limitacions en la lectura sorgeixen en relació amb la manipulació de les mostres, en l'estudi que es presenta es van fer esforços per estandarditzar la recollida i el tractament preanalític tant com fos possible i les mesures es van limitar a dos operadores formades (Cristina Borràs Novell i Miriam López Abad), una per a cada centre.

4.1. *Punts temporals de recollida i anàlisi de llet materna*

Es van recollir mostres representatives de la producció diària de llet en quatre punts temporals, sempre i quan el nadó prosseguís ingressat:

- al final de la primera setmana: entre el 7è i el 10è dia de vida del nounat
- al final de la segona setmana: entre el 14è i 17è dia de vida del nounat
- al final de la quarta setmana: entre el 28è i 31r dia de vida del nounat
- al final de la vuitena setmana: entre el 56è i 59è dia de vida del nounat

Les dues primeres mostres representatives equivaldrien a llet de transició, i les dues darreres equivaldrien a llet més madura. La Figura 6 mostra el calendari de recollida de mostres per una nounats de 28 setmanes de gestació, a mode d'exemple.

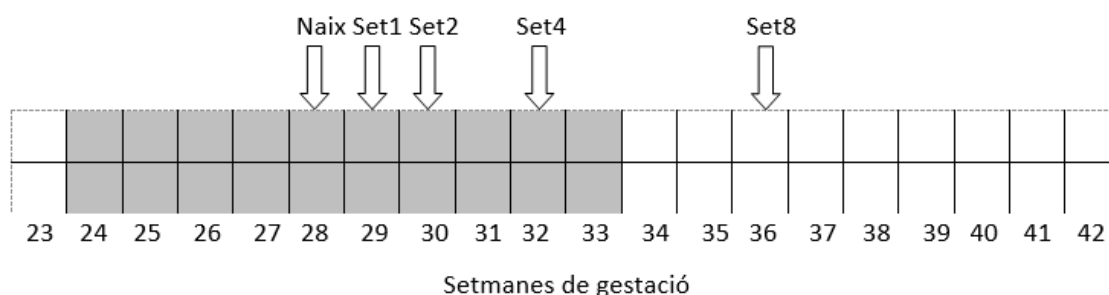


Figura 6. Punts temporals de recollida de llet materna exemplificat en un nadó de 28 setmanes. L'àrea ombrada ressaltava el període d'inclusió i les fletxes mostren el naixement i les recollides de mostres setmanals per a un nadó de 28 setmanes de gestació.

En les setmanes 3, 5, 6, 7 i posteriors (mentre es mantingués l'ingrés del nadó) es va recollir una mostra de llet d'extracció única matinal.

5. VARIABLES ESTUDIADAES REFERENTS A LA MARE

Les dades demogràfiques, antropomètriques, clíniques, obstètriques i de salut general de les mares es van obtenir de les histories clíniques i de l'entrevista que es realitzava a la mare en el moment del reclutament. Particularment, es van recollir:

- Edat materna en anys.
- Índex de Massa Corporal (IMC) a l'inici de la gestació, calculat com la relació entre el pes corporal i l'altura al quadrat (kg/m^2). Es va classificar segons criteris de l'Organització Mundial de la Salut (OMS): per sota de $18,5 \text{ kg}/\text{m}^2$, baix pes; $18,5\text{-}24,9 \text{ kg}/\text{m}^2$, pes normal; $25,0\text{-}29,9 \text{ kg}/\text{m}^2$, sobrepès; $\geq 30 \text{ kg}/\text{m}^2$, obesitat (237).
- Fecundació espontània o obtinguda a través de tècniques de fecundació in vitro.
- Diabetis pregestacional i diabetis gestacional (independentment de tractament amb dieta o insulina). Diagnòstic obstètric segons protocol propi (238): determinació en plasma venós de la glucèmia en dejú i després de l'administració de 100 g de glucosa, als 60, 120 y 180 minuts amb trobada de dos o més valors alterats: Basal: $\geq 105 \text{ mg}/\text{dl}$ ($5,8 \text{ mmol}/\text{l}$), 1h: $\geq 190 \text{ mg}/\text{dl}$ ($10,6 \text{ mmol}/\text{l}$), 2h: $\geq 165 \text{ mg}/\text{dl}$ ($9,2 \text{ mmol}/\text{l}$), 3h: $\geq 145 \text{ mg}/\text{dl}$ ($8,1 \text{ mmol}/\text{l}$).
- Preeclàmpsia i eclàmpsia. Diagnòstic obstètric segons protocol propi (239): Hipertensió arterial major a $140/90 \text{ mmHg}$ i alteració dels factors angiogènics o signes/síntomes d'afectació d'òrgan diana no atribuïbles a un altre diagnòstic més probable.
- Antecedent de cirurgia mamària i tècnica utilitzada.
- Consum de substàncies durant la gestació i la lactància:
 - Tabac (número de cigarrets al dia)
 - Alcohol (si/no)
 - Cafeïna (número de tasses de cafè no descafeïnat al dia)

MATERIAL I MÈTODES

- Número de lactàncies prèvies, duració de la lactància exclusiva i duració total en mesos.
- Gestació simple o múltiple (2 o més fetus).
- Paritat segons TPAL (terme- prematurs- avortaments- nens vius).
- Via de part (vaginal versus cesària), incloent presència de treball de part previ al naixement per cesària definit com a presència de dinàmica uterina regular.

6. VARIABLES ESTUDIADAES REFERENTS AL NOUNAT MOLT PREMATUR

Les parelles mare-nounat molt prematur van ser seguits per l'equip investigador durant l'ingrés al Servei de Neonatologia. Les dades antropomètriques i clíniques dels nounats es van obtenir de les histories clíniques. Per a la mesura del creixement es van recollir:

- Edat gestacional en setmanes. Per a la datació de la gestació es va prendre com a referència la data de la última menstruació. En el cas de discordança entre la data de la última menstruació i l'edat obtinguda a partir de la longitud craneocaudal del fetus en l'ecografia del primer trimestre, es va atorgar més fiabilitat a la darrera i es va corregir la datació de la gestació (240).
- Sexe (masculí versus femení).
- Antropometria: pes en grams, longitud i perímetre cranial en cm.
- Classificació com a nounats amb retràs de creixement intrauterí (RCIU). Diagnòstic segons protocol propi (241), com mostra la taula 7: presència de un pes fetal estimat (PFE) inferior al percentil 3 o inferior al percentil 10 amb disfunció placentària a la ecografia Doppler.

Taula 7. Classificació prenatal de la gravetat del retràs de creixement intrauterí.

Categoria	Característiques
Baix pes per a la edat gestacional	PFE entre P3 i 10 amb Doppler normal
RCIU tipus I	PFE <P3 o ICP <5 o IPACM <5 o IP mitja AU>P95
RCIU tipus II	PFE <P10 + flux diastòlic absent a AU
RCIU tipus III	PFE <P10 + flux revers a AU o IP <i>ductus</i> venós >P95 o flux diastòlic absent a <i>ductus</i> venós
RCIU tipus IV	PFE <P10 + registre cardiotogràfic patològic o flux diastòlic revers en <i>ductus</i> venós

ICP: índex cerebro-placentari, APCM: índex de pulsatilitat de l'artèria cerebral mitja, Aut: artèria uterina, AU: artèria umbilical, IP: índex de pulsatilitat

7. PROTOCOLS DE NUTRICIÓ PARENTERAL I ENTERAL DELS NOUNATS MOLT PREMATURS DELS NOSTRES CENTRES

En els nostres centres, s'indica nutrició parenteral en tots els nounats prematurs de 32⁰ setmanes de gestació o menys amb una composició inicial de 2,5 g/kg de proteïnes, 2 g/kg de lípids i 8,6 g/kg de carbohidrats que s'augmenta progressivament durant la primera setmana de vida, segons les circumstàncies clíniques del pacient, fins a un màxim de 3,5 g/kg de proteïnes (fins a 4 g/kg en el menors a 28 setmanes de gestació), 3 g/kg de lípids (fins a 3,5 g/kg en el menors a 28 setmanes de gestació) i 17 g/kg de carbohidrats.

La nutrició enteral s'inicia tan aviat com el pacient estigui estable amb calostre de la pròpia mare o amb llet de donant si no hi ha llet materna disponible i la família ho autoritza. El pacient es considera estable si: no precisa suport respiratori agressiu (ventilació mecànica amb paràmetres elevats), no presenta necessitats d'oxigen majors a FiO₂ del 40% i no requereix més d'un fàrmac inotròpic o amb dosis majors a 7 mcg/kg/min. Segons el nostre protocol i durant el període de realització de l'estudi, els candidats a llet de donant són els nounats molt prematurs, durant un mes si són menors de 28 setmanes de gestació, i durant una setmana si són menors de 32 setmanes, prèvia firma del consentiment informat. Després d'aquest temps, o bé si els pares no desitgen lactància humana, els pacient són alimentats amb fórmula artificial específica per a nadons prematurs. La nutrició enteral s'augmenta entre 20-30 ml/kg/dia fins a un màxim de 160-180 ml/kg/dia. En el cas de necessitar una restricció hídrica per patologia respiratòria o hemodinàmica, la nutrició enteral s'augmenta fins a un màxim de 145-160 ml/kg/dia. A partir d'una ingesta de 80-100 ml/kg/dia, la llet materna o de donant es fortifica amb PreNAN FM85[®] (Nestlé) a una concentració de 4% (4 grams de fortificant per cada 100 ml de llet materna). Cada gram de PreNAN FM85[®] afegeix 0,4 g de proteïnes, 0,3 g d'hidrats de carboni, 0,2 g de lípids i 4,4 kcal. Si el nadó no presenta un bon guany ponderal, s'incrementa eventualment el fortificant PreNAN FM85[®] al 5% i/o s'afegeix Duocal MCT[®] (Nutricia) a concentració d'1 o 2%.

7.1. Variables estudiades referents a la nutrició del nounat molt prematur

Es va registrar si el pacient va rebre nutrició parenteral o no i la duració d'aquesta. Es van recollir les ingestes enterals diàries en termes de volum, tipus de llet ingerida, tipus i percentatge de fortificant durant els primers 14 dies de vida; i posteriorment, es van recollir aquestes mateixes dades respecte a la ingesta enteral setmanal mitjana fins a l'alta.

La ingesta enteral de macronutrients (proteïnes i energia) de cada pacient es va calcular per a la setmana 1, setmana 2, setmana 4 i la mitjana durant els primers 28 dies de vida. En cas de rebre llet materna, es van utilitzar les mesures de concentració de proteïnes i energia obtingudes amb l'analitzador MIRIS a la setmana 1, 2 i 4 específiques per a cada parella mare-nadó. Si en algun cas no hi havia mostra de llet materna en un punt temporal, la ingesta es va estimar utilitzant els valors de referència de Mimouni *et al.* (68), on la concentració de proteïnes és 2,34 g/dl a la primera setmana, 1,98 g/dl a la segona setmana i 1,60 g/dl a la tercera/quarta setmana i la d'energia és 63,4 kcal/dl a la primera setmana, 69,1 kcal/dl a la segona setmana i 70,9 kcal/dl a la tercera/quarta setmana.

En cas de rebre llet de banc, la ingesta es va estimar utilitzant els valors de referència de Perrin *et al.* (242), on la concentració de proteïnes és 1,2 g/dl i la d'energia és 65 kcal/dl. En aquests càlculs es van incloure les proteïnes i l'energia procedents del fortificant PreNAN FM85[®] de Nestlé que complementa l'alimentació amb llet humana segons la concentració rebuda (si la concentració és del 4%, 1,6 g/dl de proteïnes i 17,6 kcal/dl d'energia), i també es va incloure la suplementació puntual d'algun pacient amb Duocal MCT[®] de Nutricia incorporant 4,92 kcal/g.

En el cas de rebre fórmula artificial es van estimar:

- Per la fórmula Nidina 1[®] de Nestlé[®]: proteïnes 1,2 g/dl, energia 67 kcal/dl
- Per la fórmula Alprem[®] de Nestlé: proteïnes 2 g/dl, energia 73 kcal/dl
- Per la fórmula Alprem Clinic[®] de Nestlé: proteïnes 2,9 g/dl, energia 81 kcal/dl

8. VALORACIÓ DEL CREIXEMENT DEL NOUNAT MOLT PREMATUR

Es van mesurar pes, longitud i perímetre cranial al naixement (longitud i perímetre cranial dins les primeres 72 hores de vida en cas de nounat extremadament prematur), pes diari fins a la recuperació de pes al néixer, i posteriorment pes, longitud i perímetre cranial setmanal (excepte en cas d'instabilitat respiratòria o hemodinàmica que ho desaconsellés) fins a l'alta hospitalària. Els nadons es van pesar sense roba, aproximadament a la mateixa hora del dia, mitjançant bàscules electròniques amb una precisió de 5g. Es van utilitzar tallímetres rígids per mesurar la longitud dels participants. El perímetre cranial es mesurava mitjançant cinta mètrica, col·locant-la en els ossos frontals, per sobre de les celles, i sobre la prominència occipital de la part posterior del cap. Les dades antropomètriques dels nadons que van ser donats d'alta de l'hospital abans de les 36 setmanes d'edat postmenstrual es van recollir gràcies al programa d'atenció domiciliària quan participaven en ell. Es va transformar cada una de les variables antropomètriques en la seva corresponent puntuació Z segons les corbes de referència longitudinals de *The International Fetal and Newborn Growth Standards for the 21st Century (INTERGROWTH-21st)* (243). Els valors clarament erronis (dada incongruent respecte a la mesura prèvia i posterior) van ser exclosos de l'anàlisi.

Es va determinar la pèrdua inicial de pes (percentatge de pèrdua màxima respecte pes al néixer), dies de vida a la que succeïa, i dia de vida de recuperació del pes al néixer (primer dia de tres consecutius amb pes major de pes al néixer).

Segons la definició de l'Acadèmia Americana de Nutrició i Dietètica, la incidència de fracàs de creixement postnatal (en el seu cas, anomenat "malnutrició neonatal") segons pes o longitud es defineix com lleu (descens de 0,8 – 1,2 DE), moderada (descens de >1,2 – 2 DE) o greu (>2 DE) (204).

Prenent com a referència la mencionada classificació, vam considerar *fracàs del creixement postnatal* aquells nadons amb una caiguda de la puntuació Z des del naixement major a 1,2 i la vam classificar segons els següents criteris de gravetat per a cada mida antropomètrica:

- No present o lleu: caiguda de puntuació Z des del naixement menor a 1,2
- Moderada: caiguda de puntuació Z des del naixement entre 1,2 i 2
- Greu: caiguda de puntuació Z des del naixement major a 2

9. VALORACIÓ DE LES COMPLICACIONS I COMORBIDITATS ASSOCIADES A LA PREMATURITAT

Es van considerar les següent comorbidity associades a la prematuritat que s'utilitzen a nivell mundial (Red Nacional SEN1500 a Espanya i Vermont-Oxford Network):

- Enterocolitis necrosant estadi IIA o major segons Bell *et al.* (9)
- Sèpsia nosocomial definida com a presència de signes clínics o analítics compatibles juntament amb hemocultiu positiu més enllà de les 72 hores de vida
- Displàsia broncopulmonar definida com a necessitat d'oxigen a les 36 setmanes d'edat postmenstrual (6)
- Retinopatia del prematur segons la classificació internacional (244)
- *Ductus* arteriós persistent amb criteris clínics i ecogràfics de *ductus* hemodinàmicament significatiu segons protocol propi (245)
- Hemorràgia intraventricular classificada segons Volpe *et al.* (15)
- Leucomalàcia periventricular definida segons de Vries *et al.* (17)

Es van tenir en compte dades referents a maduresa intestinal com: dies per arribar a la nutrició enteral total, dies totals de nutrició parenteral, dies de vida en que es produeix la primera deposició, setmana en que s'arriba al ritme deposicional normal (2 deposicions al dia sense estimulació durant 3 dies seguits) (246).

10. GESTIÓ DE LES DADES I ANÀLISI ESTADÍSTIC

Les dades es van recollir i gestionar en una base creada específicament per a aquest objectiu mitjançant l'eina electrònica REDCap allotjada a l'Hospital Sant Joan de Déu (247). La REDCap és una aplicació segura, que funciona en xarxa. Es va utilitzar per emmagatzemar la informació referent a les variables principals i secundàries de l'estudi. Per tal de què les dades fossin tractades de forma anònima, es va exportar la base amb la utilitat de codificació de dades, sense la inclusió d'identificadors com nom del pacient o número d'història clínica.

Les dades generades es van analitzar amb el programa SPSS (*Social Package for Social Sciences*) v25. La normalitat es va testar mitjançant el test de Kolmogorov–Smirnov i la inspecció visual dels histogrames. La significació estadística es va establir en 0,05. Es van utilitzar les correlacions de Pearson i Spearman per explorar les relacions entre les variables quantitatives. Les diferències entre grups es van analitzar mitjançant tests de chi quadrat per variables categòriques, T de Student o ANOVA per variables contínues amb distribució normal o tests no paramètrics per a variables amb distribució no normal.

Les diferències al llarg del temps en les concentracions de macronutrients es van avaluar mitjançant un model mixt lineal per tenir en compte les mesures repetides i les dades que faltaven, utilitzant una estructura de covariància heterogènia autoregressiva, i el temps com a efecte fix (on els efectes fixos del temps en setmanes eren categòrics).

Per tal d'avaluar l'associació de les condicions materns o perinatals sobre el contingut de macronutrients tot considerant els possibles efectes de confusió, es van utilitzar models de regressió lineal amb la concentració de macronutrients en un moment específic com a variable dependent i les condicions que van assolir significació en l'anàlisi univariant com a variables independents. En quan a, l'associació de la ingesta enteral de proteïnes i energia sobre el creixement, es van utilitzar models de regressió lineal amb el canvi de puntuació Z de pes, longitud i perímetre cranial com a variable

MATERIAL I MÈTODES

dependent i l'edat gestacional, l'antecedent de retràs de creixement intrauterí, el volum i la concentració mitjana de macronutrients del primer mer i el diagnòstic de *ductus* arteriós persistent i displàsia broncopulmonar com a variables independents.

En ambdós casos es va utilitzar regressió lineal amb el mètode de selecció de variables per eliminació "cap enrere", amb un criteri de tall de valor p de 0,100.

11. CONSIDERACIONS ÈTIQUES

L'estudi va ser acceptat pel Comitè d'Ètica en Investigació Clínica de l'Hospital Sant Joan de Déu (PIC-122-16 / PIC-147-17) i de l'Hospital Clínic (HBC/2019/0959), d'acord amb la legislació vigent i es va portar a terme respectant als principis anunciats en la declaració de Helsinki i les guies per a estudis observacionals STROBE (*Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology*) (248).

Es va obtenir consentiment informat de totes les parelles mare-nounat/s participants a l'estudi en el moment de reclutament. El tractament, la comunicació o la cessió de les dades de caràcter personal de tots els subjectes participants s'ajusta al disposat en la Llei Orgànica de Protecció de Caràcter Personal 15/1999, del 13 de desembre, de protecció de dades de caràcter personal, i en el seu reglament de desenvolupament. A partir del 25 de maig de 2018 es va aplicar la nova legislació europea sobre dades personals, en concret el Reglament (UE) 2016/679 del Parlament Europeu i del Consell del 27 d'abril de 2016 de Protecció de Dades (RGPD) (Annexes 6 i 7. Consentiment informat i complement del consentiment informat respecte al maneig de la informació confidencial).

Per motius ètics, si la producció de llet materna no superava les necessitats alimentàries del nounats, no es recollia mostra en el dia específic. Així mateix, donada la seva importància biològica no es va considerar èticament correcte recollir calostre; la primera mostra de llet materna es va recollir entre el 7è i el 10è dia de vida.

12. FINANÇAMENT

Aquest treball forma part del projecte d'Investigació en Salut "*Instituto Nacional Carlos III (Ministerio de Ciencia e Innovación, Gobierno de España)*" titulat *Leche humana: nutrientes y factores bioactivos. Relación con el desarrollo de la microbiota intestinal, el crecimiento y la salud del recién nacido prematuro* de la Dra. Isabel Iglesias Platas amb el suport del "*Plan Nacional en R+D+I (PI 17/00107) de ISCIII (Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación Sanitaria)*", finançat pel Fons de Desenvolupament Regional de la Unió Europea (FEDER).

RESULTATS

1. DESCRIPCIÓ DE LA POBLACIÓ D'ESTUDI

Durant el període d'estudi es van reclutar 172 mares i es va fer seguiment de totes les parelles/triplets mare-nadó/ns fins a l'èxitus o l'alta de la Unitat. Seixanta-vuit mares i 75 recents nascuts van ser reclutats a Hospital Clínic - Seu Maternitat (58,1% de mares i 57,7% de nounats), i 49 mares i 55 recents nascuts van ser reclutats a Hospital Sant Joan de Déu (41,9% de mares i 42,3% de nounats). La Figura 7 mostra el flux de pacients.

El reclutament inicial de l'estudi va ser major, 123 mares i 135 nounats molt prematurs de l'Hospital Clínic – Seu Maternitat. No obstant, en l'anàlisi de les dades de les 1151 mostres de llet materna procedents d'aquestes parelles es va evidenciar un error de lectura de l'analitzador de llet del centre Hospital Clínic – Seu Maternitat que va invalidar 503 mostres (43,7%). Es va sol·licitar una valoració de l'analitzador per part de la casa comercial, i es va detectar que la cubeta s'havia trencat. Totes aquelles mostres de llet materna del centre Hospital Clínic – Seu Maternitat posteriors al 31 de gener del 2019, i les corresponents mares i recents nascuts, van ser excloses pel fet que no es podia assegurar la fiabilitat dels resultats.

Les mostres de llet materna incloses finalment en l'anàlisi estadístic provenien de 117 mares i 130 nounats d'ambdós centres.

RESULTATS

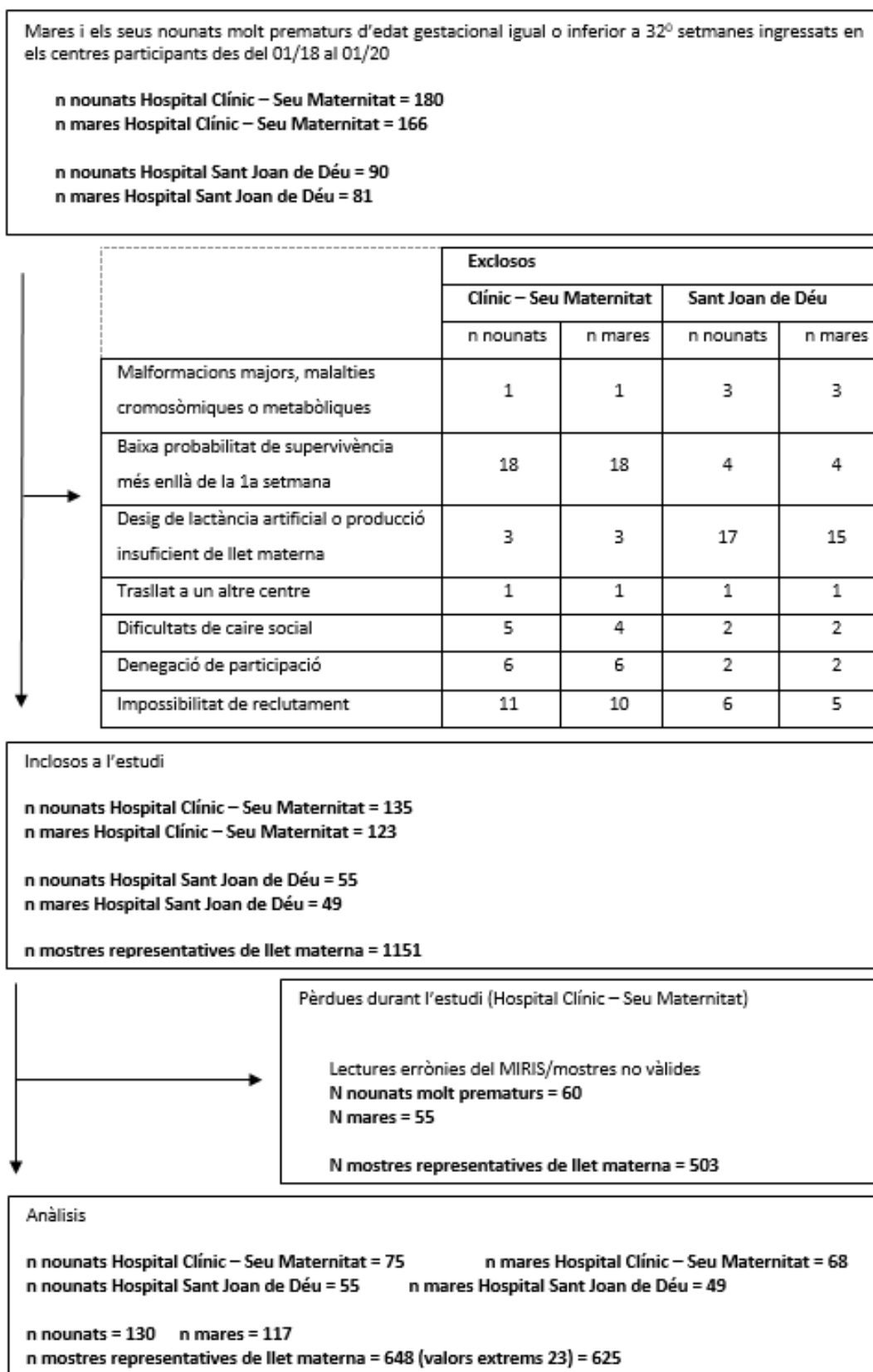


Figura 7. Flux de pacients durant el període d'estudi.

1.1. CARACTERÍSTIQUES MATERNES

1.1.1. Característiques demogràfiques, socioeconòmiques i de salut

L'edat mitjana de les mares participants era $32,5 \pm 5,7$ anys, amb un rang de 17 a 45 anys. Quaranta-cinc mares tenien més de 35 anys (45/117, 38,5%).

L'índex de massa corporal (IMC) mitjà de les mares participants era $24,5 \pm 5,5$ kg/m², amb un rang de 15,8 a 44,9 kg/m². Quaranta mares patien d'excés de pes (IMC \geq 25) (40/110, 36,4%). La Figura 8 mostra les categories d'IMC matern segons l'Organització Mundial de la Salut.

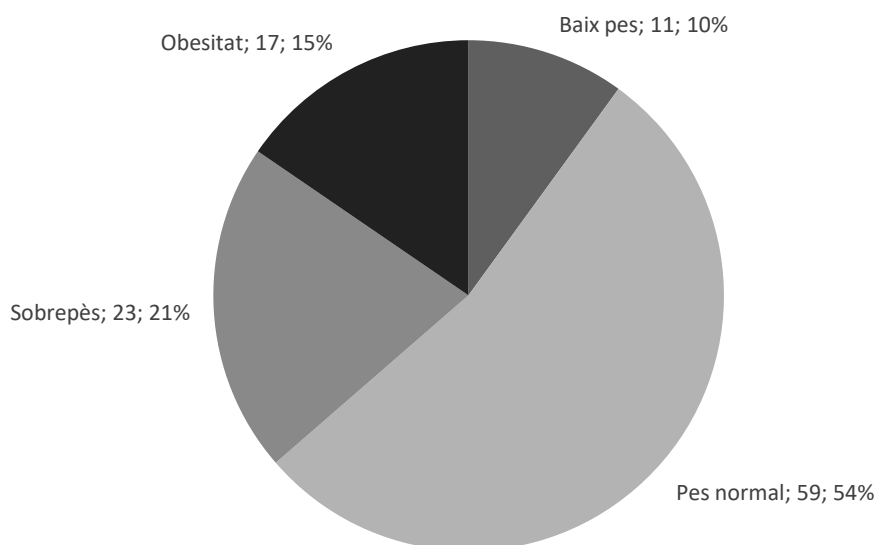


Figura 8. Categories d'IMC de les mares participants segons l'Organització Mundial de la Salut: per sota de 18,5 kg/m², baix pes; 18,5-24,9 kg/m², pes normal; 25,0-29,9 kg/m², sobrepès; \geq 30 kg/m², obesitat (n; %).

RESULTATS

Les mares eren dels següents orígens ètnics:

- Caucàsica 66/116 (56,4%)
- Hispànica 27/116 (23,3%)
- Aràbica 11/116 (9,5%)
- Àsia-Índia 4/116 (3,4%)
- Africana 3/116 (2,6%)
- Àsia-Xina/Japó 3/116 (2,6%)
- Australasia 2/116 (1,7%)

La figura 9 mostra els nivells acadèmics de cada progenitor. El 67,8% (59/87) de les mares i el 89,2% (74/83) dels pares dels nounats participants eren laboralment actius.

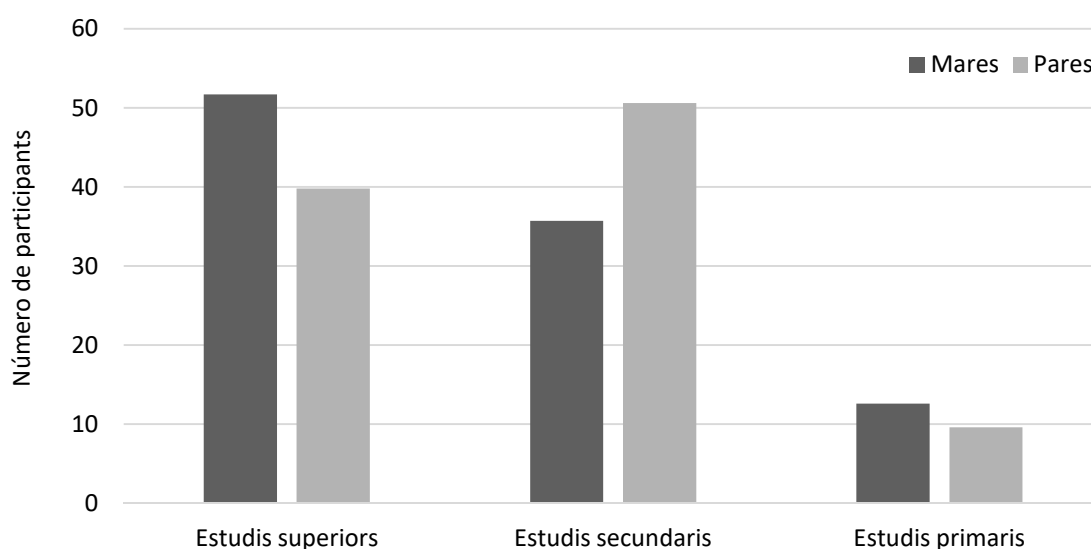


Figura 9. Nivell acadèmic dels progenitors.

Un quart de les mares participants van declarar en la entrevista de reclutament els següents consums de substàncies.

- Tabac: 32/117 (27,4%)
- Alcohol: 6/117 (5,1%)
- Cafè: 56/117 (52,1%) i te: 35/117 (29,9%)
- Cap dels anteriors: 27/117 (23,1%)

El consum mitjà de cafeïna (procedent de cafè i te) era de $86,7 \pm 71$ mg/dia. Divuit mares tenien un consum de cafeïna major a 150 mg/dia (que equivaldria a 2 o més tasses de cafè /dia) i només 2 excedien un consum de 300 mg/dia.

Pel que fa a la presència de patologies de base, 51 mares (51/116, 43,9%) presentaven problemes previs de salut. No hem recollit cap mare afecte de diabetis pregestacional tipus I. Hem recollit una mare (1/117, 0,9%) amb diabetis pregestacional tipus II. Set mares (7/117, 6%) patien de malaltia tiroïdal prèvia a l'embaràs; en el moment d'inclusió totes elles estaven eutiroides; dues rebien tractament amb levotiroxina. Respecte a la resta de mares participants, cap grup era suficientment gran per avaluar l'impacte en la composició de la llet de cadascuna de les condicions prèvies.

1.1.2. Característiques obstètriques

Cinquanta-i-una (51/117, 43,6%) eren primigestes. La figura 10 mostra la paritat de les mares participants. En la nostra cohort un total de 32 gestacions (32/112, 28,6%) van ser fruit de tècniques de reproducció assistida, eminentment per fecundació in vitro.

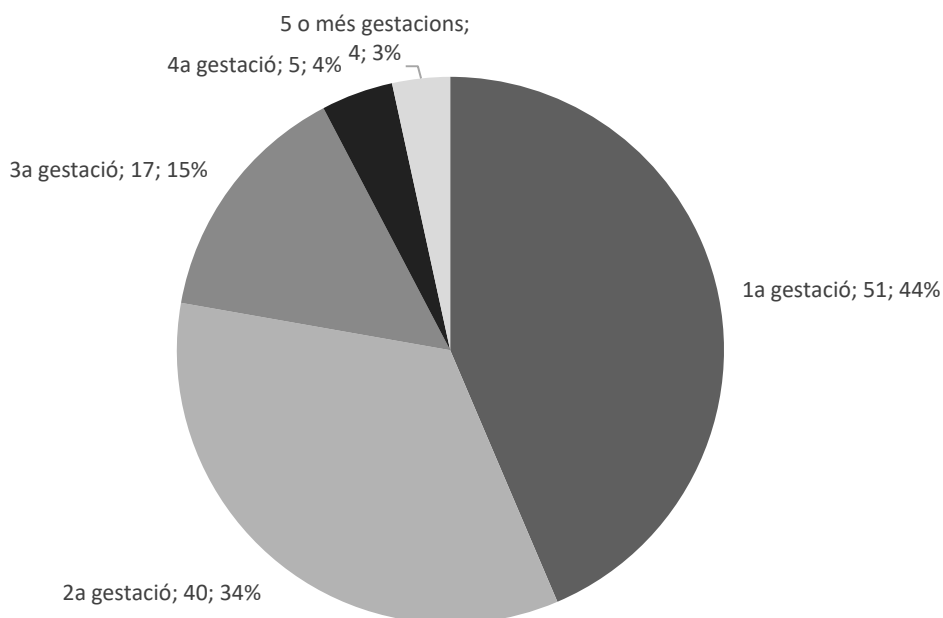


Figura 10. Paritat de les mares participants a l'estudi (n; %).

RESULTATS

Respecte a la via de part, 46,2% (54/117) eren parts vaginals (7,4% dels parts vaginals van ser instrumentats amb fòrceps o *vacuum*), 53,0% (62/117) eren cesàries (40,3% de les cesàries eren electives). Noranta-una mares (91/117, 77,8%) van presentar treball de part.

Les 20 (20/117, 17,1%) gestacions múltiples incloses en l'estudi tenien la següent corialitat:

- Bicorials: 8/20 (40%)
- Monocorial monoamniòtica: 1/20 (5%)
- Monocorial biamniòtica: 10/20 (50%)
- Monocorial triamniòtica: 1/20 (5%)

Vam recollir 11 mares (11/117, 9,4%) amb diabetis gestacional, 8 d'elles en tractament amb dieta i 3 amb insulina. Hi havia 20 mares (20/115, 17,4%) afectes de preeclàmpsia, 25,9% (5/20) d'aquestes mares van desenvolupar una eclàmpsia.

Aproximadament una cinquena part de les mares (19,7%, 23/117) van ser diagnosticades de retràs de creixement intrauterí en la actual gestació, amb els següents tipus (classificació màxima):

- Tipus I: 8/23 (34,8%)
- Tipus II: 1/23 (4,3%)
- Tipus III: 3/23 (13,0%)
- Tipus IV: 11/23 (47,8%)

La gran majoria de mares van rebre almenys una dosi de corticoides per a maduració fetal (112/115, 97,4%) i el 81,7% (94/115) una tanda completa.

1.1.3. Història de la lactància i cirurgia mamària

La lactància en estudi era la primera lactància en el 73,7% (84/114) de les mares. Per les mares que havien lactat prèviament, la mitjana de mesos de lactància prèvia en exclusiva era $4,8 \pm 2,5$ i la mitjana de mesos totals de lactància prèvia era $13,4 \pm 10,7$. El 4,7% (5/114) de les mares van requerir de l'administració d'un galactagog (domperidona o sulpirida) per a optimitzar la producció de llet materna.

Nou mares (9/117, 7,7%) eren portadores de pròtesis mamaríes, i una mare (1/117, 0,9%) havia sigut intervinguda d'una mastectomia parcial per un tumor benigne.

1.2. CARACTERÍSTIQUES GENERALS DELS NOUNATS MOLT PREMATURS

L'edat gestacional mitjana dels nounats era $28,7 \pm 2,3$ setmanes (rang: 23³ - 32⁰) i el pes mitjà de naixement era $1163,3 \pm 382,9$ grams (rang: 460-1900 g). Aproximadament la meitat (69/130, 53,1%) eren nounats masculins. La taula 8 mostra la distribució per edat gestacional dels nounats participants.

RESULTATS

Taula 8. Edats gestacionals dels nounats participants a l'estudi.

Setmana de gestació	Número de pacients	Per grups	Número de pacients	Extrem vs molt prematur	Número de pacients (%)
23	2	23-24	9	23-27	43 (33,1%)
24	7				
25	7	25-26	22		
26	15				
27	12	27-28	30		
28	18				
29	20	29-30	37	28-32	87 (66,9%)
30	17				
31	28	31-32	32		
32	4				
Total	130		130		130

La temperatura mitjana a l'ingrés va ser $36,9 \pm 0,8$ °C (33,9 - 39,1). La mitjana de puntuació CRIB màxima durant les primeres 12 hores de vida va ser 1,0 (rang interquartílic: 0 - 4). L'estada mitjana va ser de $87,8 \pm 25,4$ dies (rang: 41- 142). La taula 9 mostra la prevalença en la nostra població d'estudi de les comorbiditats pròpies de la prematuritat, incloses les metabòliques.

Taula 9. Prevalença de comorbiditats en la nostra cohort de nounats molt prematurs.

	Percentatge (n) Duració: mitjana \pm desviació estàndard (rang)
Necessitat d'administració de surfactant	27,8% (35/126)
• Hores de vida a l'administració	5,5 \pm 8,1 (0 - 30)
Pneumotòrax	3,8% (4/128)
Tractament amb cafeïna terapèutica o profilàctica	96,1% (124/129)
Duració ventilació mecànica (dies)	
• Invasiva	3,2 \pm 8,9 (0 - 47)
• No invasiva (BIPAP-CPAP-GNAF)	25,5 \pm 24,7 (0 -104)
Displàsia broncopulmonar (oxigen a les 36 EPM)	17,2% (22/128)
• Temps de teràpia amb oxigen (dies)	22,7 \pm 35,4 (0 - 153)
• Diürètics	20,0% (26/129)
• Corticoides postnatals	10,8% (14/125)
<i>Ductus</i> arteriós persistent	31,8% (41/129)
• Tractament mèdic	65,9% (27/41)
Enterocolitis necrosant estadi IIA o major	8,5% (11/130)
• Tractament quirúrgic	45,5% (5/11)
Hemorràgia intraventricular \geq grau 2	4,6% (6/130)
Leucomalàcia periventricular	
• Focal	4,6% (6/130)
• Difusa	3,8% (5/130)
Retinopatia del prematur*	33,3% (34/102)
• Tractament amb làser	17,6% (6/34)
<small>*són avaluats 102/130 participants</small>	
Sordesa	0,8% (1/130)
Sèpsia vertical	0,7% (1/127)
Sèpsia nosocomial	19,2% (28/130)
Pacients que han rebut tractament antibiòtic	90% (117/130)
Infeccions virals	10,8% (14/122)
Necessitat d'administració d'hemoderivats	
• Hematies	31,5% (41/130)
• Plaquetes	7,7% (10/130)
• Plasma	1,5% (2/130)
Hiperoglucèmia amb necessitat d' insulina	17,7% (23/130)
Síndrome de realimentació	6,2% (8/130)
Fototeràpia	80% (104/130)
• Duració (hores)	37,6 \pm 22,1 (4-127)
Hiponatremia amb necessitat d'aports de sodi	38,8% (50/129)
• Dies de la suplementació amb sodi	30,1 \pm 23,0 (2-83)

RESULTATS

Tres pacients van ser èxits durant el transcurs de l'estudi després de la primera setmana de vida. El pacient de l'Hospital Clínic-Seu Maternitat va ser èxit als 22 dies de vida per una enterocolitis necrosant (havent participat amb 2 mostres de llet). Els 2 pacients de l'Hospital Sant Joan de Déu van ser èxits als 16 i als 18 dies de vida per una enterocolitis necrosant i per una hipoplàsia pulmonar (havent participat amb 1 i 2 mostres de llet respectivament).

Els pacients van ser donats d'alta a les $37,6 \pm 2,6$ (rang: 32,5 – 46,9) setmanes d'edat postmenstrual amb un pes entre 2326 ± 394 grams (rang: 1482 – 3640 grams). L'edat gestacional d'alta va ser de $37,0 \pm 2,5$ setmanes (rang: 32,6 – 46,9) en el grup de nounats molt prematurs, i de $38,3 \pm 2,7$ setmanes (rang: 33,4 – 46,0) en el grup dels nounats extremadament prematurs.

1.3. CARACTERÍSTIQUES DE LES MOSTRES DE LLET MATERNA

Es van analitzar un total de 648 mostres vàlides de llet materna. Vint-i-tres registres van ser eliminats abans de l'anàlisi estadístic final perquè excedien els límits inferiors o superiors de lectura de cada macronutrient indicats pel fabricant tenint en compte la precisió de l'analitzador que es mostren a la Taula 10 (249). Aquests registres corresponien al 3,5% (23/648) del total de mostres. Setze registres procedien del centre Hospital Clínic – Seu Maternitat (4,6%, 16/349) i 7 del centre Hospital Sant Joan de Déu (2,5%, 7/276). El nombre final de mostres analitzades és 625.

Taula 10. Límits que es van tenir en compte en la eliminació de valors extrems per a cada nutrient.

	Lípids	Hidrats de carboni	Proteïnes totals	Proteïnes reals
Límits definits per la casa comercial (g/dl)	0,6-5,9	4-8	0,6-2,4	0,8-3,0
Precisió	12%	15%	15%	15%
Límits acceptats en aquest estudi (g/dl)	0,53 - 6,61	3,40 - 9,20	0,51 - 2,76	0,68 - 3,45

El nombre mitjà de mostres per mare va ser $5,3 \pm 2,9$ (rang: 1-12). La Taula 11 mostra en detall les mostres de llet materna analitzades per setmana en funció de recollida en de 24 hores (*pool*) o única, i segons l'aparell utilitzat. El 56,6% (354/625) de les mostres es van analitzar en l'aparell del centre Hospital Clínic – Seu Maternitat i el 43,4% (271/625), en l'aparell del centre Hospital Sant Joan de Déu. El 51,0% (319/625) de les mostres corresponen a recollides de 24 hores.

RESULTATS

Taula 11. Número de mostres analitzades per cada aparell per setmanes. HCM: Hospital Clínic-Seu Maternitat, SJD: Hospital Sant Joan de Déu. (n=625)

Setmana	Tipus de mostra	Mostres analitzades a HCM			Mostres analitzades a SJD			Total
		n	% respecte total	% respecte setmana	n	% respecte total	% respecte setmana	
1	<i>Pool</i>	57	9,1	60,6	37	5,9	39,4	94
2	<i>Pool</i>	58	9,3	58,6	41	6,6	41,4	99
3	Única	52	8,3	57,1	39	6,2	42,9	91
4	<i>Pool</i>	50	8,0	59,5	34	5,4	40,5	84
5	Única	29	4,6	50,9	28	4,5	49,1	57
6	Única	28	4,5	51,9	26	4,2	48,1	54
7	Única	22	3,5	53,7	19	3,0	46,3	41
8	<i>Pool</i>	24	3,8	57,1	18	2,9	42,9	42
9	Única	16	2,6	64,0	9	1,4	36,0	25
10	Única	9	1,4	50,0	9	1,4	50,0	18
11	Única	6	1,0	50,0	6	1,0	50,0	12
12	Única	3	0,5	37,5	5	0,8	62,5	8
<i>Total</i>		354	56,6%		271	43,4%		625

2. DESCRIPCIÓ DE LA COMPOSICIÓ DE MACRONUTRIENTS DE LA LLET MATERNA I ASSOCIACIÓ AMB LES SETMANES DE LACTÀNCIA

La Taula 12 recull les característiques de distribució de cada una de les variables de concentració de macronutrients i energia.

Taula 12. Característiques de distribució de cada una de les variables de concentració de macronutrients i energia. (*distribució no normal):

	Totes les mostres analitzades (n=525)		Mostres de recollida 24h (n=319)		Per mare (n=117)	
	Mitjana ± desviació estàndard o mediana (rang interquartílic)*	Mínim - màxim	Mitjana ± desviació estàndard o mediana (rang interquartílic)	Mínim - màxim	Mitjana ± desviació estàndard	Rang
Proteïnes totals	1,4 (1,2 - 1,7)*	0,7 - 3,1	1,6 (1,3 - 1,8)*	0,9 - 3,1	1,5 ± 0,3	0,7 - 3,1
Proteïnes reals	1,1 (1,0 - 1,4)*	0,6 - 2,5	1,3 (1,0 - 1,4)*	0,7 - 2,5	1,2 ± 0,2	0,6 - 2,5
Carbohidrats	7,4 (7,1 - 7,8)*	4,9 - 8,9	7,3 (7,0 - 7,7)*	5,6 - 8,9	7,3 ± 0,3	4,9 - 8,9
Lípids	3,7 (3,1 - 4,4)*	1,1 - 6,6	3,7 ± 1,0	1,1 - 6,5	3,8 ± 0,8	1,1 - 6,6
Energia	70,8 ± 9,4	41,0 - 99,0	76,9 (64,5 - 76,3)*	41,0 - 99,0	70,8 ± 7,9	41,0 - 99,0

Les concentracions de cada macronutrient i d'energia en les mostres de llet materna corresponents a les recollides de 24 hores de les setmanes 1, 2, 4 i 8 es mostren en la taula 13 .

Taula 13. Concentració de macronutrients i d'energia en les mostres de llet materna corresponents a les recollides de 24 hores de les setmanes 1, 2, 4 i 8. (*distribució no normal)

Setmana	Nutrient	Mitjana Mediana*	Desviació estàndard Rang interquartílic *	Rang mínim- màxim
1	Proteïnes totals (g/dl)	1,8*	1,7 – 2,2*	1,2-3,1
	Proteïnes reals (g/dl)	1,4*	1,4 – 1,8*	1,0-2,5
	Carbohidrats (g/dl)	7,2*	6,8 – 7,9*	5,6-8,9
	Lípids (g/dl)	3,9	1,1	1,1-6,4
	Energia (kcal/dl)	73,0	10,8	41-99
2	Proteïnes totals (g/dl)	1,6*	1,5 – 1,8*	1,1-2,4
	Proteïnes reals (g/dl)	1,3*	1,2 – 1,7*	0,9-1,9
	Carbohidrats (g/dl)	7,3*	7,1 – 8,0*	5,9-8,3
	Lípids (g/dl)	3,8	1,0	1,8-6,5
	Energia (kcal/dl)	71,7	9,4	49-99
4	Proteïnes totals (g/dl)	1,3*	1,2 – 1,5*	0,9-1,9
	Proteïnes reals (g/dl)	1,0*	1,0 – 1,2*	0,7-1,5
	Carbohidrats (g/dl)	7,4*	7,1 – 7,8*	6,2-8,9
	Lípids (g/dl)	3,4	0,9	1,9-5,6
	Energia (kcal/dl)	67,2	8,5	48-90
8	Proteïnes totals (g/dl)	1,3*	1,2 – 1,5*	0,9-1,9
	Proteïnes reals (g/dl)	1,0*	1,0 – 1,2*	0,7-1,5
	Carbohidrats (g/dl)	7,4*	7,2 - 7,9*	6,7-8,9
	Lípids (g/dl)	3,7	0,9	1,9-6,1
	Energia (kcal/dl)	70,3	8,8	50-91

RESULTATS

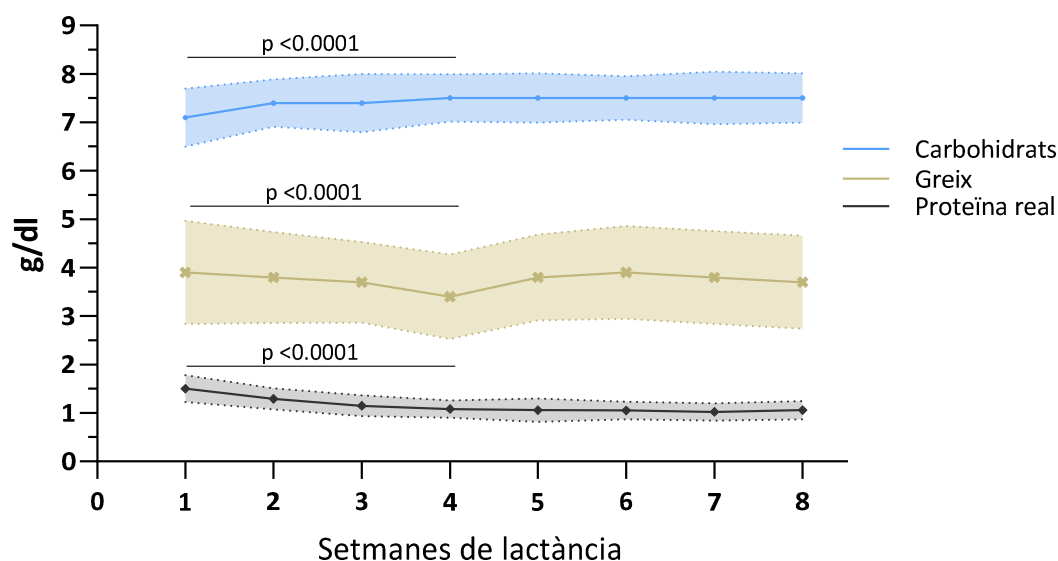


Figura 11. Concentració mitjana (DE) de macronutrients (g/dl) per setmana (n=625).

Es va descriure un descens en la concentració de lípids, proteïnes i energia amb el temps de lactància, i un ascens en la concentració de carbohidrats (Figura 11). Això va ser significatiu de la setmana 1 a la 4 analitzant els resultats de les mostres representatives de la producció de 24 hores (setmana 1, 2 i 4).

Les diferències al llarg del temps en les concentracions de macronutrients es van avaluar mitjançant un model mixt lineal per tenir en compte les mesures repetides i les dades que faltaven, utilitzant una estructura de covariància heterogènia autoregressiva, i el temps com a efecte fix (on els efectes fixos del temps en setmanes eren categòrics). Test tipus III d'efectes fixos per setmana:

- Lípids: F 9,468 ($p < 0,0001$): les diferències eren significatives entre la setmana 1 i 4 ($p < 0,0001$), entre la setmana 2 i 4 ($p = 0,001$), però no entre les setmanes 1 i 2 ($p = 0,199$).
- Proteïnes: F 110,245 ($p < 0,0001$) amb diferències significatives entre setmanes en tots els anàlisis aparellats.

- Carbohidrats: F 16,918 (p<0,0001) amb diferències significatives entre setmanes en tots els anàlisis aparellats.
- Energia: F 11,83 (p<0,0001) amb diferències significatives entre setmanes en tots els anàlisis aparellats.

No vam analitzar les setmanes posteriors a causa d'una mostra més petita i esbiaixada (els pacients encara ingressats a les 8 setmanes corresponien als més immadurs).

2.1. VARIABILITAT INTER I INTRAINDIVIDUAL EN les CONCENTRACIONS DE MACRONUTRIENTS

Els coeficients de variació (CV) intraindividuals i interindividuals per macronutrient de les mares que van proporcionar mostra de llet la setmana 1, 2 i 4 (n=99/117, 84,6%) es mostren en la Taula 14. Els lípids van mostrar els CV més alts, seguits de les proteïnes.

Taula 14. Coeficients de variació (CV) intraindividuals i interindividuals per macronutrient de les mares que van proporcionar mostra de llet la setmana 1, 2 i 4 (n=99)

Nutrient	CV intramare	CV entre mares			
		Global	Setmana 1	Setmana 2	Setmana 4
Proteïnes	15,4%	17,4%	18,6%	17,4%	16,2%
Carbohidrats	3,5%	7,5%	8,8%	6,8%	6,9%
Lípids	20,8%	26,2%	27,2%	25,1%	26,2%
Energia	10,4%	13,5%	14,8%	13,1%	12,7%

RESULTATS

Es va explorar la relació entre les proteïnes i l'energia i l'etapa de lactància (efecte temporal) i entre les proteïnes i l'energia i la identificació de la donant (efecte subjecte) mitjançant un test ANOVA de mesures repetides d'aquestes mares. Tenint en compte els 3 punts temporals (setmana 1, 2 i 4), l'efecte subjecte era major que l'efecte temps en les proteïnes i l'energia (R^2 0,981 vs 0,602 i R^2 0,993 vs 0,146, respectivament), indicant que la variabilitat dins de cada mare és menor que entre les diferents mares.

3. DESCRIPCIÓ DE LA COMPOSICIÓ DE MACRONUTRIENTS DE LA LLET MATERNA I ASSOCIACIÓ AMB LES CARACTERÍSTIQUES MATERNES, GESTACIONALS I NEONATALS

Es van explorar les associacions existents entre la composició de macronutrients de la llet materna i certes característiques materns, gestacionals i neonatals en les mostres representatives de la recollida de 24 hores (n=319).

La composició global durant el primer mes de lactància es va calcular per a proteïnes reals i energia com a mitjana dels resultats de les setmanes 1, 2 i 4.

3.1. ANÀLISI DE L'ASSOCIACIÓ DE LA COMPOSICIÓ DE MACRONUTRIENTS DE LA LLET I LES CARACTERÍSTIQUES MATERNES

3.1.1. Edat materna

Existia una correlació positiva entre l'edat materna i la concentració de proteïnes en la primera setmana (ρ : 0,216, $p=0,037$) i en la segona setmana (ρ : 0,322, $p=0,001$).

Dividint les mares participants entre edat materna avançada i no (punt de tall: 35 anys), les primeres presentaven una major concentració de proteïnes la primera i la segona setmana, i al llarg del primer mes (Taula 15 i Figura 12). No es van detectar diferències significatives en cap altre macronutrient o en el contingut energètic en cap punt temporal.

RESULTATS

Taula 15. Associació de l'edat materna amb el contingut proteic de la llet en les setmanes 1, 2, 4 i 8 i durant el primer mes.

		Edat materna			
		Menor a 35 anys	Major o igual a 35 anys	Valor de p	IC 95% de la diferència
Setmana 1		n = 59	n = 35		
	Proteïnes reals	1,5 ± 0,3	1,6 ± 0,3	0,043	0,005-0,240
Setmana 2		n = 62	n = 37		
	Proteïnes reals	1,3 ± 0,2	1,4 ± 0,2	0,008	0,038-0,217
Setmana 4		n = 54	n = 30		
	Proteïnes reals	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,2	0,357	
1r mes		n = 70	n = 43		
	Proteïnes reals	1,3 ± 0,2	1,4 ± 0,3	0,022	0,023 – 0,211

Unitats dels macronutrients: g/dl. Unitats de l'energia: kcal/dl

Les dades s'expressen com mitjana ± desviació estàndard

Comparació de mitjanes mitjançant test T per a mostres independents.

*Prova no paramètrica si variable amb distribució no normal.

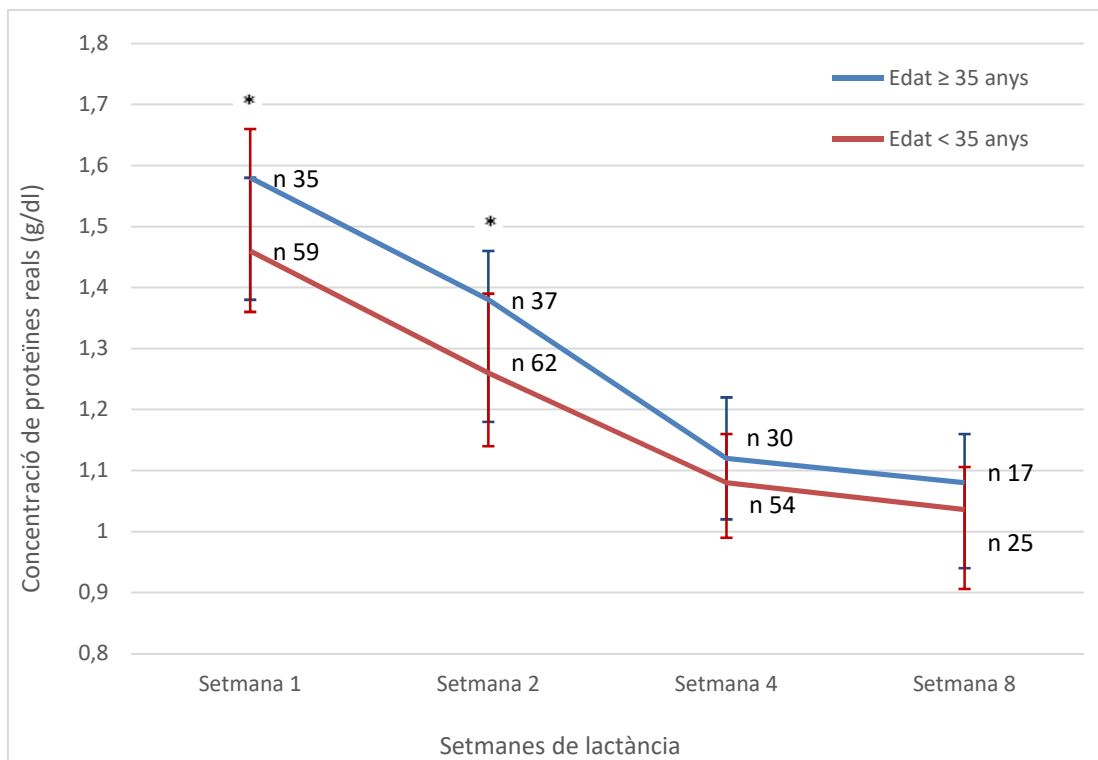


Figura 12. Concentració mitjana (IC95%) de proteïnes reals (g/dl) durant els dos primers mesos entre les mares amb edat avançada (mares amb una edat igual o major a 35 anys) o no.

3.1.2. Índex de massa corporal matern

Les mares afectes de sobrepès o obesitat (amb un IMC ≥ 25 kg/m²) presentaven una major concentració de greix i energia a la quarta setmana i una major concentració de proteïnes a la quarta setmana i al llarg del primer mes (Taula 16 i Figura 13). No vam trobar diferències en els primers punts temporals (setmana 1 i 2).

RESULTATS

Taula 16. Associació de IMC ≥ 25 kg/m² amb la composició de la llet en les setmanes 1, 2, 4 i 8 i durant el primer mes, respecte a les mares amb pes normal. Excloses les mares amb malnutrició.

		Sobrepès o Obesitat (IMC ≥ 25 kg/m ²)			
		No	Si	Valor de p	IC 95% de la diferència
Setmana 4		n = 46	n = 25		
	Proteïnes reals	1,1 \pm 0,2	1,2 \pm 0,2	0,010	0,020 – 0,183
	Greixos	3,2 \pm 0,8	3,7 \pm 0,9	0,018	0,067 – 0,907
	Energia	65,5 \pm 8,3	70,2 \pm 8,5	0,023	0,663 – 8,676
1r mes		n = 58	n = 38		
	Proteïnes reals	1,3 \pm 0,3	1,4 \pm 0,2	0,043	(-0,181) – (0,0179)
	Energia	70,1 \pm 9,1	71,9 \pm 8,2	0,777	

Unitats dels macronutrients: g/dl. Unitats de l'energia: kcal/dl

Les dades s'expressen com mitjana \pm desviació estàndard

Comparació de mitjanes mitjançant test T per a mostres independents. *Prova no paramètrica si variable amb distribució no normal.

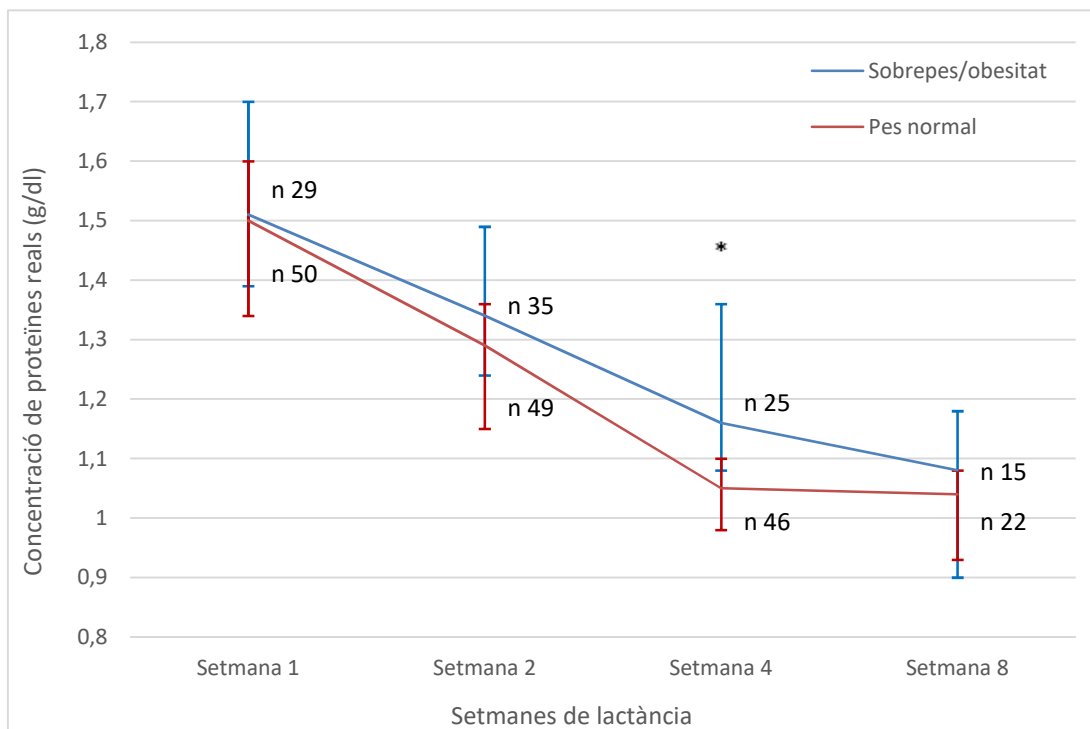


Figura 13. Concentració mitjana de proteïnes (g/dl) (IC95%) durant els dos primers mesos entre les mares amb sobrepès o obesitat ($IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$) i les mares amb pes normal.

3.1.3. Consum de substàncies

En la nostra població d'estudi, les mares que van declarar consum de tabac prèviament a la gestació van ser 32 (32/117, 27,4%), i d'aquestes 10 (10/32, 31,3%) van prosseguir l'hàbit durant la gestació i 7 durant la lactància (7/32, 21,9%).

No hi havia diferències en la composició de la llet entre mares fumadores i no fumadores abans i/o durant l'embaràs; només en mares que mantenen l'hàbit durant la lactància. Així, les mares que fumaven mentre lactaven tenien a la quarta setmana un major contingut lipídic ($4,38 \pm 1,06$ vs $3,34 \pm 0,86$ g/dl, $p=0,037$, IC 95 0,069 - 1,942) i energètic ($75,9 \pm 9,0$ vs $66,8 \pm 8,3$ kcal/dl, $p=0,047$, IC 95 0,122 - 16,988). En la

setmana 4, el número de cigarrets durant la lactància es correlacionava amb un major contingut energètic ($r: 0,555, p=0,019$).

Les mares que van declarar consum de alcohol durant la lactància van ser 6 (6/117, 5,1%). La mida de la mostra no permetia trobar diferències entre les mares que consumien alcohol i les que no. Tampoc vam detectar diferències significatives entre les concentracions de macronutrients i energia entre les mares que consumien més de 150 mg de cafeïna/dia (>2 tasses de cafè /dia) i les que no.

3.1.4. Altres característiques maternes

No vam detectar associacions entre les concentracions de macronutrients i energia en llet i altres característiques maternes (entre els diferents orígens ètnics de les mares, diabetis gestacional o cirurgia mamària).

3.2. ANÀLISI DE L'ASSOCIACIÓ DE LA COMPOSICIÓ DE MACRONUTRIENTS DE LA LLET I CARACTERÍSTIQUES GESTACIONALS

3.2.1. Gestació múltiple

Les mares que havien tingut una gestació múltiple presentaven una menor concentració de proteïnes en cada punt temporal i globalment durant el primer mes, i de greixos i energia a la quarta setmana i al llarg del primer mes (Taula 17 i Figura 14).

Taula 17. Associació de la gestació múltiple amb la composició de la llet en les setmanes 1, 2, 4 i 8 i durant el primer mes.

		Gestació múltiple			
		Si	No	Valor de p	IC 95% de la diferència
Setmana 1		n = 17	n = 76		
	Proteïnes reals	1,4 ± 0,3	1,5 ± 0,3	0,003	0,007 – 0,302
Setmana 2		n = 16	n = 82		
	Proteïnes reals	1,2 ± 0,2	1,3 ± 0,2	0,023	0,020 - 0,261
Setmana 4		n = 16	n = 68		
	Proteïnes reals	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,2	<0,001	0,098 – 0,221
	Greixos	2,9 ± 0,5	3,5 ± 0,9	0,018	0,220 – 0,925
	Energia	62,8 ± 5,3	68,3 ± 8,8	0,001	2,412 – 9,266
1r mes		n = 20	n = 92		
	Proteïnes reals	1,2 ± 0,3	1,4 ± 0,2	0,001	0,004 – 0,244
	Energia	68,4 ± 8,7	71,4 ± 8,7	0,042	(-1,244) – 7,255

Unitats dels macronutrients: g/dl. Unitats de l'energia: kcal/dl

Les dades s'expressen com mitjana ± desviació estàndard

Comparació de mitjanes mitjançant test T per a mostres independents. *Prova no paramètrica si variable amb distribució no normal.

RESULTATS

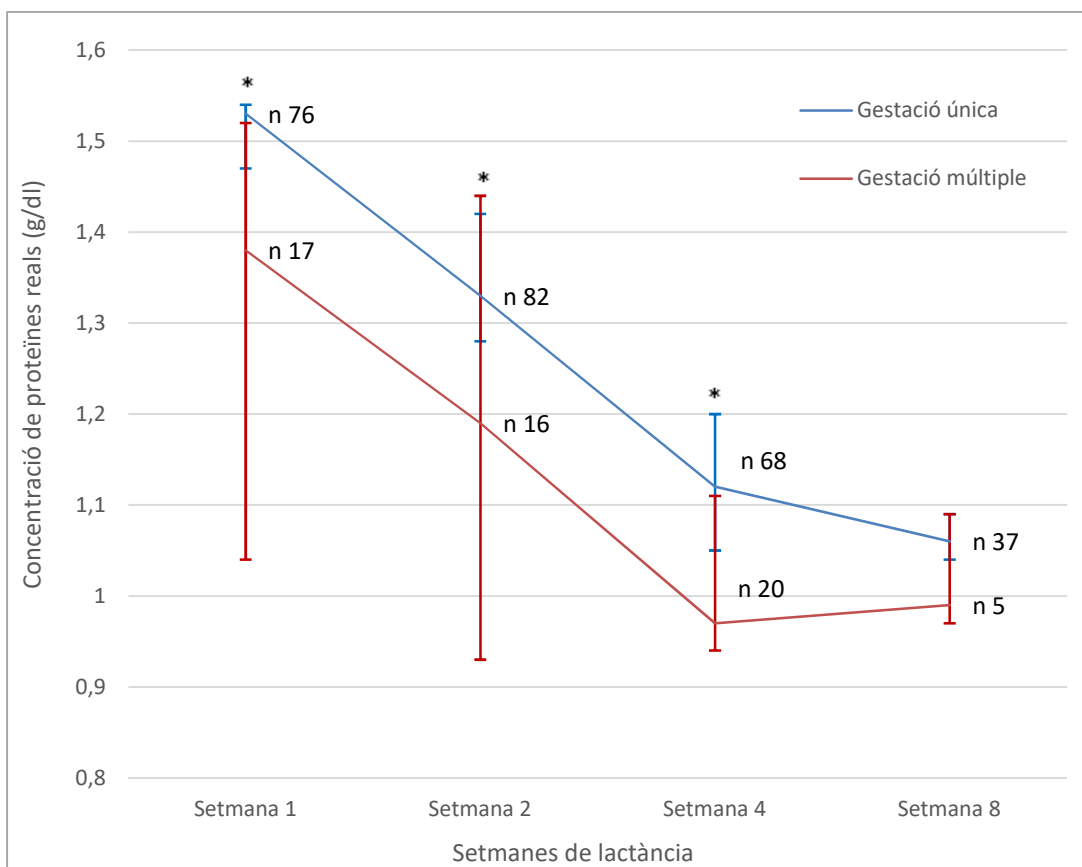


Figura 14. Concentració mitjana de proteïnes reals (g/dl) (IC95%) durant els dos primers mesos entre les mares amb gestació múltiple o no.

3.2.2. Trastorn hipertensiu de l'embaràs

Les mares afectes de preeclàmpsia o eclàmpsia presentaven un menor contingut de greixos i energia a la primera setmana, però en canvi presentaven una major concentració de greixos i energia a la quarta setmana i de proteïnes a la quarta setmana i al primer mes (Taula 18 i Figura 15).

Taula 18. Associació de la malaltia hipertensiva de l'embaràs amb la composició de la llet en les setmanes 1, 2, 4 i 8 i durant el primer mes.

		Malaltia hipertensiva de l'embaràs (preeclàmpsia/eclàmpsia)			
		Si	No	Valor de p	IC 95% de la diferència
Setmana 1		n = 16	n = 76		
	Proteïnes reals	1,6 ± 0,4	1,5 ± 0,3	0,770	
	Greixos	3,4 ± 1,2	4,0 ± 1,0	0,019	0,116 - 1,267
	Carbohidrats	6,8 ± 0,7	7,1 ± 0,6	0,306	
	Energia	66,8 ± 12,6	74,0 ± 10,1	0,014	0,243 - 14,286
Setmana 4		n = 12	n = 71		
	Proteïnes reals	1,2 ± 0,2	1,1 ± 0,2	0,043	(-0,221) - (-0,015)
	Greixos	4,0 ± 1,1	3,3 ± 0,8	0,326	
	Carbohidrats	7,3 ± 0,5	7,5 ± 0,5	0,590	
	Energia	72,3 ± 9,7	66,4 ± 8,2	0,721	
1r mes		n = 19	n = 92		
	Proteïnes reals	1,4 ± 0,4	1,3 ± 0,3	0,039	(-0,239) - (0,040)
	Energia	71,5 ± 11,4	70,8 ± 8,2	0,966	
Setmana 8		n = 6	n = 35		
	Proteïnes reals	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,2	0,905	
	Greixos	4,4 ± 0,3	3,6 ± 1,0	0,023	(-1,233) - (-0,385)
	Carbohidrats	7,3 ± 0,3	7,6 ± 0,5	0,207	
	Energia	75,8 ± 3,0	69,3 ± 9,3	0,023	(-10,531) - (-2,373)

Unitats dels macronutrients: g/dl. Unitats de l'energia: kcal/dl

Les dades s'expressen com mitjana ± desviació estàndard

Comparació de mitjanes mitjançant test T per a mostres independents. *Prova no paramètrica si variable amb distribució no normal.

RESULTATS

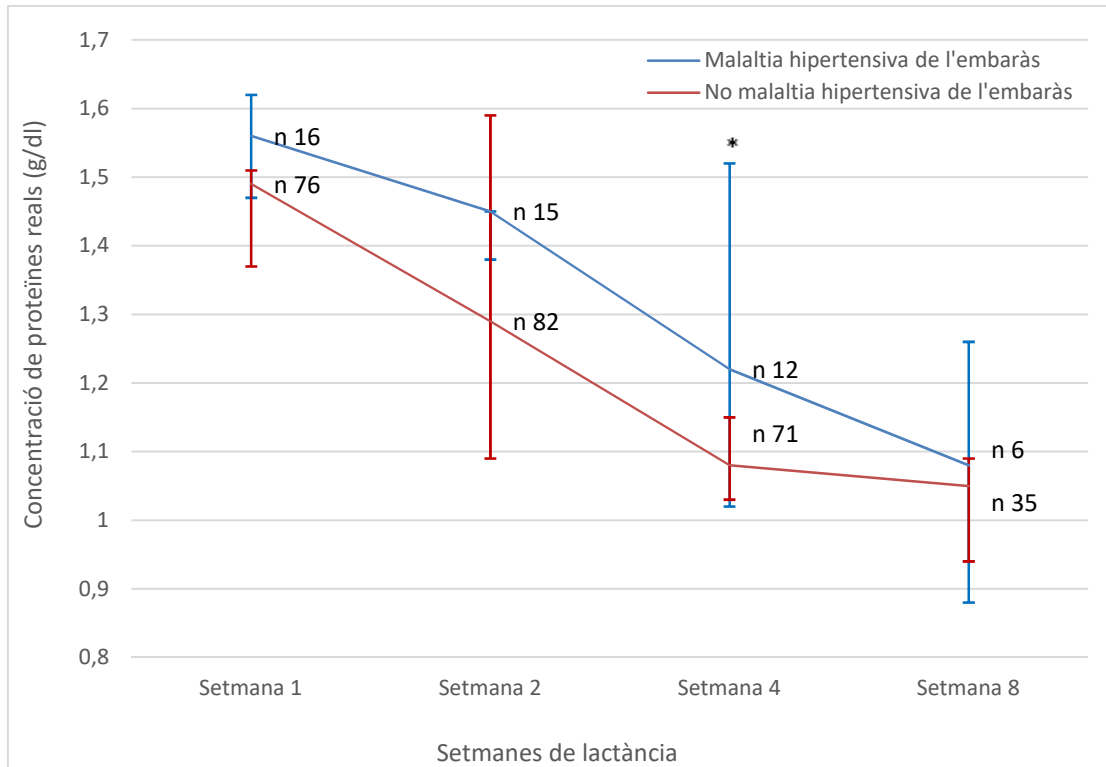


Figura 15. Concentració mitjana de proteïnes reals (g/dl) (IC95%) durant els dos primers mesos entre mares amb malaltia hipertensiva de l'embaràs o no.

3.2.3. Retràs de creixement intrauterí

Les mares que havien patit un retràs de creixement intrauterí durant l'embaràs presentaven un major contingut proteic a la quarta setmana ($1,2 \pm 0,2$ vs $1,1 \pm 0,2$ g/dl, $p=0,010$, IC 95% (-0,230) – (-0,045)) i al llarg del primer mes ($1,4 \pm 0,3$ vs $1,3 \pm 0,3$ g/dl, $p=0,047$, IC 95% (-0,235) – (-0,006)).

3.2.4. Via de part i presència de treball de part

No vam detectar diferències significatives entre les concentracions de macronutrients i energia entre les mares en funció de la via de part (cesària vs vaginal), però sí entre la presència o no de treball de part previ al naixement. Les mares que havien tingut treball previ al naixement del nounat mostraven una major concentració de lípids i energia a la primera setmana i una menor concentració de proteïnes a la quarta setmana (Taula 19). Els nivells de carbohidrats eren estables en el període d'estudi i no hi havia diferències entre grups a la segona setmana.

Taula 19. Associació de la presència de treball de part amb la composició de la llet en les setmanes 1, 2, 4 i 8 i durant el primer mes.

		Presència de treball de part			
		Si	No	Valor de	IC 95% de la diferència
Setmana 1		n = 70	n = 24	p	
	Proteïnes reals	1,5 ± 0,3	1,5 ± 0,4	0,879	
	Greixos	4,1 ± 1,0	3,5 ± 1,0	0,013	(-1,109) – (-0,134)
	Energia	74,5 ± 10,3	68,4 ± 11,2	0,017	(-11,007) – (-1,128)
Setmana 4		n = 66	n = 18		
	Proteïnes reals	1,1 ± 0,2	1,2 ± 0,2	0,004	0,051 – 0,229
	Greixos	3,3 ± 0,9	3,7 ± 0,9	0,083	
	Energia	66,4 ± 8,3	70,1 ± 8,6	0,096	
1r mes		n = 88	n = 25		
	Proteïnes reals	1,3 ± 0,3	1,4 ± 0,3	0,339	
	Energia	70,1 ± 9,7	71,1 ± 8,4	0,687	

Unitats dels macronutrients: g/dl, Unitats de l'energia: kcal/dl

Les dades s'expressen com mitjana ± desviació estàndard

Comparació de mitjanes mitjançant test T per a mostres independents. *Prova no paramètrica si variable amb distribució no normal.

3.2.5. Lactàncies prèvies

Les mares que havien lactat prèviament mostraven un menor contingut proteic a les segona setmana ($1,2 \pm 0,2$ vs $1,3 \pm 0,2$ g/dl, $p=0,008$; IC 95% 0,046 - 0,255) i al llarg del primer mes ($1,3 \pm 0,3$ vs $1,4 \pm 0,2$ g/dl, $p=0,029$; IC 95% (-0,028) – 0,192).

Existia una correlació positiva entre la duració de la lactància prèvia (en mesos) i la concentració mitjana de proteïnes el primer mes de lactància (ρ : 0,436, $p=0,029$).

3.2.6. Altres característiques gestacionals

No vam detectar diferències significatives depenen del número de gestacions prèvies, entre les mares que s'havien sotmès a tècniques de reproducció assistida respecte a les que no ni en funció de si la mare havia rebut una tanda completa, incompleta o no havia rebut corticoides prenatals.

3.3. ANÀLISI DE L'ASSOCIACIÓ DE LA COMPOSICIÓ DE MACRONUTRIENTS DE LA LLET I CARACTERÍSTIQUES NEONATALS

3.3.1. Edat gestacional

Existien varies correlacions dèbils o moderades i de sentit negatiu entre l'edat gestacional i la concentració de macronutrients i energia (Figura 16). Respecte al contingut proteic, l'edat gestacional correlacionava negativament en la setmana 1 (ρ : -0,337, $p < 0,001$), setmana 4 (ρ : -0,217, $p = 0,036$) i durant el primer mes (ρ : -0,307, $p < 0,001$). L'edat gestacional també correlacionava negativament amb el contingut lipídic (r : -0,202, $p = 0,038$) i energètic (r : -0,229, $p = 0,018$) de la primera setmana i amb el contingut energètic (ρ : -0,193, $p = 0,003$) durant el primer mes.

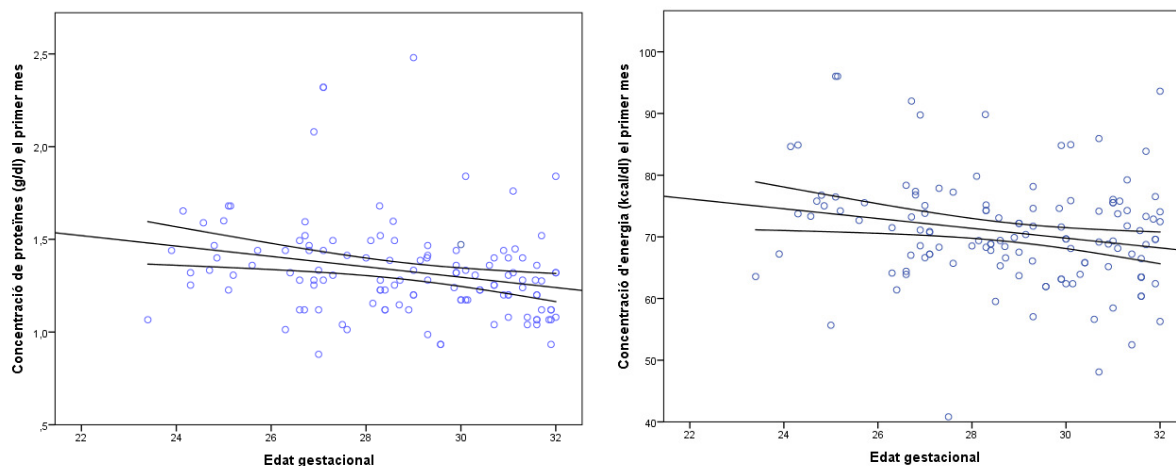


Figura 16. Gràfic de dispersió simple amb ajust de línia de edat gestacional al néixer (setmanes) i concentració de proteïnes (g/dl) durant el primer mes (esquerra) i concentració d'energia (kcal/dl) (dreta).

Vam comparar la concentració de macronutrients en funció de l'edat postnatal i de l'edat postmenstrual en noutats molt prematurs i extremadament prematurs. La llet materna dels noutats molt prematurs tenia major contingut proteic a la mateixa edat postmenstrual (entre les 30 a 34 setmanes) que la del noutats extremadament prematurs (Figura 17), indicant que les diferències en la composició de la llet venen donades pel temps cronològic de lactància i no per l'edat postmenstrual. No hi havia diferències respecte a carbohidrats, lípids i energia.

RESULTATS

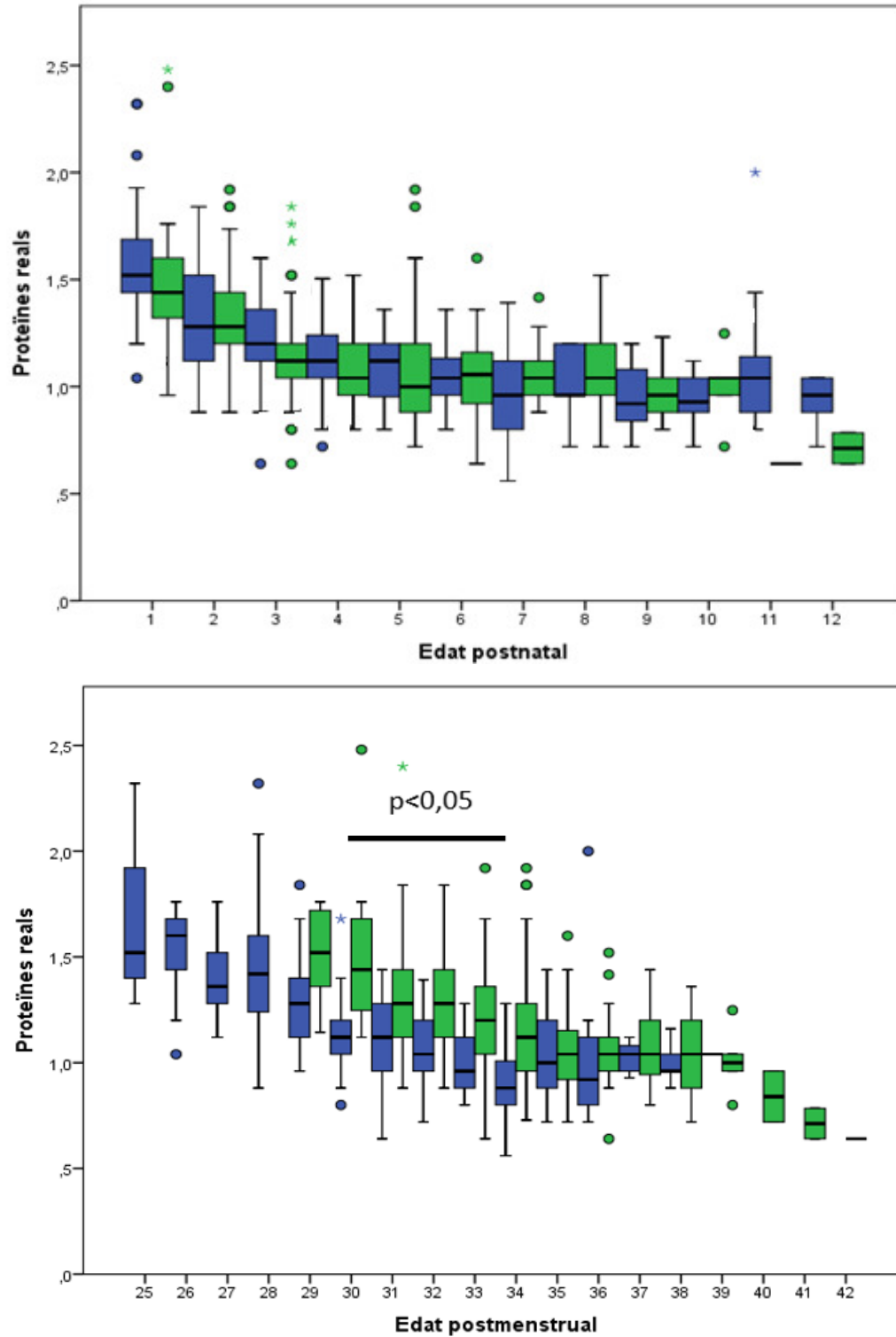


Figura 17. Comparació de la concentració de proteïnes (g/dl) a la mateixa edat postnatal (dies de vida) i postmenstrual (setmanes) entre nounats molt prematurs (verd) i extremadament prematurs (blau). El diagrama de caixes mostra la mitjana, els percentils 25 i 75, el rang (mínim i màxim) i els valors extrems.

3.3.2. Pes al néixer

Existien varies correlacions negatives entre el pes al néixer i la concentració de macronutrients i energia. Respecte al contingut proteic, el pes al néixer es correlacionava negativament amb la setmana 1 (ρ : -0,292, $p=0,002$), setmana 4 (ρ : -0,262, $p=0,011$) i durant el primer mes (ρ : -0,343, $p<0,001$). El pes al néixer també correlacionava negativament amb el contingut energètic (ρ : -0,188, $p=0,035$) durant el primer mes.

3.3.3. Sexe

No vam trobar diferències en la composició de la llet materna entre nounats masculins i femenins.

3.4. ANÀLISI MULTIVARIANT

Vàries de les variables materns, gestacionals i neonatals estudiades actuaven sobre el mateix macronutrient en la mateixa setmana de lactància. A fi de determinar el pes de cada una d'elles es va realitzar un anàlisi multivariant.

- Primera setmana: Els predictors independents del contingut energètic i proteic de la llet van ser, respectivament, l'edat gestacional (R^2 ajustada: 0,051, $p=0,018$) i el trastorn hipertensiu de l'embaràs (R^2 ajustada: 0,055, $p=0,014$).
- Segona setmana: El contingut de proteïna a la setmana 2 es veia influenciat de forma independent per l'edat materna avançada (R^2 ajustada: 0,085, $p=0,002$).
- Quarta setmana: La concentració de proteïna a la setmana 4 es veia influenciat de forma independent per la gestació múltiple, el sobrepès/obesitat materna i la presència de treball de part abans de néixer (R^2 ajustada: 0,326, $p < 0,001$). El contingut energètic a la setmana 4 estava associat amb el sobrepès/obesitat materna i el trastorn hipertensiu de l'embaràs (R^2 ajustada: 0,083, $p=0,016$).

RESULTATS

- Composició global durant el primer mes: El millor model per predir la concentració mitjana de proteïnes durant el primer mes de lactància incloïa l'edat materna, la duració de la gestació i la presència de retràs de creixement intrauterí (R^2 ajustada: 0,113, $p=0,002$).

No hem pogut identificar una combinació de característiques maternes i neonatals que pogués predir variacions en la concentració mitjana d'energia durant el primer mes de lactància.

L'anàlisi multivariant dels factors perinatals que influïen en la composició de la llet materna es mostra en la Taula 20. Globalment els models tenien poca capacitat predictiva, excepte el model per a la concentració de proteïna de la quarta setmana, que explicava aproximadament un terç de la variància.

Taula 20. Anàlisi multivariant dels factors perinatals que influeixen en la composició de la llet materna.

	Nutrient	Millor model		Coeficients	Coeficients β estandarditzats	Valor p ajustat	B (IC 95%)	
		R ² ajustada	Valor p				Límit inferior	Límit superior
1	Proteïna ^a	0,051	0,018	Edat gestacional	-0,247	0,018	-0,058	-0,005
	Energia ^b	0,055	0,014	Trastorn hipertensiu de l'embaràs	-0,257	0,014	-13,023	-1,506
2	Proteïna ^c	0,085	0,002	Edat materna	0,307	0,002	0,005	0,021
4	Proteïna ^d	0,326	<0,001	Gestació múltiple	-0,227	0,024	-0,216	-0,016
				IMC matern ≥ 25	0,286	0,005	0,032	0,171
				Treball de part	-0,447	<0,001	-0,260	-0,103
	Energia ^e	0,083	0,016	IMC matern ≥ 25	0,257	0,023	0,675	8,708
Trastorn hipertensiu de l'embaràs				0,209	0,062	-0,284	10,881	
1r mes	Proteïna ^f	0,113	0,002	Edat materna	0,272	0,004	0,045	0,234
				Retràs de creixement intrauterí	0,209	0,027	0,015	0,236
				Edat gestacional	-0,160	0,090	-0,038	0,003

Factors inicials en els models:

a Proteïna setmana 1: edat materna, embaràs múltiple, edat gestacional

b Energia setmana 1: trastorn hipertensiu de l'embaràs, presència de treball de part, edat gestacional

c Proteïna setmana 2: edat materna, embaràs múltiple, edat gestacional

d Proteïna setmana 4: sobrepès/obesitat materna, embaràs múltiple, trastorn hipertensiu de l'embaràs, retràs de creixement intrauterí, presència de treball de part, edat gestacional

e Energia setmana 4: sobrepès/obesitat materna, embaràs múltiple, trastorn hipertensiu de l'embaràs

f Proteïna durant el primer mes: edat materna, embaràs múltiple, trastorn hipertensiu de l'embaràs, retràs de creixement intrauterí, lactància materna prèvia, edat gestacional

4. DESCRIPCIÓ DEL CREIXEMENT DE LA COHORT DE NOUNATS MOLT PREMATURS

Es van fer un total de 1367 determinacions somatomètriques en els 130 nounats molt prematurs participants.

La mitjana de puntuacions Z de pes, longitud i perímetre cranial al naixement eren pròximes a 0 ($0,14 \pm 1,19$, $0,15 \pm 1,05$ i $0,17 \pm 0,99$ respectivament). La pèrdua mitjana de pes respecte el naixement va ser $9,4 \% \pm 4,9$ (rang: 0,0 – 26,4), i es va produir de mitjana als $4,7 \pm 4,0$ dies de vida (rang: 0,0– 35,0). La recuperació de pes al néixer es va produir de mitjana als $10,7 \pm 5,2$ dies de vida (rang: 0,0 – 43,0).

S'observa un descens progressiu de les puntuacions Z de les tres determinacions somatomètriques, sent la caiguda més acusada durant els primers 28 dies de vida (canvi de puntuació Z respecte al naixement: pes $-1,06 \pm 0,60$, longitud $-0,95 \pm 1,07$, perímetre cranial $-0,84 \pm 0,90$). El pes i la longitud acumulen una davallada de puntuació Z des del naixement fins al moment de l'alta de $-1,45 \pm 0,81$ i de $-1,31 \pm 1,28$ respectivament; mentre que hi ha una discreta millora en la davallada el perímetre cranial ($-0,35 \pm 1,16$). Tots els pacients van presentar una caiguda de puntuació Z de pes, excepte un (que va millorar 0,31 punts).

Els valors de puntuació Z de pes, longitud i perímetre cranial al naixement, als 28 dies de vida, a les 36 setmanes d'EPM i a l'alta, i les respectives caigudes de puntuació Z es mostren en la Taula 21.

Taula 21. Valors de puntuació Z de pes, longitud i perímetre cranial amb les respectives caigudes acumulades des del naixement fins als 28 dies de vida, a les 36 setmanes d'EPM i a l'alta. Els rangs es van expressar com mínim-màxim. DE: desviació estàndard.

	Pes (g)				Longitud (cm)				Perímetre cranial (cm)			
	II	Mitjana ± DE	Rang	Canvi respecte al naixement (mitjana ± DE)	II	Mitjana ± DE	Rang	Canvi respecte al naixement (mitjana ± DE)	II	Mitjana ± DE	Rang	Canvi respecte al naixement (mitjana ± DE)
Naixement	Valor	1163,3 ± 382,9	4600 1900,0	-		37,7 ± 4,0	27,0 49,0	-		25,9 ± 2,7	20,0 31,5	-
	Puntuació Z	0,14 ± 1,19	(-2,82) 2,91	-	120	0,15 ± 1,05	(-3,40) -9,04	-		-0,17 ± 0,99	(-2,76) -2,72	-
28 dies de vida	Valor	1531,6 ± 478,2	6300 2630,0	-		40,7 ± 4,2	29,4 49,0	-		28,2 ± 3,0	21,0 35,5	-
	Puntuació Z	(-0,98) ± 0,85	(-3,2) 1,25	-1,06 ± 0,60	107	(-0,93) ± 1,39	(-5,69) 1,53	-0,95 ± 1,07	111	(-1,03) ± 1,10	(-3,35) -1,90	-0,84 ± 0,90
36 setmanes d'EPM	Valor	2130,6 ± 300,2	1300,0 2770,0	-		44,6 ± 2,4	38,0 49,1	-		34,8 ± 1,4	29,0 35,0	-
	Puntuació Z	(-1,38) ± 0,78	(-3,62) 0,38	-1,11 ± 0,87	82	(-1,17) ± 1,31	(-4,90) -1,15	-0,98 ± 1,17	81	(-0,43) ± 1,08	(-2,64) -2,4	-0,04 ± 1,10
Alta* (només supervivents)	Valor	2525,9 ± 394,0	1482,0 3640,0	-		45,3 ± 2,5	38,0 52,7	-		32,2 ± 1,6	28,5 36,5	-
	Puntuació Z	(1,26) ± 0,94	(4,11) 1,05	-1,45 ± 0,81	127	(1,27) ± 1,61	(5,46) -1,98	-1,31 ± 1,28	127	(0,50) ± 1,13	(3,85) -2,08	-0,35 ± 1,16

RESULTATS

Tot i que els nadons participants van mostrar un progressiu guany de pes en xifres absolutes, la comparació en paral·lel amb la puntuació Z de pes corresponent objectiva com aquesta darrera es va desviant del 0 cap a valors negatius al llarg de les setmanes d'ingrés (Figura 18).

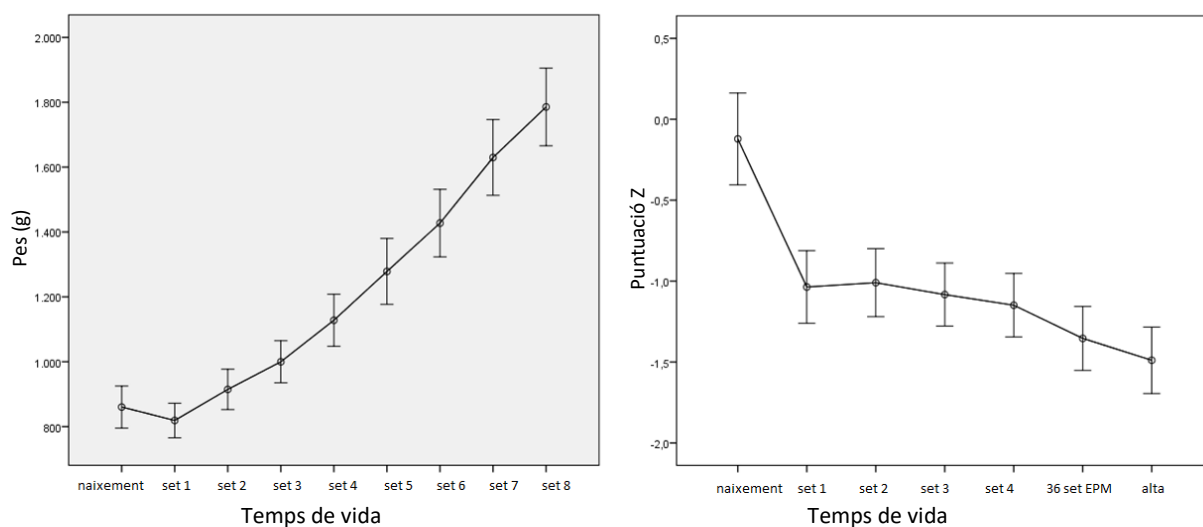


Figura 18. Increment setmanal mitjà de pes (en gris) i puntuació Z mitjana de pes en diferents punts temporals (en blanc) dels participants. Les barres d'error indiquen l'interval de confiança del 95%.

La taula 22, mostra la incidència del fracàs de creixement i la classificació en funció de la caiguda de puntuació Z. La incidència global de fracàs de creixement postnatal a l'alta segons pes va ser de 58,3%, sent greu en el 18,1%.

Taula 22. Incidència de fracàs de creixement, classificació de la gravetat en funció de la caiguda de puntuació Z basada en la Classificació de l'Acadèmia Americana de Nutrició i Dietètica (moderat: entre 1,2 i 2; greu: major a 2).

	Pes					Longitud				
	n	Fracàs n (%)		Grau n (%)		n	Fracàs n (%)		Grau n (%)	
		No	Si	Moderat	Greu		No	Si	Mode rat	Greu
28 dies de vida	118	68 (58,1)	50 (42,4)	45 (38,1)	5 (4,3)	107	73 (68,2)	34 (31,8)	20 (18,7)	14 (13,1)
36 setmanes d'EPM	93	51 (54,8)	42 (45,2)	28 (66,7)	14 (33,3)	82	46 (56,1)	36 (43,9)	22 (61,1)	14 (38,9)
Alta* (només supervivents)	127	53 (41,7)	74 (58,3)	51 (40,2)	23 (18,1)	126	62 (49,2)	64 (50,8)	30 (23,8)	34 (27,0)

*Mediana 36,7 setmanes d'EPM (rang interquartílic 35,9 – 39,3)

4.1. COMPARACIÓ DE L'EVOLUCIÓ DEL CREIXEMENT ENTRE ELS NOUNATS MOLT PREMATURS I EXTREMADAMENT PREMATURS

No hi havia diferències significatives en el percentatge de pèrdua mitjana de pes respecte al naixement entre nounats molt prematurs i extremadament prematurs ($9,8 \pm 4,9$ vs $8,9 \pm 4,6$ %, $p=0,340$), però en els extremadament prematurs el nadir de pes es produïa de forma més tardana ($4,1 \pm 1,8$ vs $6,2 \pm 6,3$ dies de vida, $p=0,048$). No hi havia diferències en el moment en què es superava el pes al néixer entre els dos grups ($10,1 \pm 3,6$ vs $11,9 \pm 7,6$ dies de vida, $p=0,162$).

Respecte a l'edat postmenstrual a alta, els nounats molt prematurs eren donats d'alta significativament de forma més precoç que els extremadament prematurs ($37,0 \pm 2,5$ vs $38,3 \pm 2,7$ setmanes de EPM, $p=0,006$).

RESULTATS

Els nounats extremadament prematurs presentaven una pitjor evolució de creixement durant l'ingrés i l'edat gestacional tenia una correlació directa amb una menor caiguda de puntuació Z de pes ($r\ 0,192$, $p=0,037$) i perímetre cranial ($r\ 0,341$, $p= 0,001$) als 28 dies de vida, i de longitud ($r\ 0,309$, $p=0,001$) a l'alta.

Tot i no existir diferències estadísticament significatives en les puntuacions Z de l'antropometria al naixement entre els nounats molt prematurs i extremadament prematurs, l'evolució posterior va ser diferent. El grup més immadur presentava una major caiguda de puntuació Z de pes als 28 dies de vida i a l'alta respecte al naixement i una caiguda més intensa de la puntuació Z del perímetre cranial als 28 dies de vida. No hi havia diferències en l'evolució de les puntuacions Z de longitud entre ambdós grups.

Els valors de puntuació Z de l'antropometria en els diferents punts temporals i les respectives caigudes de puntuació Z segons l'edat gestacional es mostren en la Taula 23.

l'aula 23. Valors de puntuació Z de pes, longitud i perímetre cranial amb les respectives caigudes acumulades des del naixement fins als 28 dies de vida, a les 36 setmanes d'EPM i a l'alta estratificada segons edat gestacional (molt prematur vs extremadament prematur). Els rangs es van expressar com mínim-màxim. DE: desviació estàndard.

Edat gestacional	Pes (g)				Longitud (cm)				Perímetre cranial (cm)						
	n	Mitjana ± DC	Rang	Caiguda respecte naixement (mitjana ± DE)	Valor p	n	Mitjana ± DC	Rang	Caiguda respecte naixement (mitjana ± DE)	Valor p*	n	Mitjana ± DC	Rang	Caiguda respecte naixement (mitjana ± DE)	Valor p
Naixement	43	0,32 ± 1,20	(-2,41) - 2,91		0,248	42	0,03 ± 0,89	(-1,84) - 2,08		0,916	42	0,21 ± 1,00	(-1,83) - 2,72		0,769
	87	0,06 ± 1,08	(-2,82) - 2,10			87	0,01 ± 1,12	(-3,40) - 3,04			87	0,40 ± 0,96	(-3,33) - 1,53		
28 dies de vida	40	(-0,52) ± 0,76	(-2,21) - 1,13	-1,34 ± 0,62	0,002	34	(-0,71) ± 0,82	(-2,14) - 1,28	-0,84 ± 0,84	0,450	37	(-1,32) ± 1,03	(-2,97) - 1,09	-1,20 ± 1,05	0,014
	77	(-0,90) ± 0,88	(-3,20) - 1,25	-0,98 ± 0,56		73	(-1,04) ± 1,58	(-5,09) - 1,53	-1,01 ± 1,16		74	(-0,89) ± 1,12	(-3,35) - 1,9	-0,69 ± 0,76	
36 setmanes d'EPM	33	(-1,34) ± 0,76	(-3,12) - 0,38	-1,22 ± 1,04	0,413	28	(-1,42) ± 1,44	(-4,90) - 1,09	-1,05 ± 1,32	0,750	27	(-0,55) ± 1,12	(-2,64) - 1,13	-0,06 ± 1,45	0,913
	60	(-1,08) ± 0,80	(-3,62) - 0,00	-1,06 ± 0,67		54	(-1,04) ± 1,23	(-4,32) - 1,15	-0,96 ± 1,01		54	(-0,44) ± 1,06	(-2,64) - 2,40	-0,03 ± 0,88	
Alta* (només supervivents)	41	(-1,38) ± 0,83	(-2,75) - 0,73	-1,77 ± 0,99	0,008	41	(-1,52) ± 1,46	(-5,26) - 1,94	-1,55 ± 1,34	0,140	41	(-0,64) ± 1,17	(-3,85) - 1,62	-0,44 ± 1,32	0,562
	86	(-1,21) ± 0,99	(-4,11) - 1,03	-1,30 ± 0,66		86	(-1,14) ± 1,66	(-5,46) - 1,98	-1,19 ± 1,24		86	(-0,44) ± 1,11	(-3,76) - 2,08	-0,31 ± 1,09	

* nònats molt prematurs 37,0 ± 2,5, nònats extremadament prematurs 38,3 ± 2,7

RESULTATS

La representació gràfica de l'evolució de la puntuació Z de pes segons la prematuritat es pot observar en la Figura 19.

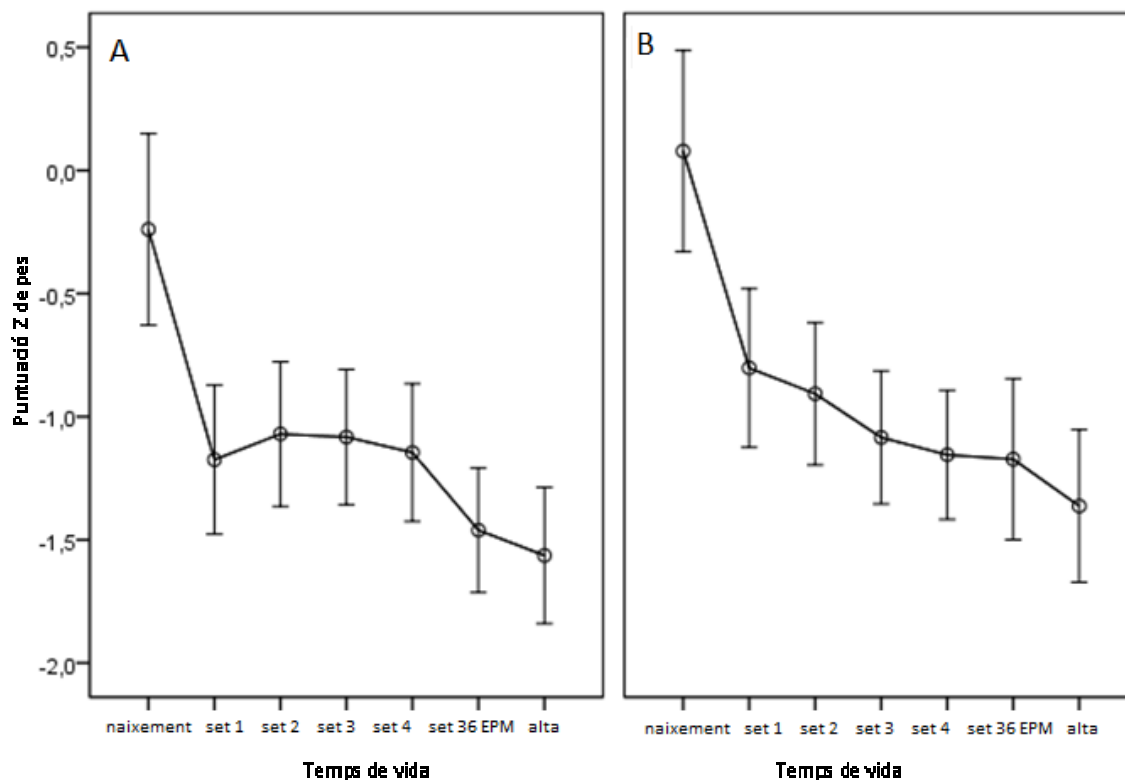


Figura 19. Evolució de la puntuació Z mitjana de pes en diferents punts temporals per a molt prematurs (A) i prematurs extrems (B). Les barres d'error indiquen l'interval de confiança del 95%.

La taula 24 mostra la incidència del fracàs de creixement i la classificació de la gravetat en funció de la caiguda de puntuació Z segons els grups d'edat gestacional.

Els pacients extremadament prematurs tenien major incidència de fracàs de creixement segons pes als 28 dies (33,8 vs 58,5 %, $p=0,008$) i a l'alta (52,3 vs 70,7 %, $p=0,037$). No obstant, basant-se amb la longitud, tenien menor incidència de fracàs de creixement als 28 dies (38,4 vs 17,6 %, $p=0,025$). Les incidències s'igualaven entre grups a l'EPM de 36 setmanes i a l'alta.

Taula 24. Incidència de fracàs de creixement, classificació de la gravetat en funció de la caiguda de puntuació Z basada en la Classificació de l'Acadèmia Americana de Nutrició i Dietètica (moderat: entre 1,2 i 2; greu: major a 2) estratificada segons edat gestacional (molt prematur vs extremadament prematur)].

	Edat gestacional	Pes				Longitud				
		Fracàs n (%)		Grau n (%)	Grau	Fracàs n (%)		Grau n (%)	Grau	
		No	Si	Moderada		No	Si	Moderada		
n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
28 dies de vida	23,3-27,6	41	17 (41,5)	24 (58,5)	19 (46,3)	5 (12,2)	34	28 (82,4)	6 (17,6)	3 (8,8)
	28,0-32,0	77	51 (66,2)	26 (33,8)	26 (33,8)	-	73	45 (61,6)	28 (38,4)	11 (15,1)
36 setmanes d'EPM ^{vs}	23,3-27,6	33	17 (51,5)	16 (48,5)	7 (43,7)	9 (56,3)	28	14 (50,0)	14 (50,0)	9 (64,3)
	28,0-32,0	60	34 (56,7)	26 (43,3)	21 (80,8)	5 (19,2)	54	32 (59,3)	22 (40,7)	13 (59,1)
Alta [*] (només supervivents)	23,3-27,6	41	12 (29,3)	29 (70,7)	16 (39,0)	13 (31,7)	40	16 (40,0)	24 (60,0)	13 (32,5)
	28,0-32,0	86	41 (47,7)	45 (52,3)	35 (40,7)	10 (11,6)	86	46 (53,3)	40 (46,7)	17 (19,8)

* nous molt prematurs 37,0 ± 2,5, nous extremadament prematurs 38,3 ± 2,7

4.2. ANÀLISI SEGONS EL DIAGNÒSTIC DE RETRÀS DE CREIXEMENT INTRAUTERÍ

No hi havia diferències significatives en referència al percentatge de pèrdua de pes ni al moment de màxima pèrdua respecte al naixement entre nounats afectes de retràs de creixement intrauterí i no, però els nounats afectes de retràs de creixement intrauterí recuperaven el pes al néixer de forma més precoç ($8,4 \pm 2,6$ vs $11,1 \pm 5,8$ dies de vida, $p=0,037$). No hi havia diferències entre la edat gestacional mitjana global de la cohort i la d'aquests pacients ($29,2 \pm 1,5$ vs $28,7 \pm 2,5$ setmanes de gestació respectivament, $p=0,319$) ni tampoc en l'EPM a l'alta ($38,0 \pm 2,0$, vs $37,4 \pm 3,0$ setmanes respectivament, $p=0,340$).

La caiguda de puntuació Z de pes era significativament menor en els pacients amb restricció de creixement intrauterí en tots els punt temporals: als 28 dies ($-0,30 \pm 0,52$ vs $-0,87 \pm 0,56$, $p<0,001$), a les 36 setmanes d'EPM ($-0,52 \pm 0,77$ vs $-1,28 \pm 0,78$, $p=0,001$) i a l'alta ($-0,75 \pm 0,54$ vs $-1,46 \pm 0,77$, $p<0,001$).

En els pacients amb restricció del creixement intrauterí, la caiguda de puntuació Z de la longitud a l'alta era major ($-1,79 \pm 1,01$ vs $-1,24 \pm 1,28$, $p=0,035$) i la del perímetre cranial era menor ($0,27 \pm 1,01$ vs $-0,41 \pm 1,21$, $p=0,013$) que en els pacients sense.

La representació gràfica de l'evolució de la puntuació Z de pes segons el diagnòstic de retràs de creixement intrauterí es pot observar en la Figura 20.

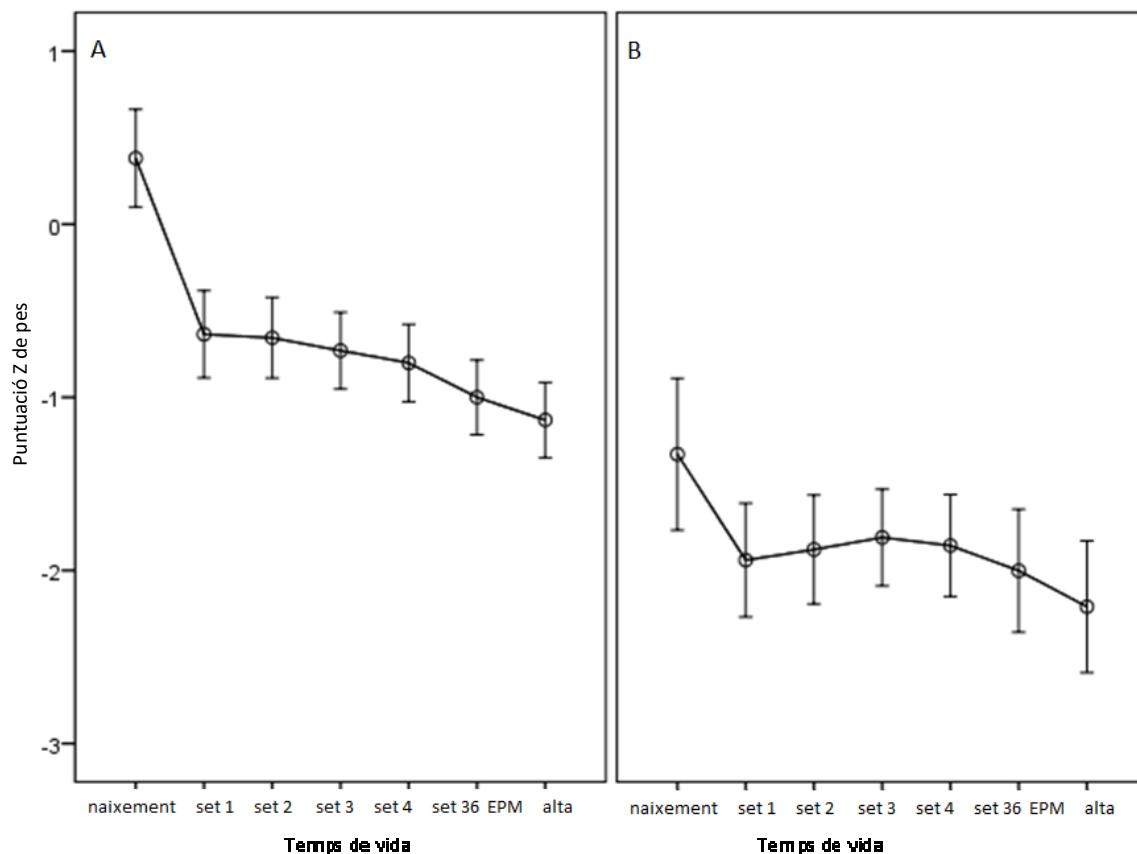


Figura 20. Evolució de la puntuació Z mitjana de pes segons la absència (A) o presència (B) de diagnòstic de retràs de creixement intrauterí. Les barres d'error indiquen l'interval de confiança del 95%.

Els pacients amb restricció de creixement intrauterí tenien menys incidència de fracàs de creixement extrauterí en base al pes en tots els punts temporals estudiats: als 28 dies de vida (4,3 vs 51,8 %, $p < 0,001$), a les 36 setmanes d'EPM (20,0 vs 66,7 %, $p = 0,002$) i a l'alta (26,1 vs 66,3 %, $p = 0,007$). Pel contrari, en base a la longitud, tenien més incidència de fracàs de creixement als 28 dies de vida (59,1 vs 27,0 %, $p < 0,001$), però aquesta diferència desapareixia a la EPM de 36 setmanes i a l'alta.

5. DESCRIPCIÓ DE L'ALIMENTACIÓ REBUDA

5.1. NUTRICIÓ PARENTERAL

Cent quinze pacients (88,4%) van rebre nutrició parenteral durant una mitjana de 9,84 \pm 8,9 dies (rang: 4,0-64,0).

Els quinze pacients que no van rebre parenteral procedien de la seu Hospital Clínic, eren nounats d'entre 30,0 i 32,0 setmanes de gestació amb un pes d'entre 1340g i 1900g, sense antecedent de retràs de creixement intrauterí. La seva pèrdua de pes respecte al naixement va oscil·lar entre 9,0 i 20,4%, sent $>10\%$ en 9 nadons (60%, 9/15), i va ser major respecte als nounats prematurs de les mateixes setmanes de gestació que si van rebre nutrició parenteral ($13,0 \pm 3,4$ vs $9,1 \pm 4,9$ %, $p=0,005$). La caiguda de puntuació Z de pes a l'alta va oscil·lar entre 0,65 i 1,74, sent $>1,2$ en 7 nadons (46,7%, 7/15), sense diferències significatives respecte als nounats prematurs de les mateixes setmanes de gestació que si van rebre nutrició parenteral ($-1,23 \pm 0,35$ vs $-1,21 \pm 0,71$, $p=0,953$).

5.2. NUTRICIÓ ENTERAL

El 65,5% (76/129) dels participants van iniciar l'alimentació enteral tròfica al primer dia de vida, i aquest percentatge s'incrementava a 93,8% (121/129) al segon dia de vida, i a 97,7% al 5è. La Figura 21 mostra l'ascens en el volum de l'alimentació enteral rebuda (ml/kg/dia) i el percentatge de llet materna pròpia durant el primer mes.

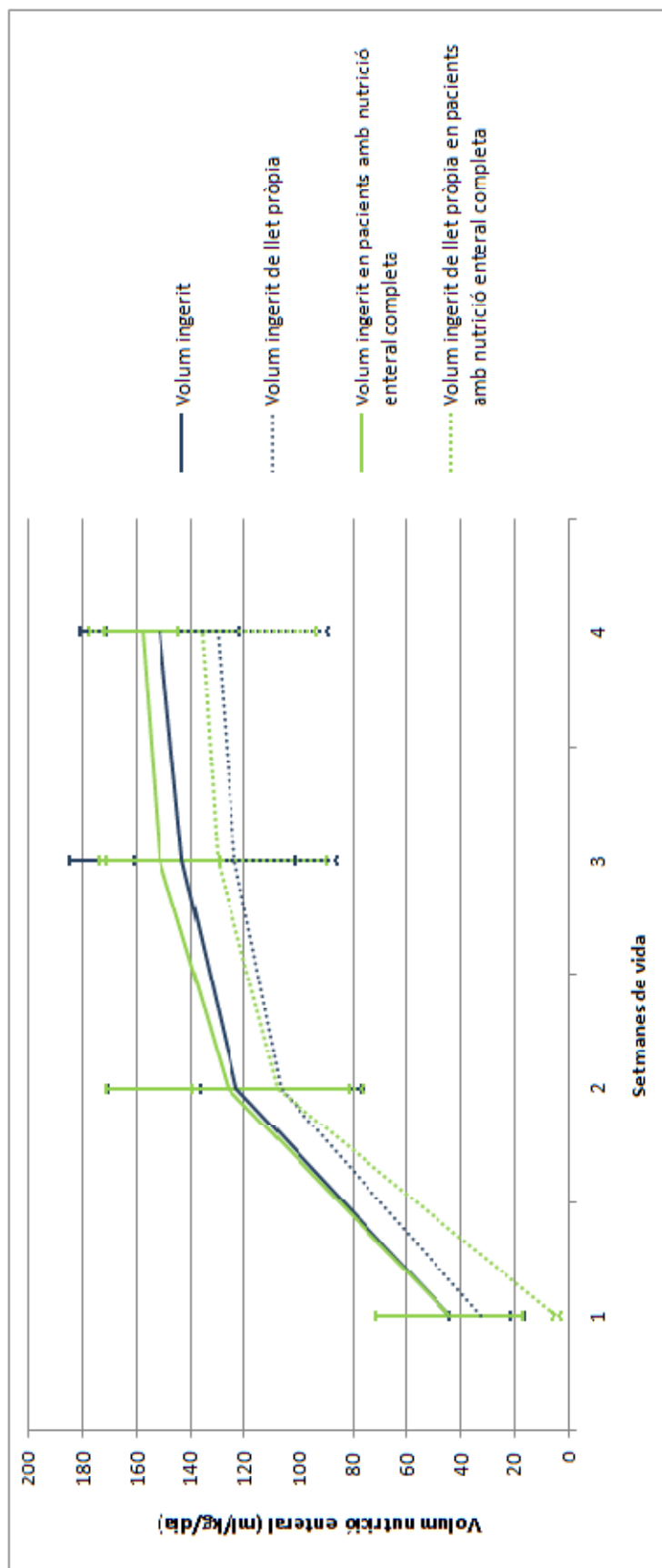


Figura 21. Progressió en la nutrició enteral (volum en ml/kg/dia) i percentatge de llet materna pròpia durant el primer mes. En blau, la cohort completa; en verd, pacients que amb nutrició enteral completa als 28 dies de vida. Les barres d'error indiquen l'interval de confiança del 95%.

La nutrició enteral completa, definida com una nutrició enteral ≥ 120 ml/kg/dia, es va assolir als $8,7 \pm 4,8$ dies de vida de mitjana (rang: 3-37 dies). A la quarta setmana, 111 dels 130 (85,4%) participants havien assolit la nutrició enteral completa. La fortificació de la llet humana es va iniciar als $10,2 \pm 5,5$ dies de vida (rang: 4,0 – 28,0). El 26,9% dels pacient van requerir almenys una interrupció la nutrició enteral (màxim: 6 interrupcions), de $1,8 \pm 4,0$ dies de duració. La primera deposició es va produir de mitjana als $1,6 \pm 1,3$ dies de vida (màxim: 11 dies) i el 63,0% del nounats van adquirir un ritme deposicional normal a la primera setmana de vida (màxim: 6a setmana).

5.3. INGESTA ENTERAL DE MACRONUTRIENTS

Pels càlculs d'ingesta enteral de proteïnes i d'energia dels participants (especificats en Material i Mètodes, a l'apartat Variables estudiades referents a la nutrició del nounat molt prematur), es van utilitzar tant les mesures de la concentració en llet materna de l'analitzador com l'estimació de contingut en les següents proporcions:

- Setmana 1: mesura en 105 casos/129 (81%) i estimació en 24/129 (19%)
- Setmana 2: mesura en 109 casos/128 (85,2%) i estimació en 19/128 (14,8%)
- Setmana 3: mesura en 99 casos/122 (81,1%) i estimació en 23/122 (18,9%)
- Setmana 4: mesura en 93 casos/119 (78,2%) i estimació en 26/119 (21,8%)

Les ingestes enterals de proteïnes i d'energia augmentaven progressivament durant les primeres 3 setmanes a mesura que ho feia el volum de nutrició enteral, i posteriorment s'estabilitzaven. Les recomanacions nutricionals de l'ESPGHAN es van assolir en la ingesta enteral a partir de la tercera setmana, excepte en la ràtio proteïna/energia, tant en tots els participants com aquells amb nutrició enteral total (Taula 25).

Taula 25. Ingesta enteral durant el primer mes de proteïnes (g/kg/dia), energia (kcal/kg/dia) i ràtio proteïnes/energia per setmana, calculada a partir dels volums administrats i la composició macromolecular de la llet i el fortificant. La primera part inclou tots els participants, la segona aquells amb enteral total als 28 dies de vida i la columna de la dreta les recomanacions ESPGHAN com referència.

Ingesta enteral	Set	Tots				Enteral total (≥ 120 ml/kg/dia) a la setmana 4				Recomanacions ESPGHAN
		n	Mitjana	DE	Rang	n	Mitjana	DE	Rang	
Proteïnes (g/kg/dia)	1	129	0,7	0,6	0,01 – 2,6	111	0,7	0,6	0,01- 2,6	4-4,5 g/kg/dia <1000g 3,5-4 g/kg/dia <1800g
	2	129	3,0	1,5	0,0 – 6,6	111	3,0	1,9	0,0- 5,4	
	3	124	3,6	1,2	0,0 – 5,7	110	3,8	0,9	0,3- 5,7	
	4	120	3,5	1,2	0,0 – 6,2	111	3,7	1,0	1,4- 6,2	
Energia (kcal/kg/dia)	1	129	35,7	29,1	1,0 – 153,1	111	35,6	28,5	1,0 - 153,1	110-135 kcal/kg/dia
	2	129	102,8	42,5	0,0 – 175,3	111	105,6	40,5	0,0 – 175,3	
	3	124	123,5	37,8	0,0 – 177,9	110	131,3	26,4	17,8 – 177,9	
	4	120	123,9	30,0	0,0 – 198,8	111	131,6	21,4	79,0 – 192,3	
Ràtio proteïnes/energia (g/100kcal/dia)	1	129	2,2	0,6	1,1 – 4,2	111	2,1	0,6	1,1 – 3,7	3,2 – 4,1 g/100kcal/dia
	2	128	2,8	0,6	1,4 – 4,1	110	2,8	0,5	1,4 – 4,0	
	3	121	2,9	0,4	1,6 – 3,7	110	2,9	0,3	1,6 – 3,7	
	4	118	2,8	0,6	1,2 – 3,6	111	2,8	0,5	1,2 – 3,7	

La ingesta de proteïna i energia a la quarta setmana es correlacionava tant amb el volum ingerit (ρ : 0,701, $p < 0,001$ i ρ : 0,853, $p < 0,001$, respectivament) com amb la concentració de proteïna (ρ : 0,548, $p < 0,001$) i energia (ρ : 0,662, $p < 0,001$), però el

RESULTATS

volum era el factor més determinant. El percentatge de fortificant afegit a la llet humana correlacionava positivament amb la ingesta de proteïnes (ρ : 0,579, $p < 0,001$) a la quarta setmana.

La ingesta mitjana de proteïnes i energia els primers 28 dies de vida també tenien una correlació fortament positiva entre elles (ρ : 0,898, $p < 0,001$), de la mateixa manera que existia una correlació entre la concentració mitjana de proteïnes i d'energia en la llet materna dels primers 28 dies (ρ : 0,428, $p = 0,001$). El volum enteral ingerit correlacionava positivament amb l'edat gestacional (ρ : 0,395, $p < 0,001$) i negativament amb els dies de nutrició parenteral (ρ : -0,880, $p < 0,001$).

6. AFECTACIÓ DEL CREIXEMENT SEGONS LA CONCENTRACIÓ EN LLET MATERNA I LA INGESTA ENTERAL DE PROTEÏNES I ENERGIA

No vam trobar relació entre l'evolució antropomètrica i la ingesta enteral de proteïna, calculada a partir del volum de llet administrat, la concentració de macronutrients de la llet i l'addició de fortificant. Tot i així, el contingut proteic mitjà de la llet materna durant els primers 28 dies es relacionava positivament amb l'evolució ponderal del primer mes (cada gram més de proteïna s'associava a una milloria de 0,54 punts de la puntuació Z de pes [IC95 0,11-0,97, p=0,015]) i a les 36 setmanes d'EPM (cada gram més de proteïna s'associava a una milloria de 0,87 punts de la puntuació Z de pes [IC95 0,24-1,50, p=0,007]). La ingesta proteica mitjana del primer mes es relacionava amb l'evolució cefàlica del primer mes (per cada gram més de proteïna ingerida la puntuació Z del perímetre cranial del primer mes millorava 0,37 punts [IC95 0,09-0,64, p= 0,011]) i a les 36 setmanes EPM (per cada gram més de proteïna ingerida la puntuació Z del perímetre cranial millorava 0,53 punts [IC95 0,15-0,91, p= 0,007]).

La ingesta energètica mitjana del primer mes es relacionava amb l'evolució cefàlica del primer mes (per cada 10 kcal més d'energia ingerida la puntuació Z del perímetre cranial del primer mes millorava 0,13 punts [IC95 0,04-0,22, p= 0,005]) i a les 36 setmanes EPM (per cada 10 kcal més d'energia ingerida la puntuació Z del perímetre cranial a les 36 setmanes EPM millorava 0,15 punts [IC95 0,03-0,27, p= 0,017]).

No hi havia relació entre la concentració de la llet materna o la ingesta de proteïna/energia del primer mes amb l'evolució de la puntuació Z de longitud.

6.1. ANÀLISI MULTIVARIANT

Es van crear models de regressió logística incloent les variables d'ingesta enteral per a determinar la seva associació amb el creixement, ajustant per factors de conclusió.

6.1.1. Als 28 dies de vida

- **Pes:** Els predictors independents del canvi de puntuació Z de pes als 28 dies van ser: el diagnòstic de retràs del creixement intrauterí, la presència d'un *ductus* arteriós persistent, l'edat gestacional al néixer, el centre, la mitjana de volum enteral del primer mes i la mitjana de la concentració proteica de la llet materna del primer mes (R^2 0,42, $p < 0,001$).
- **Longitud:** El canvi de puntuació Z de longitud als 28 dies es veia influenciat de forma independent només per l'edat gestacional (R^2 0,19, $p = 0,025$).
- **Perímetre cranial:** El canvi de puntuació Z de perímetre cranial als 28 dies es veia influenciat de forma independent per la presència d'un *ductus* arteriós persistent i el centre (R^2 0,21, $p = 0,002$).

6.1.2. A les 36 setmanes d'edat postmenstrual i a l'alta

- **Pes:** Els predictors independents del canvi de puntuació Z de pes a les 36 setmanes d'edat postmenstrual van ser: el diagnòstic de retràs del creixement intrauterí, de displàsia broncopulmonar i la presència d'un *ductus* arteriós persistent (R^2 0,34, $p = 0,003$). El millor model per predir el canvi de puntuació Z de pes a l'alta incloïa el diagnòstic de retràs del creixement intrauterí, la presència d'un *ductus* arteriós persistent i l'edat gestacional al néixer (R^2 0,34, $p < 0,001$).
- **Longitud:** No vam poder identificar una combinació de variables que pogués predir variacions en el canvi de puntuació Z de longitud a les 36 setmanes d'edat postmenstrual. El millor model per al canvi de puntuació Z de longitud a l'alta només incloïa la presència d'un *ductus* arteriós persistent (R^2 0,21, $p < 0,001$).
- **Perímetre cranial:** Els predictors independents del canvi de puntuació Z de perímetre cranial van ser: la presència d'un *ductus* arteriós persistent, el centre, la

mitjana de volum enteral del primer mes i la mitjana de la concentració proteica de la llet materna del primer mes (R^2 0,17, $p=0,015$).

L'anàlisi multivariant dels factors nutricionals i no nutricionals que influenciaven en el creixement del nounat molt prematur es mostren en la Taula 26. En resum, després d'ajustar pels factors de confusió que poden influir en el creixement o en l'alimentació per via enteral, aquesta última sols s'associava de manera independent amb menor rellevància amb l'evolució del pes al 2 dies i amb major força amb l'evolució del perímetre cranial a les 36 setmanes d'edat postmenstrual.

RESULTATS

Taula 26. Anàlisi multivariant dels factors nutricionals i no nutricionals que influenciaven en el creixement del nounat molt prematur.

	Punt temporal	Millor model		Variable	coeficients β estandarditzats	Valor p ajustat	B (IC 95%)		
		R ²	Valor p				Límit inferior	Límit superior	
Pes	Als 28 dies	0,42	<0,001	Retràs de creixement intrauterí	0,343	<0,001	0,219	0,745	
				Persistència ductal	-0,248	0,012	-0,562	-0,070	
				Edat gestacional	-0,225	0,024	-0,534	-0,039	
				Volum enteral mitja	-0,294	0,005	-0,013	-0,002	
				Concentració proteica mitjana	0,196	0,032	0,044	0,932	
	A les 36 setmanes	0.34	0.003	Retràs de creixement intrauterí	0,263	0,026	0,060	0,929	
				Persistència ductal	-0,421	0,001	-1,171	-0,297	
				Displàsia broncopulmonar	0,367	0,004	0,246	1,214	
	A l'alta	0.34	<0,001	Retràs de creixement intrauterí	0,259	0,011	0,111	0,844	
				Persistència ductal	-0,345	0,002	-0,924	-0,222	
				Edat gestacional	-0,218	0,042	-0,716	-0,014	
	Longitud	Als 28 dies	0.19	0.025	Edat gestacional	0,247	0,046	0,010	1,084
		A l'alta	0.21	<0,001	Persistència ductal	-0,283	0,018	-1,390	-0,133
	Perímetre cranial	Als 28 dies	0.21	0.002	Persistència ductal	-0,266	0,027	-0,891	-0,056
		A les 36 setmanes	0.17	0.015	Persistència ductal	-0,293	0,031	-1,425	-0,069
Volum enteral mitja					0,314	0,021	0,002	0,029	
Concentració proteica mitjana					0,323	0,010	0,374	2,622	
A l'alta		0.15	0.003	Persistència ductal	-0,268	0,031	-1,192	-0,059	

DISCUSSIÓ

En aquest estudi vam analitzar de manera longitudinal la composició de macronutrients de la llet materna en una cohort de mares de nadons molt prematurs. Vam descriure canvis en la composició associats al pas del temps i a factors tan materns com neonatals, i vam explorar la variabilitat individual. L'anàlisi de la relació del contingut nutricional amb l'evolució somatomètrica dels seus fills va mostrar poca relació amb el creixement postnatal.

1. COMPOSICIÓ DE MACRONUTRIENTS DE LA LLET MATERNA I ASSOCIACIÓ AMB LES SETMANES DE LACTÀNCIA

A l'hora de comparar els nostres resultats de concentració de macronutrients i energia de la llet materna amb altres estudis, ens vam centrar en treballs que analitzaven concentracions al llarg del temps (sempre i quan els autors les especifiquessin), ja que les concentracions globals es poden veure influenciades pel moment de recollida de les mostres i pel període complet de l'estudi.

La concentració mitjana de macronutrients de la llet materna en cas de part prematur canvia amb el temps, i els nostres resultats són congruents amb els resultats publicats per altres autors (68–71,73,88,90,114–117), tal i com mostren els gràfics comparatius corresponents a les Figures 22-25 (de les pàgines 152, 155, 157 i 158). S'inclouen aquells treballs que:

- Determinaven la concentració de macronutrients i energia amb l'analitzador MIRIS *Human Milk Analyzer* (68–71,73,88,90,114–117).
- Estudiaven cohorts de nadons prematurs, en la majoria de casos menors de 32 setmanes de gestació (70,72,73,88,90,117,119); però en d'altres, menors de 34 (115) o de 36 setmanes (68,114,116,152).
- Analitzaven la llet, en la majoria de casos, quasi setmanalment (68,70,72,88,114–117,119,152), excepte en els treballs de Kreissl *et al.* i Bulut *et al.*, que ho feien de forma diària (73,90).

A l'hora de comparar les concentracions de proteïnes és important tenir en compte la diferència entre proteïnes totals i reals, ja que els valors reals poden ser un 20% inferiors dels valors totals. Una dificultat en aquest àrea de coneixement és que no tots els estudis analitzen el mateix tipus de proteïnes i, en alguns casos i tot, no s'especifica si es refereixen a proteïna total o real.

En el nostre estudi, existeix una relació inversa entre contingut de proteïnes i els dies de lactància. Les proteïnes totals varien des de 1,8 g/dl (rang interquartílic: 1,7 – 2,2 g/dl) a la setmana 1 fins a 1,3 g/dl (rang interquartílic: 1,2 – 1,5 g/dl) a la setmana 8 i les proteïnes reals, des de 1,4 g/dl (rang interquartílic: 1,4 – 1,8 g/dl) a la setmana 1 fins a 1,0 g/dl (rang interquartílic: 1,0 – 1,2 g/dl) a la setmana 8; amb un descens significatiu el primer mes i una estabilització entre les 4 i les 8 setmanes (Figura 22). A diferència d'altres estudis publicats prèviament, la nostra mitjana de concentració de proteïnes reals, i consegüentment totals també, es manté permanentment per sobre de 1 g/dl (71,88,90,116).

DISCUSSIÓ

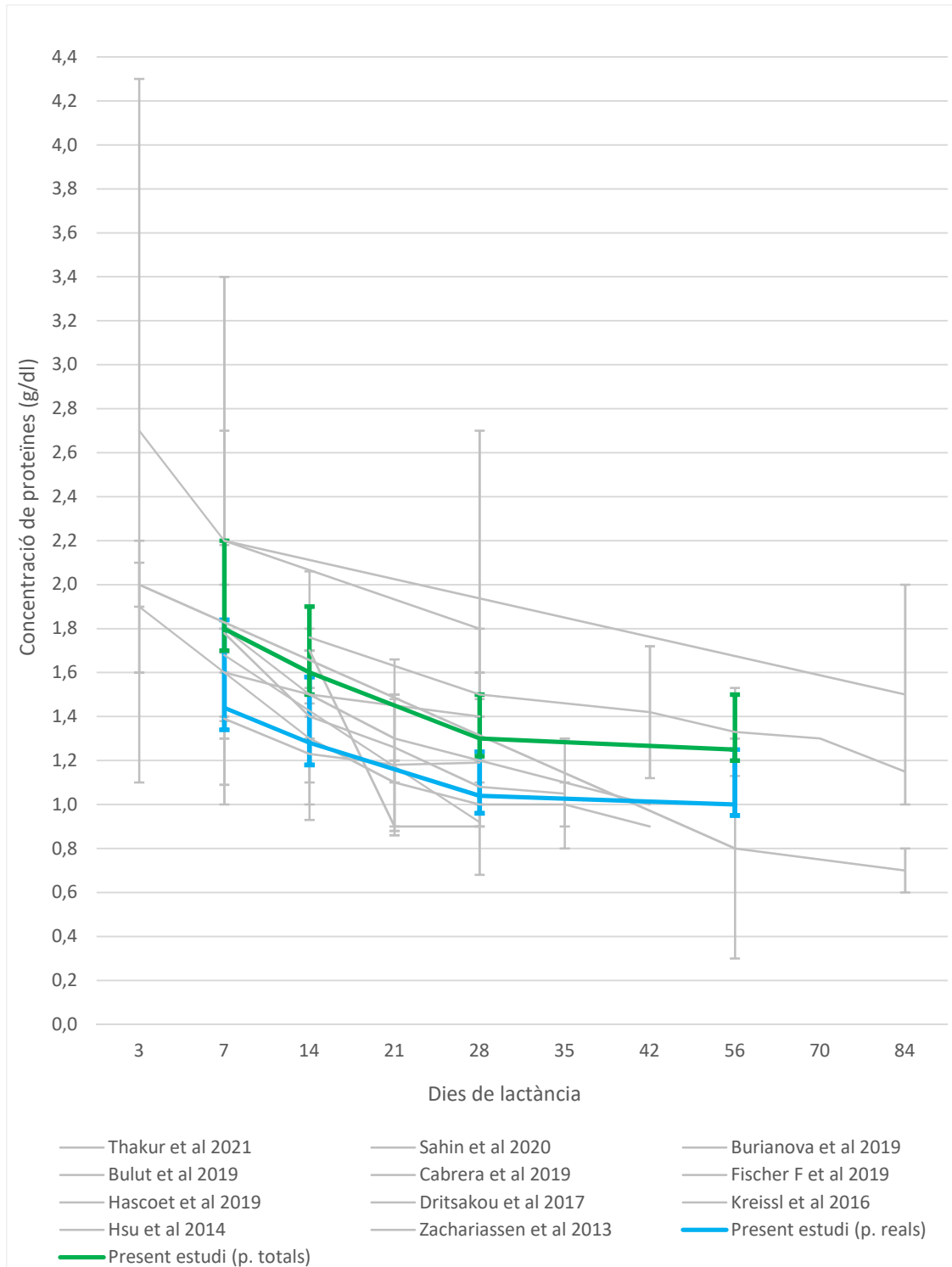


Figura 22. Integració de les dades de concentració de proteïnes (g/dl) segons el temps de lactància després d'un part prematur en treballs que analitzen la llet per infrarojos (68,70–73,88,90,114–117,119) i el present estudi. Les barres d'error mostren l'interval de confiança del 95%.

Tenint en compte les concentracions de proteïnes mitjanes descrites en el nostre estudi - així com en d'altres relacionats - no s'asseguren les recomanacions d'ingesta proteica marcades per la ESPGHAN (34) als volums estàndard. Aquesta troballa recalca la importància de fortificar la llet materna destinada a nadons molt prematurs (114). En una estimació teòrica, partint de les mesures de concentració de macronutrients del nostre treball, i suposant l'ús d'un fortificant d'origen boví al 4%, 3 de cada 4 mostres de llet materna no arriben a cobrir les necessitats proteiques estimades dels pacients de menys de 1000g i 1 de cada 13 mostres dels pacient de menys de 1800g. Arslanoglu *et al.* va comparar la ingesta de proteïnes amb llet materna fortificada entre estimades (assumint una concentració de proteïnes base de 1,5 g/dl) i calculades en base a la concentració real de macronutrients, observant una permanent disminució en aquestes darreres entre 0,5 i 0,8 g/dl (250). Basant-se en estudis realitzats fa varies dècades, on es va observar que ingestes proteiques molt elevades podien ser perilloses pels nounats prematurs, el contingut proteic i lipídic dels fortificants estàndards es va mantenir relativament baix (251); no obstant, els fortificant de nova generació tenen un major contingut proteic i lipídic que permeten millors provisions nutricionals. Tot i això, sembla que amb la fortificació estàndard actual segueixen existint pacients en els què no arribem als alts requeriments proteics en plena fase de creixement (103,252).

Un segon punt a destacar és que a partir de la setmana 8 s'observa que la concentració de proteïna cau per sota de 1 gr/dl en el 36,2% de mares (cap per sota de 0,5 g/dl). Tenint en compte que les mostres en aquest punt temporal correspondrien a mares de pacients encara ingressats, bé per ser nadons més immadurs (i per tant d'una menor edat postmenstrual en aquell moment) o bé per ser nadons amb un estat de salut més delicat, fa que ens qüestionem si les seves altes necessitats quedarien ben cobertes donat el progressiu canvi en la composició de la llet. Si aquesta evolució de la concentració de macronutrients fos concordant amb les mares de prematurs que ja han marxat a casa les 8 setmanes, podria suposar una disminució mantinguda d'ingesta de proteïnes dels alimentats, segons els estàndards, amb lactància materna exclusiva (88). La fortificació a domicili és un tema controvertit, hi ha poca bibliografia al respecte i sorgeixen dubtes sobre com es podria organitzar logísticament, quins controls requeririen els nadons i fins quan seria adequat mantenir-la. El document de

posicionament de la ESPGHAN va avaluar assaigs aleatoris publicats abans del 2004 i va concloure que es podria mantenir la fortificació fins a les 40 setmanes d'edat postmenstrual – i possiblement fins a les 52 quan els nadons eren petits per a l'edat gestacional a l'alta (253). Dos assajos clínics que van avaluar la fortificació després de l'alta van demostrar certs beneficis en el creixement i el neurodesenvolupament (254,255). Tot i així, en el moment actual, l'evidència no sembla prou forta per recomanar que s'instauri aquesta estratègia de fortificació de forma universal (256). Es podria suposar que els lactants prematurs que són donats d'alta a domicili amb una lactància materna directe al pit ben establerta tindrien la capacitat de regular el volum ingerit per a compensar les ingestes nutricionals (257). Tot i això, en prematurs amb un creixement insuficient malgrat una adequada lactància materna directa, caldria tenir en compte el descens de concentració proteica de la llet i valorar l'opció de mantenir el fortificant en algunes preses després de l'alta hospitalària; fet que sembla que no tindria efectes deleteris sobre la lactància (258).

En relació als hidrats de carboni, hem descrit un increment en la seva concentració a mesura que avança la lactància, observat també en altres estudis (68–71,73,88,90,114–117). Els valors varien des de 7,15 g/dl (rang interquartílic: 6,8 – 7,9 g/dl) a la setmana 1 fins a 7,40 g/dl (rang interquartílic: 7,2 – 7,9 g/dl) a la setmana 8, amb un ascens significatiu el primer mes i una posterior estabilització (Figura 23). Les concentracions de carbohidrats que hem descrit en el nostre treball són superiors als publicats en estudis previs (68–73,88,90,114–117). Aquesta troballa es podria explicar per les variacions de l'analitzador en l'estimació de la concentració de carbohidrat, ja que és el macronutrient en el què pitjor rendeix, i no té capacitat per diferenciar els oligosacàrids naturalment presents a la llet humana que venen marcats genèticament (88,236).

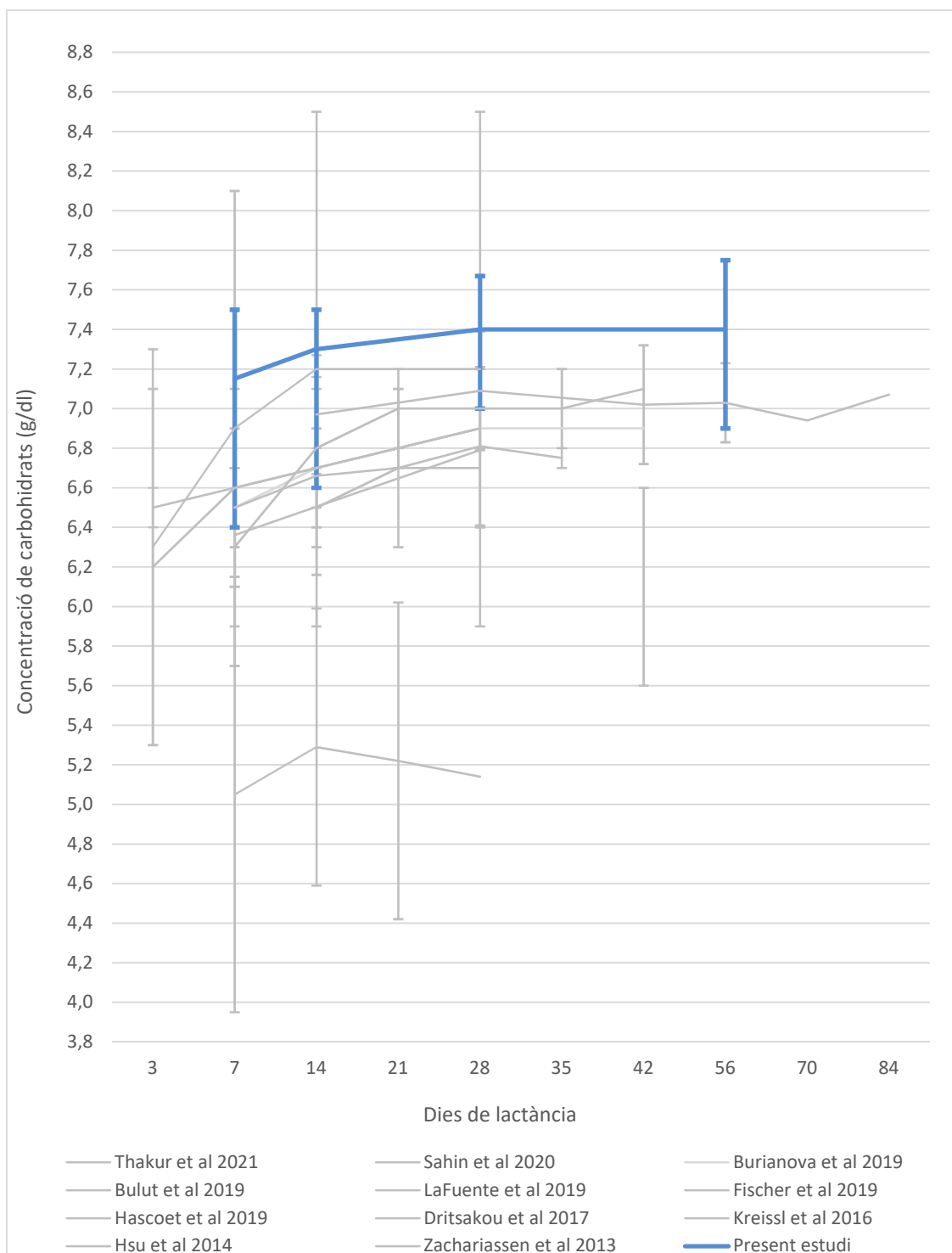


Figura 23. Integració de les dades de concentració de carbohidrats (g/dl) segons el temps de lactància després d'un part prematur en treballs que analitzen la llet per infrarojos (68,70–73,88,90,114–117,119) i el present estudi. Les barres d'error mostren l'interval de confiança del 95%.

DISCUSSIÓ

Respecte al contingut de lípids, i en paral·lel d'energia, hem observat una tendència peculiar. Les concentracions de lípids varien entre 3,9 ($\pm 1,1$) i 3,7 ($\pm 0,9$) g/dl a les setmanes 1 i 8 respectivament, amb un descens fins a 3,4 ($\pm 0,9$) g/dl a la setmana 4 (Figura 24); en paral·lel, l'energia varia entre 73,0 ($\pm 10,8$) i 70,3 ($\pm 8,8$) kcal/dl a les setmanes 1 i 8 respectivament, amb un descens fins a 67,2 ($\pm 8,5$) g/dl a la setmana 4 (Figura 25). A diferència del què es descriu en la literatura, on en termes generals el que s'observa és un progressiu augment en el seu contingut al llarg de les setmanes, les nostres mostres presenten un descens significatiu durant el primer mes amb un ascens posterior (68,69,73,88,116,259). Aquesta troballa podria ser deguda al diferent disseny temporal dels estudis. Existeix un ascens lipídic propi del canvi de calostre a llet de transició, que no s'inclou en les nostres mostres - ja que la primera correspon al 7è-10è dia de lactància -, mentre que si es reflexa en alguns estudis que inclouen mostres de llet materna dels primers dies de vida. Tot i així, altres autors si descriuen concentracions similars a les nostres, amb distribucions més o menys erràtiques (71,88,151).

El contingut lipídic de la llet materna és molt variable (103), es veu afectat per certes característiques maternes, i també pel processat de la llet materna. A causa d'aquest coneixement previ, el nostre estudi va ser molt meticulós amb la recollida, l'emmagatzematge i la anàlisi de la llet materna, pel que pensem que si el descens peculiar de les concentracions de lípids i energia que hem descrit fossin degudes al processat no es reflectirien només en les setmanes 2 i 4 sinó que s'observarien en tot el període d'estudi. Pensem que, en el nostre cas, és probable que les dones que van aportar mostres a partir de la setmana 4 fossin mares de nadons d'edats gestacionals inferiors, que, com comentarem posteriorment, tendeixen a tenir llet amb més contingut lipídic, i per això augmenta la concentració mitjana de lípids i energia a la setmana 8.

No hem identificat diferències entre el contingut energètic estimat o calculat i els requeriments per a nounats molt prematurs descrits per la EPSGHAN, mentre que si ho han fet altres autors (166).

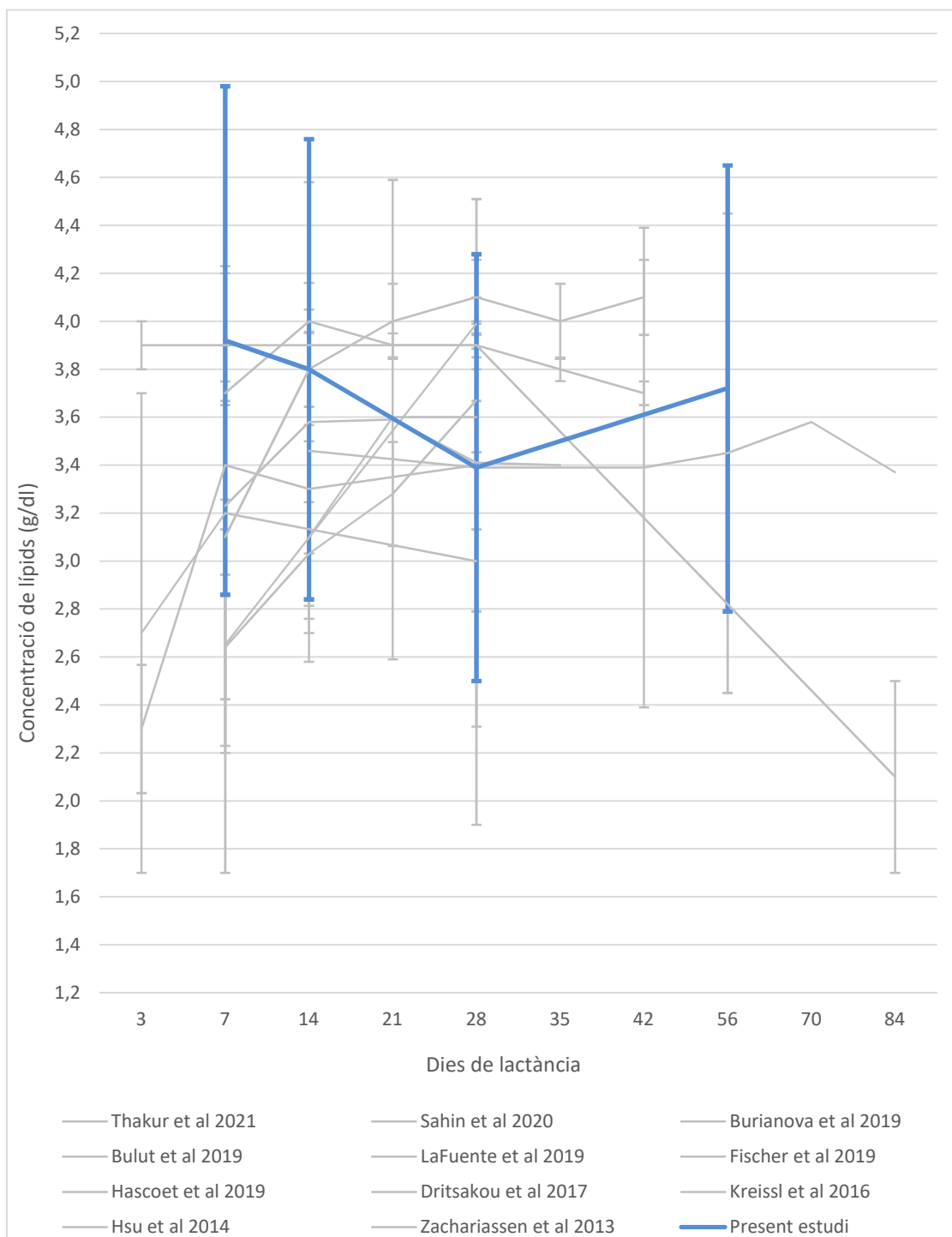


Figura 24. Integració de les dades de concentració de lípids (g/dl) segons el temps de lactància després d'un part prematur en treballs que analitzen la llet per infrarojos (68,70–73,88,90,114–117,119) i el present estudi. Les barres d'error mostren l'interval de confiança del 95%.

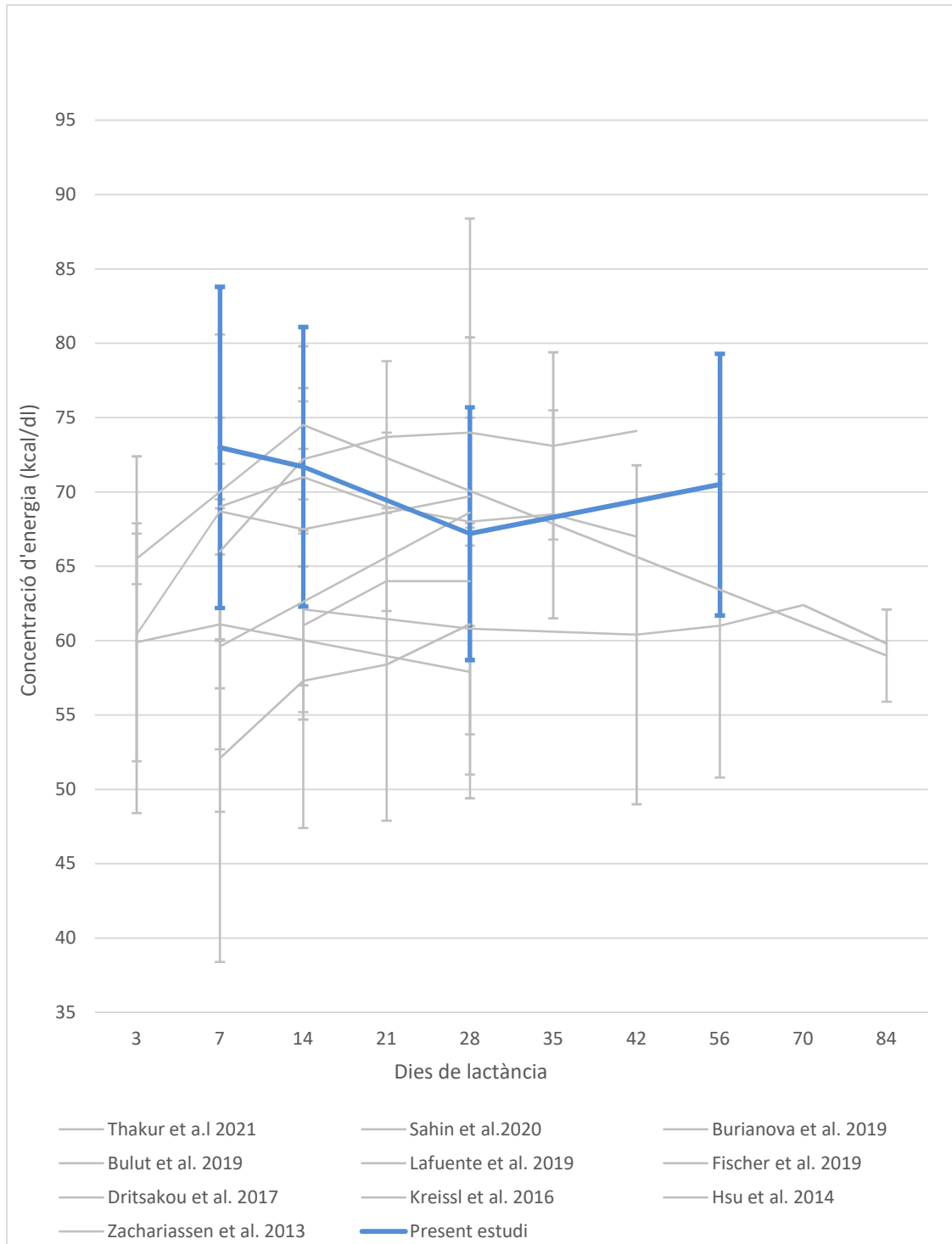


Figura 25. Integració de les dades de concentració d'energia (kcal/dl) segons el temps de lactància després d'un part prematur en treballs que analitzen la llet per infrarojos (68,70–73,88,90,114–117,119) i el present estudi. Les barres d'error mostren l'interval de confiança del 95%.

Si observem la concentració de macronutrients i energia per mare participant enlloc de totes les mostres en conjunt, veiem que hi ha poques diferències entre la concentració general i la concentració individual (Taula 12, pàgina 108). Al comparar les concentracions amb l'estudi de Belfort *et al.* - que comparteix certes similituds amb el nostre treball - les mitjanes són equivalents, però els nostres rangs són més amplis (208). Aquesta troballa es pot deure al fet que en el nostre cas es recollien mostres en un període de temps de major inestabilitat en la llet composició de la llet materna i al fet que totes les mostres del seu estudi provenen de 32 mares i, segons els nostres resultats, la variabilitat intraindividual és menor.

1.1. VARIABILITAT INTERINDIVIDUAL I INTRAINDIVIDUAL

Amb les 625 mostres que s'han analitzat s'ha observat que el rang de concentració de macronutrients de la llet materna prematura entre diferents mares i entre diferents mostres de la mateixa mare és ampli, especialment pel que fa a la concentració de lípids i energia.

El lípids són el macronutrient que ha mostrat més variabilitat amb unes diferències de concentració de fins a 6 vegades; aquest és el cas també d'altres sèries, com ara Fumeaux *et al.*, que va descriure diferències entre mesures mínimes i màximes de fins a 16 vegades i Fischer *et al.* de fins a 10 vegades (36,52,70). Els lípids són un macronutrient crucial per al creixement, aportant pràcticament el 50% de la càrrega energètica de la llet, i són bàsics per al desenvolupament i maduració del sistema nerviós central (260). De forma paral·lela, cal destacar la variabilitat en la concentració d'energia, amb mostres amb més del doble de kcal/dl que d'altres. La variabilitat detectada en les proteïnes és també remarcable, amb unes mostres amb més de 4 vegades més concentració que les altres, rang descrit també per Fumeaux *et al.* (70). Si tenim present que aquestes diferències entre contingut de proteïnes, lípids i d'energia es van acumulant en el temps, al final el dèficit acumulat d'ingesta proteica o calòrica durant l'ingrés o els primers mesos de vida podria ser rellevant i podria afectar negativament al creixement postnatal del nadó (176).

El macronutrient que ha mostrat menys variabilitat han sigut els carbohidrats, troballa descrita per altres autors (52,261). Els carbohidrats poden representar fins a un 40% de la càrrega energètica de la llet i estan implicats en la acció de proteïnes per al creixement (87). La concentració de lactosa de la llet humana és un 50% superior a la de la llet bovina i a la de la llet d'altres mamífers, amb l'objectiu de satisfer les altes necessitats energètiques del cervell humà en creixement (260).

Un es podria preguntar si la variabilitat en la composició de macronutrients depèn en major mesura de la setmana de lactància o bé de la mare lactant en si. A la vista dels nostres resultats, el pas del temps canvia la concentració, sobretot de proteïnes, però

semblaria que el factor individual de cada mare lactant és també important; troballa en concordança amb els resultats de John *et al.* en el seu anàlisi de 1.119 mostres de llet humana de 443 donants en un banc de llet (164).

Aquesta variabilitat entre mares i entre tomes de la mateixa mare fa que sigui difícil calcular els nutrients que rep un nounat molt prematur a partir d'una estimació del contingut de macronutrients de la llet materna i ens indicaria que seria necessari determinar de forma més precisa les característiques de la llet de cada mare, com discutirem ens les pàgines posteriors.

2. COMPOSICIÓ DE MACRONUTRIENTS DE LA LLET MATERNA I ASSOCIACIÓ AMB LES CARACTERÍSTIQUES MATERNES, GESTACIONALS I NEONATALS

A l'hora d'interpretar els resultats de la concentració de macronutrients de la llet materna segons les característiques maternes, gestacionals i neonatals estudiades hem de tenir en compte la disminució del número de mostres en els diferents subgrups (especialment pel què es refereix a mostres de la setmana 8) degut a la baixa prevalença d'algunes patologies o circumstàncies estudiades. Això pot suposar una falta de potència de l'estudi per detectar possibles diferències.

2.1. MATERNES

2.1.1. Edat materna

L'edat materna al primer fill a Espanya ha augmentat progressivament en els últims 40 anys (262). Les mares primíparas del nostre estudi tenien una edat mitjana de $31,6 \pm 6,3$ anys. Es descriu que les mares d'edat més avançada poden presentar dificultats en la producció làctia (125), però l'efecte de l'edat materna en la composició macronutricional de la llet encara no es coneix prou bé (71). La definició d'edat materna avançada varia entre estudis; en el nostre cas hem seleccionat 35 anys, similar al punt de tall utilitzat des del punt de vista obstètric i en altres estudis sobre llet materna (126,152).

Segons els nostres resultats, les mares d'edat avançada presentarien una major concentració de proteïnes durant el primer mes, sobretot durant les primeres dues setmanes, sense diferències en el contingut lipídic ni energètic. L'anàlisi multivariant mostra que l'edat materna major a 35 anys és un factor determinant en la concentració de proteïnes a la setmana 2 i durant el primer mes de lactància, les mares de 35 anys o més presentarien aproximadament 0,21 g/dl de proteïna més el primer mes.

Contrari a les nostres dades, altres autors han descrit diferències en la concentració de greix en relació amb l'edat materna, però no en el contingut proteic (72,121,126). Això podria ser degut a què aquests estudis difereixen en la població d'estudi, el tipus de recollida de la mostra de llet o en la definició d'edat materna avançada. Es va postular que l'augment de concentració de nutrients a la llet de mares d'edat avançada es relaciona amb un possible augment dels nivells d'aquests en sang (en el cas del colesterol, àcids grassos saturats i insaturats) i amb la remodelació histològica de la glàndula mamària secundària al pas del temps, mecanisme que podria contribuir també a les diferències en contingut proteic (72,120,126). Les mares d'edat avançada també podrien tenir un risc més elevat de patir complicacions obstètriques com ara diabetis gestacional o preeclàmpsia, que podrien actuar com a factors de confusió (128,263), tot i que això no era el cas de la nostra cohort.

2.1.2. Índex de massa corporal matern

La prevalença de sobrepès i d'obesitat ha anat augmentant al llarg de les últimes dècades (264), sent en la nostra cohort del 35,8%. Per a la descripció de la concentració de macronutrients en funció de la composició corporal materna hem utilitzat l'índex de massa corporal pregestacional, donat que no existeixen directrius de normalitat per l'índex de massa corporal postgestacional en el cas de part molt prematur (71). En tot cas, l'índex de massa corporal pregestacional i postgestacional estan fortament correlacionats (265).

Las mares amb sobrepès o obesitat de la nostra mostra presentaven una major concentració de macronutrients a la llet, tant en el greix i l'energia de la llet madura (setmana 4) com al contingut proteic a la setmana 4 i en la mitjana del primer mes de lactància. L'anàlisi multivariant mostra que la categoria d'IMC és un factor determinant en la concentració de proteïnes i d'energia en la quarta setmana, així per cada increment de 5 punts en el IMC, augmentaria el contingut de la llet aproximadament en 0,15 g/dl de proteïna i en 3,2 kcal/dl d'energia.

DISCUSSIÓ

Diferents estudis recolzen la hipòtesis de què l'increment d'índex de massa corporal suposa un augment en el contingut lipídic i energètic de la llet materna. Així, autors com Zachariassen *et al.* objectiven un augment significatiu de greix i energia en la llet de mares amb IMC per sobre de 25 kg/m^2 des de la segona fins a la sisena setmana de lactància (117); Burianova *et al.* descriuen una diferència de concentració de $\pm 0,5 \text{ g/dl}$ de proteïna per a mares amb un IMC major de 30 kg/m^2 (71) i Dritsakou *et al.* descriuen aquestes troballes tant en calostre com en llet de transició i madura (72). En el nostre cas, la llet de setmana 1 (transicional) apuntava en la mateixa direcció, encara que sense significació estadística. S'ha especulat que el contingut incrementat de greix i energia en la llet podria ser degut l'augment de les concentracions sèriques d'àcids grassos lliures en dones obesas (78) o que es podria relacionar amb altres anomalies metabòliques (72,122).

Bzikwoska *et al.*, en lloc de categoritzar a les mares segons l'IMC, es va basar en el pes i la composició corporal. Van objectivar una correlació positiva entre el pes matern, el percentatge de greix corporal i la massa muscular i la concentració lipídica i proteica de la llet, i una correlació negativa amb el percentatge d'aigua corporal (78). Segurament, la composició corporal materna reflecteixi millor l'estat nutricional que l'IMC i sigui una variable més precisa per avaluar l'impacte en la composició de la llet materna (78), però la seva mesura tindria el desavantatge de requerir equipament específic (amb les seves pròpies limitacions) i rendir resultats menys comparables a la resta de la bibliografia disponible.

Respecte a la possible afectació sobre altres macronutrients, els resultats en la literatura són discordants (73,82,122,129–131,150). Segurament el fet que alguns d'aquests estudis treballen amb mostres matinals i d'altres amb un *pool* representatiu de tot el dia, i que alguns es focalitzen amb mares de nadons a terme i d'altres amb mares de prematurs influeix en aquestes discrepàncies.

Respecte a les mares afectes de malnutrició (definida com IMC menor a 18 kg/m^2) no hem trobat diferències en la composició de la llet però el número de puerperes amb malnutrició era petit (< 10). Els últims estudis descriuen que no existeix una clara

associació entre el contingut de macronutrients de la llet i la dieta materna, a excepció dels casos extrems (36,52,72,78,266,267). S'hipotetitzava que existeixen mecanismes fisiològics compensatoris que podrien actuar com a tamponadors de forma que la composició de macronutrients de la llet es mantindria estable a pesar de les variacions nutricionals maternes (119,267,268).

2.1.3. Consum de substàncies

Els principis actius de les tres substàncies estudiades es secreten en llet materna (269). Els metabòlits del tabac - nicotina i cotinina - apareixen en llet (137–139), l'alcohol consumit per una mare lactant passa fàcilment a la llet a concentracions similars a les del torrent sanguini (270) i la cafeïna, encara que probablement en baixa concentració en la llet, i es pot acumular en el nadó per la immaduresa de la via metabòlica hepàtica (271). En la nostra cohort, el número de mares que van declarar consum de substàncies, particularment alcohol, durant la lactància va ser petit i això va limitar la capacitat per a obtenir conclusions de la seva anàlisi. En el cas del tabac, les xifres són menors a les descrites a la literatura (136). Donat que el consum de tòxics es va definir segons l'entrevista a la mare i no segons mesures sobre matriu biològica, es podria donar el cas que no fos declarat o bé fos infraestimat.

Entre els efectes descrits en la literatura del consum de substàncies, destaquen una disminució de la producció làctia, que ja per si mateixa podria alterar la composició de la llet materna, i canvis en el sabor de la llet, podria provocar una disminució de la gana i secundàriament de la producció, encara que això no aplicaria en la nostra població (272).

El consum de tabac es pot analitzar segons si l'exposició només ha sigut pregestacional, o bé durant la gestació i/o durant la lactància. S'ha postulat que la presència i dipòsit de nicotina i cotinina en el teixit adipós de la glàndula altera la lactogènesi (71,115,122,136). Tot i que varis autors han publicat que la concentració de greixos en llet materna de mares fumadores és menor per disminució de la prolactina circulant (71,115,122), també és plausible que a causa de que el tabac

inhibeix l'activitat hepàtica de la lipoproteïna lipasa i augmenta triglicèrids, colesterol i lipoproteïnes de baixa densitat sèrics, aquests nivells superiors es poguessin reflectir en la llet (de forma similar al que es postula que passa amb l'edat materna). Després d'ajustar per factors de confusió, no hem detectat diferències en la concentració de macronutrients entre mares fumadores en qualsevol moment enfront mares no fumadores.

L'Acadèmia Americana de Pediatria considera que el consum de cafeïna és compatible amb la lactància materna, però n'aconsella un consum menor a 300 mg/dia (141). Igual que en el nostre estudi, la revisió de Nehlig de l'any 1994 conclouia que el consum de cafè no afectava a la composició de la llet materna, i n'estimulava lleugerament la producció (143).

2.1.4. Altres característiques maternes

No vam detectar associacions entre les concentracions de macronutrients i energia en llet i altres característiques maternes (entre els diferents orígens ètnics de les mares, diferents patologies de base com ara la diabetis gestacional o en casos de cirurgia mamària).

D'aquests factors, el més estudiat és la diabetis gestacional, i l'evidència a la literatura és controvertida. Dritsakou *et al.* van descriure que les mares afectes presentaven una menor concentració de proteïnes i una major concentració de greixos i energia en la llet de transició i en la llet madura (72), mentre que Shapira *et al.* van trobar que la concentració de lípids i energia disminuïa a partir del mes (134,273). Possiblement el grau en què estigui controlada la malaltia tindrà també especial rellevància i totes les nostres participants amb diabetis gestacional tenien un control glicèmic adequat. Tal i com conclou en la seva revisió Peila *et al.* l'any 2020 és probable que la diabetis gestacional alteri la composició de la llet materna a diferents nivells, però són necessaris més estudis per treure conclusions robustes (133).

Semblaria plausible que la manipulació quirúrgica de la glàndula i/o la presència d'un cos estrany pugés alterar el seu funcionament. No obstant, nosaltres no hem trobat diferències en el contingut de macronutrients, encara que no podem descartar que sigui degut a una insuficient grandària mostral. Els estudis sobre l'impacte de la cirurgia mamària es centren en la producció de llet, però no sobre la composició de la mateixa, pel que no són comparables al nostre.

2.2. GESTACIONALS

2.2.1. Gestació múltiple

Són escassos els estudis que consideren el part múltiple quan s'estudia la composició de la llet. Congiu *et al.* va descriure un major contingut proteic (1,53 vs 1,29 g/dl) i un menor contingut lipídic (6,34 vs 6,72 g/dl) en llet de mares després de part múltiple, però en una mostra petita (9 múltiples i 28 fills únics nascuts entre 24 i 28 setmanes de gestació), mentre que els nostres resultats apunten a una menor concentració de proteïnes i energia a la llet del primer mes en aquestes mares. L'anàlisi multivariant mostra que la gestació múltiple és una variable determinant en la concentració de proteïnes en la quarta setmana, de forma que l'embaràs gemel·lar implica un descens de la concentració de 0,17 mg/dl. La proporció molt més alta de nadons de baix pes per a l'edat gestacional en el grup de gestació múltiple de l'estudi italià (18,6 vs 3,7%) podria explicar aquestes discrepàncies (144).

La nostra troballa es podria argumentar en base al descrit per Nommsen *et al.* Segons el seu estudi, realitzat en nounats a terme i majors a 6 mesos, a major quantitat de llet produïda, menor contingut de proteïna i major contingut de lactosa (274). Malauradament, no disposem de dades sobre la producció de llet dels nostres participants i podria haver-hi un biaix de selecció a causa del requisit d'inclusió de comptar amb un volum de llet suficient per cobrir les necessitats d'alimentació, que implicaria una major producció en les participants que alletaven a més d'un nadó.

2.2.2. Trastorn hipertensiu de l'embaràs

En el nostre estudi observem que aquestes mares tindrien una evolució particular en el contingut proteic i energètic de la llet, amb concentracions més baixes la primera setmana i més altes a partir del mes. L'anàlisi multivariant mostra que el trastorn hipertensiu de l'embaràs és una variable determinant en la concentració d'energia de la primera setmana, suposant una disminució en la concentració d'energia de 12,4 kcal/dl. Pocs estudis han abordat l'efecte de la preeclàmpsia en la composició de la llet materna. S'ha descrit un menor contingut de macronutrients en la llet dels primers dies en un grup de dones primíparaes amb preeclàmpsia després d'un part a terme (112) i un contingut més alt de proteïnes i energia en la llet madura després del part prematur (145,146), d'acord amb els nostres resultats.

Aquesta peculiaritat podria afavorir l'adaptació dels nadons de mares amb preeclàmpsia, nounats amb major prevalença de restricció del creixement intrauterí; així, el rebre llet de la seva pròpia mare suposaria una menor carga nutricional durant els primers dies que evitaria el síndrome de realimentació i posteriorment l'augment del contingut proteic i energètic contribuiria a iniciar la recuperació del creixement.

2.2.3. Retràs de creixement intrauterí

La relació entre el creixement fetal subòptim i els macronutrients de la llet materna és controvertida, probablement a causa de l'heterogeneïtat en la definició de retràs de creixement intrauterí i en les diferents edats gestacionals estudiades. En el nostre estudi, la llet de les mares de nadons afectes d'un retràs de creixement intrauterí presenta un major contingut proteic la setmana 4 i durant el primer mes de lactància. L'anàlisi multivariant mostra que el retràs de creixement intrauterí és una variable determinant en la concentració de proteïnes en el primer mes de lactància, suposant un increment en la concentració de 0,22 mg/dl. Correia *et al.* va descriure, contràriament als nostres resultats, una associació negativa feble amb el contingut de greixos però no de proteïnes durant les primeres setmanes, que pot ser deguda a

diferències en altres característiques materns (IMC, historial de lactància) que hem trobat que tenen efecte i que no van ser incloses en els seus anàlisis (145).

Els resultats de la concentració de macronutrients en la llet madura de mares amb preeclàmpsia i nadons amb retràs de creixement intrauterí, patologies que poden mostrar solapament, són congruents.

2.2.4. Via de part i presència de treball de part previ al naixement

Nissen *et al.* va descriure diferents nivells hormonals (especialment d'oxitocina i de prolactina) segons el tipus de part (275). Els diferents nivells hormonals en funció del tipus de part podrien canviar la composició de la llet materna però existeixen controvèrsies en la literatura respecte quin és l'efecte exacte. Alguns autors descriurien canvis en la concentració de proteïnes (71,114,121), d'altres, en canvi, no troben diferències (70). A part de les diferències metodològiques existents entre aquest treballs, és possible que no s'hagi donat prou importància al solapament entre la via de part i la presència o no de treball de part o contraccions uterines. Els canvis en els nivells circulants d'insulina, glucocorticoides i progesterona que es donen durant el part i deguts al dolor provocat per les contraccions uterines (119,276) podrien influir en la concentració de proteïnes i energia.

Segons els nostres resultats, la via de part (vaginal *versus* cesària) no tindria un efecte notori sobre la concentració de macronutrients de la llet materna; però aquesta sí que es veuria afectada per la presència o no de treball de part, que es relacionaria amb una major concentració de lípids i energia la primera setmana i una menor concentració de proteïnes a la setmana 4 independentment de la via final de part. L'anàlisi multivariant mostra que la presència de treball de part abans del naixement és una variable relacionada amb la concentració de proteïnes en la quarta setmana, i s'associa a un augment del contingut proteic de 0,24 g/dl.

S'ha descrit que la probabilitat de parir per cesària es podria relacionar amb la presència d'obesitat materna (121), fet que podria afectar els resultats relacionats amb la concentració de lípids, proteïnes i energia de la llet materna. Aquesta relació no es va detectar en el nostre estudi.

2.2.5. Lactàncies prèvies

Tal com es va descriure anteriorment en una cohort de mares que van donar a llum molt prematurament (117), en el nostre estudi, les dones per a les quals no va ser la primera lactància materna mostraven una concentració de proteïnes més baixa durant el primer mes. S'ha especulat que això es deu a un inici més ràpid de la lactogènesi tipus II i a un augment de la producció de llet (117). Aquests resultats són congruents amb les nostres troballes en cas de gestació múltiple, on una probable major producció de llet (donat que era criteri de inclusió el produir llet suficient per a tots els seus nadons) també implica una menor concentració de proteïnes.

Sorprenentment, dins d'aquest subgrup de mares que tenien una lactància prèvia, també vam descriure una correlació positiva entre la durada de la lactància prèvia i el contingut de proteïnes de la llet durant les primeres 4 setmanes després del part, encara que aquestes xifres són menors que en les mares que lactaven per primera vegada. Encara que pugui semblar incoherent, s'ha reportat que el contingut de proteïnes augmenta en lactàncies molt perllongades (més de 12 mesos) o en tàndem (153). Es podria especular que la durada de la lactància prèvia o un període d'interlactació més curt (com s'esperaria que s'associés amb períodes més llargs de lactància materna d'un germà gran) podria tenir un impacte en la composició de la llet de la següent lactància, tot i que no hem pogut trobar estudis relacionats.

2.2.6. Altres característiques gestacionals

Donat que els nivells d'hormones circulants podrien afectar el contingut de macronutrients de la llet, seria factible que els corticoides administrats a la mare per a la maduració fetal poguessin tenir efecte sobre la composició de la llet (115). No obstant, en el nostre estudi no hem trobat diferències.

No hem trobat diferències en relació a la paritat materna. En estudis previs, Bachour *et al.* van descriure que la paritat es correlacionava de forma independent amb el contingut lipídic de la llet fins a la gestació número 3 ($F = 11,87$, $p < 0,05$), i que el contingut proteic tendia a decreixer, però amb diferències estadísticament no significatives (122). Burianova *et al.* no van descriure canvis en el contingut lipídic en relació amb la paritat, però sí augments en la concentració de proteïnes i hidrats de carboni, tot i que discrets (71). Aquest efecte es podria atribuir als canvis histològics i anatòmics de la glàndula mamària durant els embarassos successius (122). És possible que l'edat materna actuï com a factor confusor, donat que seria d'esperar que a major número de gestacions més edat materna i els estudis citats no van ajustar per aquesta variable. En la nostra cohort hem detectat una correlació lineal positiva dèbil entre edat materna i la paritat ($\rho: 0,192$, $p=0,039$).

En quant a les tècniques de reproducció assistida, no hem trobat relació amb la composició de la llet materna. Tot i això, encara que gairebé un terç de les gestacions de les nostres participants procedien d'una fecundació *in vitro*, el nostre estudi no estava dissenyat específicament per detectar diferències entre aquests grups, i veient com l'ús de la reproducció assistida és cada cop més freqüent podria ser interessant plantejar nous estudis encaminats a determinar si existeixen peculiaritats en les lactàncies posteriors a l'ús d'aquestes tècniques, tant en la producció de llet com en la seva composició.

3.1. NEONATALS

3.1.1. Edat gestacional

La influència de l'edat gestacional sobre la composició de la llet materna en la literatura és controvertida. La majoria d'autors descriuen un augment de proteïnes, lípids i/o energia en les mostres de llet materna de mares amb parts abans de les 32 setmanes de gestació (en alguns estudis de menys de 37 setmanes) a diferents punts temporals de les primeres setmanes de lactància (67,70,72,117,144). Tanmateix, hi ha varis autors que no descriuen diferències composicionals entre la llet de mares amb nounats prematurs a diferents edats gestacionals o entre la llet de mares de nounats prematurs i de nounats a terme (88,90,114,149,152). La discrepància podria derivar del fet que l'associació semblaria feble i evident sobretot al començament de la lactància o bé que es comparen diferents grups en diferents punts de tall (llet prematura de diferents edats gestacionals o prematura *versus* terme).

El nostre estudi recolza la existència d'una correlació negativa entre l'edat gestacional i la concentració de proteïnes i energia durant el primer mes de lactància. Aquesta major concentració de proteïnes després de parts de menor edat gestacional pot ser causada per una glàndula mamària immadura on trobem una reducció del flux sanguini, una diferenciació incompleta de les cèl·lules epitelials i una absència de les unions entre elles (153,154). Anderson *et al.* relacionen la major concentració de proteïnes en llet prematura amb una menor concentració de carbohidrats atès que tots dos formen part de la fracció soluble en aigua, però nosaltres no hem trobat aquest efecte (277). Segons Arslanoglu *et al.* l'augment de la densitat nutricional de la llet de les primeres setmanes en les mares de nounats molt prematurs podria compensar parcialment la falta de traspàs de nutrients a través de la placenta que n'hauria d'ocórrer durant el tercer trimestre de l'embaràs (166).

El disseny de recollida de mostres del nostre estudi va permetre la comparació de la composició entre la llet de mares amb nounats molt prematurs i extremadament prematurs segons l'edat postnatal (corresponent a etapes de lactància materna similars) i també segons l'edat postmenstrual (corresponent a etapes de desenvolupament neonatal similar). Els resultats de la Figura 18 (pàgina 132) mostren diferències en la concentració de proteïnes entre nounats molt prematurs i nounats extremadament prematurs entre les 30 i 34 setmanes d'edat postmenstrual. Aquests resultats demostren que els canvis temporals en la composició de la llet venen determinats per l'esdeveniment del part i no per una programació relacionada amb el desenvolupament de les etapes de la gestació. Així, un nadó que va néixer a les 30 setmanes d'edat gestacional, a les 32 setmanes d'edat postmenstrual rebria més proteïna materna que un nadó en la mateixa edat postmenstrual però nascut a les 24 setmanes de gestació. Aquesta troballa també va ser descrita per Fischer *et al.* l'any 2019, tant en contingut proteic com en lipídic, però entre llet prematura i a terme (70). Tenint en compte que, si aquestes gestacions haguessin prosseguit normalment, els dos fetus es trobarien en estadis de desenvolupament similar, és possible que el fet que el prematur de menor edat gestacional estigui reben menys nutrients pugui influenciar parcialment en el seu creixement postnatal.

3.1.2. Pes al néixer

De forma congruent amb els resultats mencionats prèviament en relació amb l'edat gestacional, el pes al néixer presentaria una correlació negativa amb la concentració de proteïnes i energia durant el primer mes de lactància.

3.1.3. Sexe del nounar

En contraposició a recents estudis on es postula que les mares de nadons masculins podrien tenir una major concentració de macronutrients (tant proteïnes com energia) en la llet (70,158,278) nosaltres no hem trobat diferències en la composició segons el sexe del nounat. Tot i això, podria ser que aquestes diferències no fossin evidents per la conjunció de múltiples factors com ara l'edat gestacional i el pes al néixer, les gestacions múltiples amb nadons de diferent sexe o les patologies maternes estudiades que interferissin en els resultats.

4. DESCRIPCIÓ DEL CREIXEMENT DE LA NOSTRA COHORT DE NOUNATS MOLT PREMATURS

El naixement prematur d'un nadó comporta que diferents processos fisiològics propis del desenvolupament fetal tinguin lloc en un medi extrauterí. Un d'aquest processos és el creixement; l'adequació d'aquest creixement és molt important, ja que s'ha demostrat que és un factor pronòstic a llarg termini, també a nivell neurològic (180,232,279).

Una de les dificultats per caracteritzar el creixement del nounat molt prematur i, per poder comparar-lo entre diferents poblacions, és la falta de consens entre els neonatòlegs (185), doncs no existeixen unes directrius universals pel que fa a:

- El mètode per descriure'l
- Les corbes de referència a utilitzar
- Els punts temporals que corresponen al començament i final de l'anàlisi
- Quin són els punts de tall que diferencien un creixement adequat d'un insuficient

Segons la revisió publicada l'any 2017 per Fenton *et al.*, el mètode més utilitzat era la velocitat de guany ponderal (tant en g/kg/dia com g/dia) seguit dels canvis en la puntuació Z en relació amb un gràfic intrauterí o de creixement; des del naixement/ingrés, des de l'inici de l'estudi, des de l'alimentació completa o des de la recuperació del pes al néixer fins a l'alta, al final de l'estudi o fins certa EPM (185).

El creixement postnatal és un procés dinàmic, pel que internacionalment es recomana utilitzar el canvi de puntuació Z en el temps, i no una puntuació Z aïllada (280). Per aquest motiu, en la present tesi es va optar per fer els càlculs de creixement amb la diferència de puntuació Z respecte al pes al néixer, tal i com recomanada l'Organització Mundial de la Salut (187), on valors positius equivaldrien a un creixement favorable, i valors negatius a un desfavorable.

DISCUSSIÓ

Quan es valora el creixement postnatal basant-se amb la puntuació Z és molt important fer referència a la corba que s'empra per als corresponents càlculs. En el nostre estudi vam utilitzar les corbes de mida al néixer del projecte INTERGROWTH-21st disponibles a <https://intergrowth21.tghn.org> (243); no hi ha moltes diferències entre les diferents corbes de mida al néixer, i aquestes permeten el càlcul de puntuació Z. Alguns dels nostres participants van ser donats d'alta més enllà de les 40 setmanes d'EPM, en aquests casos es van utilitzar les corbes de la OMS disponibles a <http://www.who.int/childgrowth/standards> (281).

En el nostre estudi, la puntuació Z del pes, la longitud i el perímetre cranial al naixement eren pròximes a 0, indicant un punt de partida pròxim a la mitjana o al percentil 50. Es va observar una progressiva caiguda de la puntuació Z, tal com es sol veure reflectit en la literatura (188,198,203,282), sent aquest canvi més marcat durant els primers 28 dies de vida. Sáenz de Pipaón *et al.* van publicar l'any 2014 els resultats d'un estudi prospectiu en una mostra de 111 nounats de < 1.500 g i < 34 setmanes d'edat gestacional on va observar un descens de la puntuació Z de pes de -0,97 en les primeres 5 setmanes, similar al nostre -0,83 en les primeres 4 setmanes (188). Altres estudis també havien descrit aquesta evolució dual, amb un període inicial de major pèrdua de puntuació Z i un període posterior més estable, corresponent el primer a un major consum metabòlic, a fases més greus de la patologia aguda dels prematurs i/o a més dificultats per a l'administració d'una adequada nutrició (205,282,283). En el nostre estudi el canvi de puntuació Z de pes, longitud i perímetre cranial als 28 dies es correlacionaven amb la canvi de puntuació Z a les 36 setmanes d'EPM i a l'alta (fortament en el cas del pes), pel que considerem aquest primer mes com un període determinant en l'evolució ponderal posterior.

De forma global, el pes va presentar un descens de puntuació Z acumulat més important a les 36 setmanes d'EPM amb certa recuperació en el moment de l'alta hospitalària, però sense tornar als valors del naixement. Fenton *et al.* van descriure que les taxes més altes de restricció de creixement extrauterí són al voltant de la setmana 37 d'EPM ja que després d'aquest moment, els nounats prematurs solen experimentar certa recuperació en comparació amb els seus equivalents a terme

(207), per tant és probable que alguns nadons ingressats més enllà de les 36-37 setmanes d'EPM presentessin cert guany de puntuació Z, troballa també descrita en altres Unitats Neonatals espanyoles (198). La puntuació Z de la longitud, en canvi, va presentar un descens progressiu i mantingut, sense milloria pre-alta. La puntuació Z de perímetre cranial va caure de forma molt marcada durant els primers 28 dies de vida però va millorar posteriorment, mantenint-se propera al 0 a l'alta; aquest era el paràmetre antropomètric menys alterat en el moment de l'alta, com van descriure altres autors (88,203). Els canvis en el perímetre cranial als primers 28 dies es pot veure influenciada per la pèrdua fisiològica de líquids pròpia dels primers dies de vida (204) i es creu que en períodes de relativa falta de nutrients, el cos conserva el creixement del perímetre cefàlic, fet que podria explicar la recuperació posterior (88,284,285).

En termes de canvi de puntuació Z, la selecció del punt de tall per diagnosticar un fracàs de creixement postnatal també és motiu de debat. Alguns autors utilitzen una canvi major a 0,8 (és aquella que aniria més enllà de la pèrdua fisiològica) (205), major a 1,28 (representaria el percentil 10 en una distribució gaussiana) (286), major a 1,34 (el doble de la suggerida per definir creixement recuperador) (189), entre d'altres. En el nostre treball vam definir fracàs de creixement postnatal similar a com fa l'Acadèmia Americana de Nutrició i Dietètica (que anomenen "malnutrició neonatal") com: absent o lleu equivalent a canvi de puntuació Z menor a 1,2; moderada equivalent a canvi de puntuació Z entre 1,2 i 2; greu equivalent a canvi de puntuació Z major a 2 (204). L'ideal seria escollir el/s punt/s de tall que correlacionessin millor amb el creixement i neurodesenvolupament ulterior, tot i que falta consens al respecte (287,288).

La incidència global de fracàs del creixement postnatal segons pes en la nostra població d'estudi va ser de 58,3% a l'alta i segons longitud, 50,8%; en línia amb publicacions prèvies (188,198,203,282). La pèrdua màxima després de néixer es va produir de mitjana als $4,7 \pm 4,0$ dies de vida però amb un ventall molt ampli. Tot i que alguns autors postulen que s'hauria de valorar el creixement un cop superada la base inicial de pèrdua de pes, vam optar per partir del pes al néixer, ja que és el punt més utilitzat a nivell de pràctica clínica i tal com refereix Cormack *et al.* és un punt temporal

únic i minimitza possibles errors (18). Respecte al punt final de l'anàlisi, molts autors utilitzen l'alta a domicili, en canvi, d'altres opinen que el més adequat és fer-ho a determinada EPM propera al terme (176,181,289). En el nostre estudi vam utilitzar les 36 setmanes d'edat postmenstrual i l'alta hospitalària, donant més importància en aquest darrer perquè en el primer punt només disposaven de dades del 71,5% de la cohort i, a més, la transformació de les dades a puntuació Z ja té en compte l'edat postmenstrual o cronològica.

No hem utilitzat el perímetre cranial per a la identificació dels pacients amb fracàs del creixement, perquè tot i que es coneix que la seva evolució depèn en part de la nutrició rebuda (229,284), es pot veure fortament influenciat per altres mobilitats associades a la immaduresa com ara l'hemorràgia intraventricular o la leucomalàcia periventricular (204).

El creixement de la nostra cohort va ser similar a altres descrites a la literatura en què es va definir aquest paràmetre mitjançant g/kg/dia o punt de tall de percentil a l'alta. En el nostre estudi, la mitjana de guany ponderal diari des del naixement fins a l'alta hospitalària va ser de $18,9 \pm 3,9$ g/dia (rang: 5,1 – 31,2) i la incidència de pes per sota del percentil 10 a l'alta a ser 48,9%, ambos similars a la reportada per Avila-Álvarez *et al.* en una altra cohort nacional de nounats molt prematurs (22).

4.1. DIFERÈNCIES ENTRE ELS NOUNATS MOLT PREMATURS I ELS NOUNATS EXTREMADAMENT PREMATURS

Les evolucions de les puntuació Z van ser diferents entre els recents nascuts molt prematurs i extremadament prematurs de la nostra cohort en referència al pes i perímetre cranial.

Al mes de vida els nounats extremadament prematurs presentaven una major incidència de fracàs de creixement segons pes (sense diferències en la intensitat de la pèrdua de pes fisiològica), probablement indicant que l'afectació inicial del creixement és més marcada en aquest subgrup. En el moment de l'alta hospitalària aquests nadons presentaven un descens mitjà de la puntuació Z de pes des del naixement fins

a de -1,77, molt similar al -1,7 descrit per García-Muñoz *et al.* en una cohort de 4.520 nounats de ≤ 28 setmanes de gestació (282). Respecte a la longitud, el canvi de puntuació Z es mantinguda durant tot el període sense diferències estadísticament significatives. En el grup de nounat extremadament prematurs, la caiguda de puntuació Z de perímetre cranial era més accentuada als 28 dies de vida, millorant posteriorment, fet que podria estar en part relacionat amb la subjecció de la ventilació no invasiva (tenint en compte que, a menor edat gestacional en principi major necessitat de suport respiratori o més perllongat). Els nostres resultats són congruents en les troballes descrites en la literatura (25,179,189,290,291). Els pacients més immadurs presenten un major risc de creixement postnatal deficient, atribuïnt-se a una major vulnerabilitat i un major risc de desenvolupar complicacions pròpies de la prematuritat que interfereixen negativament amb l'evolució somatomètrica.

4.2. DIFERÈNCIES ENTRE PACIENTS AFECTES DE RETRÀS DE CREIXEMENT INTRAUTERÍ I NO

Per a la definició de pacients afectes de retràs de creixement intrauterí es va utilitzar la classificació obstètrica, enlloc del percentil al néixer, per centrar-se en els pacients amb un mal creixement durant la gestació enlloc dels nadons constitucionalment petits.

Els pacients amb retràs de creixement intrauterí van presentar un comportament diferent al de la resta de la mostra, troballa descrita també per altres autors (189,191,203). Un factor que podria afectar a la descripció del creixement d'aquest subgrup seria l'edat gestacional, ja que es veu afectada per les decisions obstètriques que es prenguin davant d'un embaràs patològic, però en la nostra mostra no hi havia diferències estadísticament significatives entre l'edat gestacional mitjana global i la d'aquests pacients ($29,2 \pm 1,5$ vs $28,7 \pm 2,5$, $p=0,319$).

A nivell de pes, presentaven menors caigudes de puntuació Z en els diferents punt de tall avaluats. Tot i això, el valor net d'aquesta puntuació era sempre menor al dels seu equivalents no afectes, i a l'alta continuaven lluny d'ells [$(-2,20) \pm 0,79$ vs $(-1,26) \pm$

DISCUSSIÓ

0,94, $p < 0,001$]. En els resultats globals hem descrit una certa recuperació del pes en aquells nadons ingressats més enllà de les 36 setmanes d'EPM (especialment en el cas de prematurs de 28 a 32 setmanes de gestació) que no hem observat en aquests pacients. Pel contrari, a nivell de longitud, el canvi de puntuació Z era més negatiu que el dels seu equivalents no afectes, mostrant una marcada diferència al moment de l'alta, $(-3,01) \pm 1,12$ vs $(-1,27) \pm 1,61$ ($p < 0,001$). A nivell de perímetre cranial presentaven una distribució similar a la resta de la cohort, amb el major canvi de puntuació Z als 28 dies, i una recuperació posterior que inclús els permetia tenir una millor puntuació Z a l'alta que al néixer, però de nou lluny dels seus equivalents $(-0,50 \pm 1,13$ vs $-1,19 \pm 0,84$, $p = 0,006$). Així, el nostre estudi va descriure una major afectació del creixement longitudinal que del ponderal o cefàlic. Aquestes troballes són importants ja que el creixement longitudinal pot reflectir l'increment de massa magra i l'acreció proteica, i hi ha publicacions que associen la restricció longitudinal i cefàlica amb pitjors resultats neurològics a llarg termini (180,292–294).

Tot i que pugui semblar incoherent veient la Figura 20, els nadons amb diagnòstic de retràs de creixement intrauterí presentaven menys incidència de fracàs del creixement postnatal segons la definició utilitzada. Aquesta troballa ja havia sigut descrita anteriorment (25,176,189,191), com per exemple en l'estudi de Krauel *et al.*, on s'avaluà el creixement de 2317 prematurs de 55 Unitats Neonatals espanyoles, i es va postular que aquest resultat es podria deure al fet que els nadons afectes de retràs de creixement intrauterí presentaven una menor pèrdua de líquid els primers dies de vida (en la nostra població no hi ha diferències entre la pèrdua ponderal dels afectes o no per retràs de creixement intrauterí) o bé una reprogramació metabòlica deguda a la precarietat nutricional que havien estat sotmesos intraúter (198).

És possible que la definició de fracàs de creixement hagi de ser diferent per als pacients amb retràs de creixement intrauterí. Figueras *et al.* van estudiar l'any 2020 el creixement postnatal de nadons molt prematurs, no en funció del creixement intrauterí en si, però si en funció de si havien nascut amb un pes adequat o amb un baix pes, descrivint un patró similar al nostre. Van concloure que la investigació referent al creixement postnatal del nounat prematur s'hauria de tenir en compte si el

nadó havia nascut amb un pes adequat o no, ja que en aquest darrer cas, l'evolució durant l'ingrés podria ser una continuació del patró intrauterí més que un fracàs postnatal (191), tal i com succeeix en la nostra sèrie.

Si un nadó neix després d'haver assolir el seu potencial teòric de creixement, sembla adequat monitoritzar-ne el canvi; però en el cas que un nadó no l'hagi assolit, ja parteix d'un punt inicial patològic, i encara que la seva evolució sigui teòricament "favorable" el seu estat basal continua sent preocupant. La definició del canvi de puntuació Z des del naixement avalua específicament el component de fracàs postnatal. Segons els nostres resultats, semblaria que la monitorització de la longitud ens podria donar més informació en aquest subgrup de pacients. Tot i això, no existeix actualment evidència que relacioni el creixement amb els resultats neurològics i metabòlics posteriors en nounats molt prematurs amb antecedent de retràs de creixement intrauterí que permeti definir quina és la trajectòria de creixement postnatal més adient (181,295).

5. DESCRIPCIÓ DE LA NUTRICIÓ REBUDA

Durant el temps de realització de l'estudi no hi va haver canvis ens els protocols de nutrició parenteral i enteral del nounat molt prematur.

5.1. NUTRICIÓ PARENTERAL

Segons els protocols de nutrició dels nostres hospitals, tots els nounats molt prematurs haurien de rebre nutrició parenteral des del naixement fins a corroborar una correcta tolerància enteral progressiva. Tot i així, 15 participants de la nostra població d'estudi van rebre perfusió glucosalina enlloc de nutrició parenteral. Tots ells eren nadons "sans" a pesar del naixement prematur, sense necessitat de suport respiratori, amb una bona puntuació Z de pes al néixer i una ràpida tolerància enteral. En aquest grup de pacients, vam descriure una major pèrdua de pes inicial, però no vam descriure diferències estadísticament significatives en quan a canvi de puntuació Z de pes o incidència de fracàs de creixement a l'alta respecte als nounats prematurs de les mateixes setmanes de gestació que si van rebre nutrició parenteral. En línies generals, es considera que un suport nutricional optimitzat es relaciona amb un milloria en el creixement del pacient molt prematur, i la literatura dels últims anys recolza administrar nutrició parenteral "agressiva" en aquest nadons (235,296,297). Creiem que no hem descrit diferències perquè probablement aquest subgrup de pacients estava molt seleccionat i per falta de potència estadística. Aquesta tendència és concordant amb l'interès internacional en implementar una nutrició enteral total ràpida en pacients molt prematurs de menor risc, tal i com es porta a terme actualment en la investigació de Mitchell *et al* (298). És possible que els seus resultats puguin donar base a aquesta pràctica, però en el moment actual aquesta recomanació no està recollida a les guies disponibles.

5.2. NUTRICIÓ ENTERAL

La taxa de lactància amb llet de la pròpia mare era menor al 80% la primera setmana, fet que canviava a partir de la segona, on es mantenia de forma constant per sobre del 85% en aquesta cohort seleccionada. Tot i el criteri d'inclusió, pel que la producció de llet materna havia de ser major a les necessitats del nounat participant, aquest era difícil de determinar dia a dia per la irregularitat en la disponibilitat/necessitat de la llet materna pròpia (mares que no acudien a la unitat tots els dies, mares que tenien una producció làctia irregular, canvis bruscs en l'alimentació del nadó per incidències clíniques, etc).

En la nostra cohort, l'alimentació enteral es va començar de forma molt precoç comparat amb altres estudis (176,280), amb prop del 95% de recents nascut molt prematurs rebent-la dins de les primeres 48 hores de vida. Això es va seguir d'una adequada progressió amb un assoliment de la nutrició enteral completa (definida com a major a 120 ml/kg/dia) al final de la primera setmana de mitjana i amb ingestes que superen els 135 ml/kg/dia de mediana a partir de la segona setmana; a diferència, per exemple, de l'estudi publicat per Cabrera Lafuente *et al.* en una altre cohort de 176 nounats molt prematurs espanyols (88).

5.3. INGESTA ENTERAL DE MACRONUTRIENTS

La ingesta subòptima de proteïnes, energia i altres nutrients pot tenir repercussions negatives a nivell de creixement i neurodesenvolupament en el nounat molt prematur (18,172,176,208,299).

En la nostra cohort, vam descriure que a partir de la segona setmana, la mitjana d'ingesta de proteïnes s'apropava als 3,5 g/kg/dia i la d'energia superava els 110 kcal/kg/dia, similar a descrita per altres autors (300,301); no obstant, una troballa a destacar era una ràtio proteïna/energia persistentment per sota de les recomanacions

DISCUSSIÓ

oficials de l'ESPGHAN, que probablement tradueix que els nounats molt prematurs de la nostra població tendien a tenir una major aportació calòrica, que no pas proteica.

S'ha estimat que els requeriments d'aminoàcids necessaris per al creixement i síntesis de proteïnes varien en funció de les setmanes de gestació: entre les 24 i les 30 setmanes, són de 3,6 a 4,8 g/kg/dia; entre les 30 i les 36 setmanes, són de 2-3 g/kg/dia; i al terme, són 1,5-2 g/kg/dia (295) i que la ingesta mínima de proteïna després d'un part prematur hauria de ser almenys de 3 g/kg/dia (302,303). La bibliografia suggereix que ingestes energètiques inferiors a 100 kcal/kg/dia són insuficients per cobrir les necessitats del nounat molt prematur (304); i que, ingestes d'energia més altes (entre 140-150 kcal/kg/dia) semblarien segures però podrien comportar un dipòsit excessiu de massa grassa (303). En la nostra cohort, a la quarta setmana de vida, una cinquena part dels pacients alimentats exclusivament amb enteral rebien menys de 3 g/kg/dia de proteïna i només 7,1% menys de 100 kcal/kg/dia. Es creu, a més, que no només la ingesta aïllada d'un nutrient és important per al creixement i el desenvolupament dels òrgans, sinó que es necessita una proporció proteïna/energia adequada (295). Quan la ràtio proteïna/energia es manté entre aproximadament 3 i 3,6 g/100 kcal sembla que percentatge de massa magra i grassa seria pròxim tan a les referències intrauterines com de nadons a terme (304). En la nostra cohort, el percentatge a la quarta setmana per sota d'aquestes recomanacions de ràtio augmenta fins al 65,7%.

Varis autors han explorat la ingesta de macronutrients dels nounats molt prematurs i les han comparat amb les recomanacions nutricional oficials, amb troballes similars a les nostres, amb una inadequada ingesta de proteïnes, especialment en les primeres setmanes de vida (21,172,176,250,305). Tanmateix, respecte la ingesta d'energia, alguns autors reporten que normalment es compleixen les recomanacions (250,306) i d'altres mostren una ingesta insuficient (307,308). S'ha de tenir en compte que pocs estudis reporten les ingestes reals de macronutrients de la llet materna, sinó que treballen amb ingestes estimades, per la dificultat en determinar la seva composició en la pràctica clínica (250). En l'assaig clínic de Tonkin *et al.* de l'any 2018 es comparaven dos règims de fortificació amb diferent càrrega proteica i es va trobar que, encara que

els nounats prematurs de més de 1000g assolien les ingestes proteiques recomanades a la primera setmana, els nounats prematurs de menys de 1000g no ho feien fins a la tercera setmana (305). McLeod *et al.* va descriure l'any 2013 en un grup 36 nounats molt prematurs que no s'assolien les ingestes proteiques recomanades fins a la tercera setmana i les ingestes de ràtio proteïna/energia fins la quarta, utilitzant la concentració de macronutrients real de la llet. Va postular que una de les possibles causes d'aquestes deficiències acumulades, tot i la fortificació estàndard de la llet humana, era la variabilitat en la composició de la llet materna i va proposar l'ús de règims de fortificació estratificats per edat gestacional i l'ús d'analitzadors de llet per auditar la nutrició enteral (172).

Un resultat que crida l'atenció del nostre estudi és que, a pesar d'aquesta ràpida progressió de la nutrició enteral (que implica que en la majoria de casos s'arriba a volums de 80-100 ml/kg/dia dins de la primera setmana de vida), la mitjana d'inici de la fortificació és de $10,2 \pm 5,5$ dies. Podrien plantejar-se diferents solucions per optimitzar les aportacions proteiques. Les dues estratègies actualment més conegudes són la fortificació ajustada i la fortificació individualitzada. La fortificació ajustada, en base a l'anàlisi seriada d'urea dels nadons, ha demostrat ser una estratègia relativament senzilla i útil per adequar la capacitat metabòlica; tanmateix, un assaig que utilitzava aquest mètode va revelar que les ingestes proteiques podrien ser inferior a les esperades (250) i, a més, cal recordar que la determinació d'urea requereix d'analítiques seriades. La fortificació individualitzada podria disminuir el risc d'infra/sobrealimentar als nadons, ja que afegiria la quantitat necessària d'un nutrient en funció de la composició específica de la llet materna, però l'anàlisi de la llet és una tasca que requereix molt de temps i la seva aplicació clínica a la pràctica habitual pot ser limitada (75,86,309). Una altra possible solució per aquest problema seria plantejar una variant de la fortificació individualitzada, que seria la fortificació "doble", amb un fortificant multicomponent i un reforç amb un fortificant proteic. Aquest règim de fortificació es podria aplicar en els casos amb menor densitat proteica a la llet (fet que significa que els analitzadors de llet materna serien necessaris en la pràctica clínica), en nounats de menor edat gestacional o en aquells que presentessin caigudes rellevants de puntuacions Z, però són necessaris més estudis que avaluïn aquesta pràctica.

DISCUSSIÓ

Un punt fort del treball que presentem és que els càlculs d'ingesta enteral es van fer majoritàriament a partir de la composició real - no estimada - de la llet materna i del volum ingerit - no prescrit - pel pacient; ja que, en moltes ocasions, les ingestes recomanades no són les pautades, i les prescrites tampoc les ingerides perquè l'estat clínic del pacient canvia (176,235). Les interrupcions evitables en la alimentació enteral, per exemple, disminueixin les aportacions i poden interferir en el creixement del nounat prematur (235,310). De fet, segons els nostres resultats, més d'un quart dels pacient van patir almenys una interrupció de la nutrició enteral durant l'ingrés, percentatge similar al publicat per altres autors (235,310).

6. AFECTACIÓ DEL CREIXEMENT SEGONS LA INGESTA ENTERAL DE PROTEÏNES I ENERGIA

Tot i que el creixement postnatal dels nounats molt prematurs ha millorat en les últimes dos dècades (22), segueix sent una patologia prevalent i, a més, alguns autors han descrit un guany ponderal més lent entre els nadons alimentats amb llet humana fortificada en comparació amb els nadons prematurs alimentats amb fórmula, subratllant que existeix un espai de millora en la provisió de nutrients durant l'ús de llet materna pròpia i de llet de donant (311,312). És important ampliar el coneixement que tenim respecte a l'associació entre l'alimentació a base de llet humana i el creixement postnatal del nadó prematur.

En el nostre estudi, existien algunes associacions entre la concentració de macronutrients en la llet i la ingesta enteral amb l'evolució somatomètrica. Una major concentració de proteïnes de la llet materna durant el primer mes es relacionava amb una menor caiguda de la puntuació Z de pes als 28 dies de vida i a les 36 setmanes d'edat postmenstrual. La ingesta proteica i energètica del primer mes influïa en el creixement del perímetre cranial als 28 dies de vida i a les 36 setmanes d'edat postmenstrual (amb un efecte petit en el cas de l'energia), però no amb l'evolució del pes i la longitud. Amb els anàlisis ajustats per edat gestacional, antecedent de retràs de creixement intrauterí i comorbilitats associades a la prematuritat, la mitjana de concentració proteica de la llet materna del primer mes tenia un paper predictor en el canvi de puntuació Z de pes als 28 dies de vida i de perímetre cranial a les 36 setmanes d'edat postmenstrual.

Existeix una manca d'estandardització a l'hora de reportar les possibles associacions entre ingesta enteral (mesurades vs estimades, diàries vs acumulades, etc) i creixement (com ja s'ha comentat prèviament) i és difícil comparar resultats entre estudis (18,21,88,172,188,208,209,235,300,313). Alguns autors treballen amb guany ponderal enlloc de canvi de puntuació Z; així, per exemple, McLeod *et al.* estimen que cada 1g/dl/dia extra d'ingesta proteica equivaldria a 1 g/kg/dia de guany ponderal (314), Yi-Hsuan *et al.* que equivaldria a 3,6 g/kg/dia (209) o Ernst *et al.* que equivaldria

DISCUSSIÓ

a 6,5 g/dia (313). Altres, com Hu *et al.*, comparen 2 cohorts de infants de molt baix pes al néixer afectes o no de restricció del creixement (definida com pes menor al percentil 10 a l'alta) i descriuen en el primer grup les ingestes enterals de proteïnes i energia eren significativament menors (235). Cal tenir en compte que els dissenys retrospectius en el camp que ens pertoca tenen l'inconvenient que poden no determinar correctament si el pacient rep menys nutrients perquè està més malalt, o està més malat i per això rep menys nutrients.

Respecte aquells treballs que comparteixen més similituds metodològiques amb la present tesi, les troballes referents a les relacions existents entre la ingesta enteral de macronutrients i el creixement primerenc dels nadons prematurs són discordants (88,188,208,288,300).

Hi ha varis autors que descriuen associacions més o menys fortes entre la ingesta enteral proteica i el canvi de puntuació Z de pes, tant al voltant del mes de vida com en el nostre treball (188), com a l'edat equivalent al terme (21,300,315) a diferència de nosaltres. Power *et al.* van descriure en 116 prematurs menors de 30 setmanes de gestació que una major ingesta proteica s'associava amb una menor caiguda de puntuació Z de pes entre el naixement i l'edat equivalent a terme. En el seu estudi es tenien en compte les provisions tant per via parenteral com per via enteral, mentre que nosaltres, tot i que els anàlisis s'han ajustat en funció dels dies de nutrició parenteral, no hem entrat en detall en aquest aspecte (21). No obstant, en estudis previs en cohorts similars a la nostra, l'efecte de les aportacions de macronutrients per via parenteral tenien un efecte sobre el creixement precoç (primers 28 dies de vida) però no sobre el creixement tardà (a l'alta) (189). Han *et al.* van descriure en una cohort de 133 nounats prematurs de 28 a 31 setmanes de gestació, que cada 1 g/kg/dia més d'ingesta proteica durant els primers 28 dies s'associava amb un increment de 0,5 punts de puntuació Z de pes respectivament a l'edat equivalent a terme. Tot i que les seves associacions són més fortes que les descrites per nosaltres, cal tenir en compte la seva població d'estudi era molt més seleccionada, amb criteris d'inclusió més restrictius que no incloïen ni prematurs menors de 28 setmanes de gestació ni afectes de retràs de creixement intrauterí ni comorbiditats com ara la

displàsia broncopulmonar (300) possiblement minimitzant el paper de la immaduresa i de la malaltia en el creixement postnatal.

A diferència de les nostres troballes, alguns autors també han descrit que les provisions calòriques tenen un efecte positiu sobre el canvi de puntuació Z de pes a l'edat equivalent al terme (188,208,300). Belfort *et al.* van descriure l'any 2020 que per cada 10 kcal/kg/dia existia una milloria de 0,62 punts. En el seu treball, les correlacions entre concentració de macronutrients de la llet materna i ingestes enterals diàries eren més fortes, però cal remarcar que els seus càlculs d'ingesta no inclouen la fortificació, i cal emfatitzar també que analitzaven la llet administrada a l'infant enlloc de llet extreta per la mare (208). Saénz de Pipaón *et al.* van descriure una associació entre la ingesta enteral d'energia i una menor caiguda de puntuació Z de pes a les 36 setmanes de edat postmenstrual, però els càlculs d'ingesta de macronutrients es basaven en estimacions (no en mesures reals) (188).

No vam trobar correlacions entre la ingesta de macronutrients i l'evolució longitudinal dels participants. Alguns autors tampoc troben aquestes correlacions (21,88,188,300), però Belfort *et al.* si, descrivint una milloria de 0,84 puntuacions Z de longitud a l'edat equivalent a terme per cada g/kg/dia més de proteïna (208).

Alguns factors poden haver influenciat en el fet que les associacions descrites entre ingesta enteral i creixement siguin menors a les esperades. És possible que en els nostres centres les pràctiques nutricionals siguin menys homogènies a l'esperat i, tot i que la concentració de macronutrients de la llet materna sigui variable, el fet que els volums ingerits o el grau de fortificació siguin amplis complica la interpretació dels resultats. Fenton *et al.* i Cormack *et al.* recomanen la valoració setmanal del creixement (evolució de pes, longitud i perímetre cranial) i el reajust de l'alimentació varies vegades per setmana (comparant les ingestes parenterals i enterals amb els estàndards) (18,181). En la pràctica clínica diària, és probable que els neonatòlegs dels centres participants tendeixin a vigilar més estrictament i a nodrir amb més èmfasi aquells nadons més immadurs o més malalts, o aquells que no estant creixent adequadament, ja sigui optimitzant els volums d'ingesta i/o a la fortificació. Segons els

DISCUSSIÓ

nostres resultats, els clínics augmentaven el percentatge de fortificant a partir de la tercera o la quarta setmana de vida en aquells nadons que observaven una desviació de la corba de creixement de referència o estimaven un major risc de fracàs de creixement (per exemple, el 85% dels nounats prematurs de l'Hospital Clínic afectes amb persistència ductal o displàsia broncopulmonar van rebre fortificació al 5%). La participació de dos centres diferents i el caràcter observacional del l'estudi pot haver dificultat la detecció d'associacions entre la ingesta de macronutrients i el creixement. Tal i com disposem en els nostres centres, la disponibilitat i el compliment de protocols específics de nutrició enteral pot minimitzar les tasses de fracàs de creixement postnatal entre els pacients prematurs (316,317).

Un altre limitació seria que es va assumir que el nadó rebia la llet materna extreta concomitantment, però donada la producció irregular de les mares, la ingesta en un moment determinat podria no correspondre a la producció del mateix moment, sent aquest un punt rellevant. Així, en futurs estudis és important fer un disseny que reculli en quin moment es administra la llet mesurada.

Segons la literatura publicada, les tasses de creixement en les Unitats Neonatals milloren coherentment amb les pràctiques nutricionals (5,50,100,102,103). No obstant, cal destacar tres assaigs clínics randomitzats amb resultats inesperats. Així, Maas *et al.* no va descriure milloria en el guany ponderal ni estatural en nounats de menys de 32 setmanes de gestació i de menys de 1500g de pes amb un augment de 0,6 g/kg/dia de proteïna enteral (que equivalia a una ingesta mitjana de proteïna de 4,3 g/kg/dia) (311). En línia amb els seus resultats, i amb anterioritat, Miller *et al.* i Moya *et al.* tampoc van demostrar en els seus assaigs que un augment de la ingesta enteral de proteïnes (de 3,6 g/kg/dia a 4,2 g/kg/dia en el primer cas; un increment de 0,6 g de proteïna per cada 100 ml de llet fortificada en el segon cas) tinguessin influència en l'augment ponderal. També cal destacar el treball de Cabrera *et al.* en el què no van descriuen associacions entre la ingesta de proteïnes o energia amb el creixement. En el seu cas tenien una proporció relativament alta d'infants alimentats amb fórmula artificial. Seria d'esperar que la donada la menor variabilitat de concentració de macronutrients de la fórmula artificial i donat el fet que computen els

nutrients rebuts a través de la nutrició parenteral la seva capacitat predictora fos major (88). Conceptes a profunditzar en el futur serien avaluar la capacitat metabolitzadora que tenen els nounats molt prematurs - de forma que, tot i optimitzar la ingesta de macronutrients, podria existir un *efecte sostre* que impedís que un excés de proteïnes i energia desemboquessin en creixement somàtic - i determinar quan d'important és la ratio proteïna/energia en el processament dels nutrients. També seria possible que existís un biaix de publicació, i que estudis amb resultats inesperats pels investigadors (en aquest cas, una associació dèbil entre ingesta de macronutrients i creixement) tinguin menys probabilitat de resultar publicats.

El creixement no és un procés senzill d'investigar; està modulats per una complexa trama de factors - alguns no modificables (com la carga genètica o l'edat gestacional al néixer) i d'altres sí (com el suport nutricional rebut o les malalties presentades durant l'ingrés) (28,101,102) -, sent difícil aïllar el paper independent de cadascun perquè estan relacionats entre si (176,318). Respecte als factors nutricionals, cal tenir en compte que el nounat prematur rep l'alimentació tan per via parenteral com per via enteral, i en aquest darrer cas, pot ser alimentat mitjançant diferents tipus de llets humanes amb o sense suplementos i/o diferents fórmules artificials. Es podria hipotetitzar que no només la quantitat d'un macronutrient en si és important, sinó també els subtipus (per exemple, caseïna vs proteïnes de la llet), la proporció de cada un d'ells, la biodisponibilitat real després de la digestió (per exemple, la biodisponibilitat de les proteïnes humanes és majors que la de les proteïnes bovines) o la interacció que poden tenir aquests macronutrients amb altres components de la llet com micronutrients, hormones o factors de creixement (87,260,311). En base als nostres resultats, els factors no nutricionals jugarien un paper important, especialment la persistència ductal (ja sigui per la patologia en si o perquè els clínics restringeixen la ingesta hídrica d'aquests pacients). Sabem que certes patologies pròpies de la immaduresa i la inflamació desemboquen en un estat catabòlic, un augment de la despesa energètica i una alteració de l'absorció i de l'ús dels nutrients (41). Sabem també que l'edat gestacional i el transcurs de l'embaràs (gestació afectada de retràs de creixement intrauterí, gestació múltiple, infeccions congènites, etc) influeixen en diferent mesura i poden modular el potencial genètic individual. Caldria també

DISCUSSIÓ

dilucidar si existeixen altres factors poc coneguts que interferirien en el creixement del prematur (188) com per exemple el possible efecte de l'estrés (319). La disminució de la incidència de fracàs de creixement postnatal en el pacient prematur anirà supeditada als avenços que es produeixin tant en la nutrició, especialment amb la milloria de les estratègies de fortificació, com en el nostre coneixement de les capacitats de digestió absorció i metabolisme del prematur, i la capacitat per a disminuir les seves comorbiditats.

7. FORTALESES I LIMITACIONS

El procés de l'extracció, la manipulació i l'emmagatzematge de la llet materna poden modificar la concentració de macronutrients. Un dels punts que dona robustesa als nostres resultats és la homogeneïtat en els processos de recollida de les mostres de llet materna. S'acceptaven mostres de llet procedents d'extracció manual o d'extracció elèctrica; tot i així, l'extracció manual en les nostres unitats és molt poc freqüent i s'utilitza només durant els primers dies de vida del nadó per extreure calostre – que no s'ha recollit en el nostre estudi. Per tant, és probable que pràcticament la totalitat de les mostres del nostre treball procedeixen d'extracció elèctrica i els seus resultats en aquest sentit siguin homogenis. A més, es va intentar minimitzar la variabilitat al principi i al final de les preses i entre elles en diferents moments del dia. Es demanava a les mares que les mostres procedissin d'extraccions completes del pit (mínim 15 minuts de durada i amb la sensació de “pit buit”) per assegurar que la llet recollida contingués tan component de primera llet com de llet final, més greixosa (260). Es demanava també llet procedent de totes les extraccions del dia per amortir l'efecte que tenen els ritmes circadians de la concentració de macronutrients de la llet (97–100). Totes les instruccions es proporcionaven a les participants de forma verbal i per escrit.

Donat que tant els processos de refrigeració com d'escalfament de la llet materna poden canviar la seva composició (36,69,102,103) vam ser molt curosos en el maneig de la temperatura. Les mostres mai van ser congelades, es mantenien refrigerades un màxim de 24 hores, conservació que s'ha descrit segura (52). A l'hora de preparar les mostres pels anàlisis de macronutrients, atemperaven la llet lentament a temperatura ambient (l'habitació on es duïen a terme els anàlisis estava entre 18-25°C) per a posteriorment escalfar-la a 40°C durant 2 minuts, procés que, en principi, no altera el contingut de macronutrients.

En el moment en què es va iniciar el nostre estudi tant la homogeneïtzació manual (utilitzada en l'estudi) com la homogeneïtzació per mètodes ultrasonogràfics estaven acceptades (69,84). Treballs previs al nostre han utilitzat la homogeneïtzació manual

DISCUSSIÓ

(72,73); no obstant, la bibliografia posterior sembla ser més partidària de mètodes ultrasonogràfics (84,87,129,157). La homogeneïtzació mitjançant mètodes ultrasonogràfics és especialment recomanada en cas de treballar amb mostres congelades (84,92) i quan el temps entre la preparació de la mostra i el anàlisi és prolongat. En el nostre cas, hem treballat eminentment amb mostres fresques o mostres refrigerades durant menys de 24 hores i el temps entre la preparació i l'anàlisi de la mostra era inferior a 30 minuts. Seria esperable que si el tipus i la duració d'homogeneïtzació tingués algun efecte sobre les nostres troballes, fos sobretot a nivell de la concentració de lípids i carbohidrats (87). Per a futurs estudis, es podria utilitzar la homogeneïtzació sònica mitjançant un vibrador ultrasònic o sonicador sota les directrius de Fusch *et al.* (87): durant un mínim de 30 segons per a un ml de llet. En el moment de realització de l'estudi no estaven disponibles els kits de calibració externa de l'analitzador MIRIS.

El nombre de parelles mare-nadó que hem reclutat és elevat respecte als estudis prèviament publicats. És difícil trobar un nombre adequat de mares que no només puguin alimentar els seus nadons prematurs durant un període prolongat (88) i sinó que també estiguin disposades a participar en un estudi clínic quan pateixin una experiència estressant (151).

Per altre banda, els nostres resultats no permeten diferenciar entre calostre i llet transicional. Es va decidir esperar al final de la primera setmana de vida per a recollir la primera mostra representativa de llet per a què el nounat molt prematur tingués tot el calostre suficient abans d'oferir-li participar a l'estudi ja que en casos de part prematur la lactogènesis es pot retrassar. Els anàlisis de macronutrients de les mostres es van dur a terme de forma única. Alguns estudis confirmen els seus resultats fent anàlisis per duplicat (70) o bé comprovant els resultats amb mètodes clàssics (83), estratègia que probablement augmenta la fiabilitat dels resultats, especialment en casos amb resultats extrems, però suposen un augment en el temps i en el volum de llet necessaris. En quan a l'associació de característiques maternes i perinatals amb la composició de la llet, el fet de fer anàlisis univariants múltiples augmenta la probabilitat de descriure associacions casuals. Per aquest motiu, s'han realitzat anàlisis

multivariants i s'ha donat més pes a les troballes congruents durant el primer mes de lactància més que les troballes en un moment puntual. S'ha de precisar que el canvis de puntuació Z de pes i longitud en si mateixos són indicadors incomplets ja que no impliquen que els canvis en la composició corporal siguin els apropiats, que podria estar més relacionada amb l'índex de massa corporal. Aquest indicador està ben establert en població pediàtrica per la OMS i per l' Acadèmia Americana de Pediatria, però falten més estudis que valorin la seva aplicabilitat i valor pronòstic en nounats prematurs (320). En aquest sentit, probablement de cara a futurs estudis seria bo determinar els canvis en contingut de massa magra i grassa mitjançant un impedanciometre, sempre i quan puguin ser aplicables a la població diana (en aquest cas nadons molt prematurs).

8. APLICABILITAT I UTILITAT DELS RESULTATS OBTINGUTS

Els informes anuals de vigilància perinatal a Catalunya publicats pel Departament de Salut mostren que el percentatge de prematuritat es troba estabilitzat des de fa 20 anys, al voltant del 7%. Dins d'aquests nadons prematurs, cada any neixen aproximadament 1000 nadons de menys de 32 setmanes de gestació (3).

Pel nounat molt prematur, la nutrició en els primeres setmanes de vida és un factor determinant per la supervivència, pel creixement, pel neurodesenvolupament i per la salut a llarg termini (1,2). En aquests nadons la primera opció per a l'alimentació és la llet de la seva pròpia mare perquè ha demostrat disminuir diverses de les comorbiditats associades a la prematuritat (3–10) i millorar els resultats a nivell de neurodesenvolupament (11). L'objectiu en el maneig nutricional del nounat molt prematur ha de ser proporcionar tots els nutrients necessaris per aconseguir que la seva velocitat de creixement i la seva composició corporal siguin similars a la de un fetus sa de la seva mateixa edat gestacional (12–14). La llet humana per si sola no pot suportar l'acreció de teixits i el creixement postnatal del nounat molt prematur i la seva fortificació és un estàndard en la pràctica clínica (10,15). Tot i això, la incidència retràs de creixement extrauterí durant l'hospitalització de la unitat de cures intensives neonatals, també en les nostres, és elevat (16–18). Aquest retràs de creixement extrauterí es pot deure en part a les morbiditats associades a la immaduresa i en part a un dèficit acumulatiu d'energia i proteïnes en pacients amb poques reserves endògenes ja que no les han pogut crear durant l'últim trimestre de l'embaràs (10,19).

El nostre estudi proporciona quantioses dades longitudinals sobre les concentracions de macronutrients en llet (625 mostres) de mares que van donar a llum de forma prematura. En aquest sentit amplia els coneixements que tenim sobre la de la llet materna prematura durant les primeres setmanes de vida. Segons els nostres resultats, les concentracions mitjanes durant els 2 primers mesos de lactància en cas de part prematur serien aproximadament entre 1 i 1,5 g/dl de proteïnes i entre 65 i 75 kcal/dl d'energia. Tot i les diferències composicionals descrites en aquesta tesis, no

sembla que puguem elaborar unes directrius predictores de contingut macronutricional de la llet materna més enllà dels canvis temporals.

Els nadons de menors edat gestacional presenten un major risc de fracàs postnatal de creixement. Els nadons afectes de retràs de creixement intrauterí tenien un comportament peculiar. En aquests subgrups el control del creixement ha de ser estricte, i l'evolució seriada de la longitud i del perímetre cefàlic ens podria donar més informació que el pes aïllat.

És important que s'utilitzin i s'apliquin protocols de nutrició enteral (on es defineixi el tipus d'alimentació, l'inici precoç, la progressió i la fortificació) perquè es relacionen amb el creixement i la salut del nounat molt prematur (316,317) i, alhora, que s'adaptin a les necessitats particulars de cada pacient, en funció de les característiques pròpies i de les comorbiditats que desenvolupi durant l'ingrés (188). El nostre estudi dóna suport a la necessitat d'anàlisis de la llet humana en la pràctica clínica, que es podria focalitzar en mares amb factors associats a la producció de llet amb menor densitat nutricional (per exemple, en el cas de mares més joves i amb menor índex de massa corporal i de gestacions múltiples no afectes de retràs de creixement intrauterí, ja que podrien tenir un contingut mitjà de proteïnes més baix durant les primeres setmanes de lactància) o en els nadons amb un creixement postnatal deficient.

Els nostres resultats suggereixen que l'aportació energètica es cenyeix a les recomanacions oficials, però l'aportació proteica podria ser insuficient; ja sigui per la variabilitat intrínseca de la llet materna o per les polítiques de nutrició enteral i de fortificació. En les nostres unitats, s'hauria de mirar de no endarrerir la introducció del fortificant i caldria optimitzar les estratègies de fortificació. En la nostra cohort la ingesta calculada dels diferents macronutrients durant el primer mes tenia un impacte petit en explicar el creixement fins aquest punt i durant l'ingrés, a diferència d'alguns altres estudis, però alhora, en consonància amb altres autors.

DISCUSSIÓ

Sabem que el creixement es veu afectat tant per factors nutricionals com per factors no nutricionals; tanmateix, és probablement que també existeixin factors que no coneixem bé (com ara altres components de la llet materna, un possible efecte sobre la metabolització de macronutrients en alguns pacients i/o l'impacte de l'entorn o de la malaltia intercurrent) que requereixen de futurs estudis.

CONCLUSIONS

1. La composició de macronutrients i d'energia de la llet materna del nounat molt prematur canviava significativament en funció de la setmana de lactància i en funció d'algunes característiques materns, gestacionals i neonatals.
2. Al llarg de les primeres 4 setmanes de lactància, la concentració de proteïnes, lípids i energia disminuïa i la concentració de carbohidrats augmentava.
3. El contingut mitjà proteic i energètic de la llet materna en funció de les setmanes de lactància eren respectivament: a la setmana 1, 1,4 mg/dl i 73 kcal/dl; a la setmana 2, 1,3 mg/dl i 71 kcal/dl; a la setmana 4, 1,0 mg/dl i 67 kcal/dl; i a la setmana 8, 1,0 mg/dl i 70 kcal/dl.
4. La variabilitat composicional interindividual era elevada. Les mares més joves, amb índexs de massa corporal més baixos, amb gestacions múltiples i amb creixement intrauterí normal tendien a una menor densitat proteica.
5. L'edat gestacional es correlacionava negativament amb el contingut de proteïnes i d'energia, però els canvis detectats eren clínicament poc rellevants. Tot i així, els nadons prematurs extrems rebien significativament menys proteïna que els nadons molt prematurs entre les setmanes 30 i 34 d'edat postmenstrual.

CONCLUSIONS

6. Pràcticament tots els nounats molt prematurs participants a l'estudi van ser donats d'alta amb una puntuació Z de pes a l'alta menor que la del naixement. Més de la meitat dels nounats molt prematurs presentaven un fracàs del creixement ponderal postnatal (sota la definició establerta - caiguda de la puntuació Z des del naixement major a 1,2). L'evolució somatomètrica durant el primer mes d'ingrés corresponia un període crític respecte l'evolució posterior.
7. La restricció del creixement postnatal era més intensa en nounats prematurs extrems que en nounats molt prematurs. Els nadons que havien patit un retràs de creixement intrauterí, a pesar de què el component de restricció postnatal durant l'estada a la unitat neonatal no era tan intens, eren donats d'alta amb puntuacions Z molt baixes i sense signes de recuperació.
8. La nostra població va rebre una alimentació enteral eminentment amb llet materna de la pròpia mare, de forma precoç i amb una ràpida progressió, però hi hauria marge de millora respecte a les estratègies de fortificació.
9. Tot i que l'aportació energètica semblava seguir les recomanacions nutricionals oficials, en el cas de les aportacions proteïques, aquestes no s'assolien fins a la tercera setmana i no s'assolien en cap moment de l'ingrés en el cas de la ràtio proteïna/energia.
10. Segons els nostres resultats el creixement es veia afectat tant per factors nutricionals com per factors no nutricionals com l'edat gestacional, el diagnòstic previ de retràs de creixement intrauterí i les malalties relacionades amb la prematuritat (com la persistència ductal i la displàsia broncopulmonar).

BIBLIOGRAFIA

1. Blencowe H, Cousens S, Chou D, Oestergaard M, Say L, Moller A, *et al.* Born Too soon the global epidemiology of 15 million preterm births. *Reprod Health.* 2013;10(Suppl 1):1–14.
2. Blencowe H, Cousens S, Oestergaard MZ, Chou D, Moller AB, Narwal R, *et al.* National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: A systematic analysis and implications. *Lancet.* 2012;379(9832):2162–72.
3. Generalitat de Catalunya. Institut d'Estadística de Catalunya [Internet]. 2020 [cited 2022 Jan 14]. Available from: <http://www.idescat.cat/pub/?id=naix&n=54>
4. World Health Organization. Preterm birth [Internet]. 2018 [cited 2019 Jul 1]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/preterm-birth>
5. Shennan AT, Dunn MS, Ohlsson A, Lennox K, Hoskins EM. Abnormal pulmonary outcomes in premature infants: Prediction from oxygen requirement in the neonatal period. *Pediatrics.* 1988;82(4):527–32.
6. Ehrenkranz RA, Walsh MC, Vohr BR, Jobe AH, Wright LL, Fanaroff AA, *et al.* Validation of the National Institutes of health consensus definition of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics.* 2005;116(6):1353–60.
7. Baraldi E, Filippone M. Chronic Lung Disease after Premature Birth. *N Engl J Med.* 2007;357(19):1946–55.
8. Neu J. Necrotizing enterocolitis. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2018;23(6):369.
9. Bell MJ, Book LS, Overall JC. Neonatal Necrotizing Enterocolitis. *N Engl J Med.* 1978;298(5):281–2.
10. Horbar JD, Badger GJ, Carpenter JH, Fanaroff AA, Kilpatrick S, Lacorte M, *et al.* Trends in mortality and morbidity for very low birth weight infants, 1991-1999. *Pediatrics.* 2002;110(1 I):143–51.
11. Greenberg RG, Kandefor S, Do BT, Smith PB, Stoll BJ, Bell EF, *et al.* Late-onset Sepsis in Extremely Premature Infants: 2000-2011. *Pediatr Infect Dis J.* 2017;36(8):774–9.
12. McNamara PJ, Sehgal A. Towards rational management of the patent ductus arteriosus: The need for disease staging. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2007;92(6):F424-7.

BIBLIOGRAFIA

13. Hartnett ME, Penn JS. Mechanisms and Management of Retinopathy of Prematurity. *N Engl J Med.* 2012;367(26):2515–26.
14. Hellström A, Smith LEH, Dammann O. Retinopathy of Prematurity. *Lancet.* 2013;382(9902):1445–57.
15. Volpe JJ. *Neurology of the Newborn.* 4th Editio. Elsevier, editor. Philadelphia: WB Saunders Company; 2001.
16. Parodi A, Govaert P, Horsch S, Bravo MC, Ramenghi LA, Agut T, *et al.* Cranial ultrasound findings in preterm germinal matrix haemorrhage, sequelae and outcome. *Pediatr Res.* 2020;87:13–24.
17. de Vries LS, Eken P, Dubowitz LMS. The spectrum of leukomalacia using cranial ultrasound. *Behav Brain Res.* 1992;49(1):1–6.
18. Cormack BE, Embleton ND, Van Goudoever JB, Hay WW, Bloomfield FH. Comparing apples with apples: It is time for standardized reporting of neonatal nutrition and growth studies. *Pediatr Res.* 2016;79(6):810–20.
19. 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.
20. Villar J, Giuliani F, Barros F *et al.* Monitoring the Postnatal Growth of Preterm Infants: A Paradigm Change. *Pediatrics.* 2018;141(2):e20172467.
21. Power VA, Spittle AJ, Lee KJ, Anderson PJ, Thompson DK, Doyle LW, *et al.* Nutrition, Growth, Brain Volume, and Neurodevelopment in Very Preterm Children. *J Pediatr.* 2019;215:50-55.e3.
22. Horbar JD, Ehrenkranz RA, Badger GJ, Edwards EM, Morrow KA, Soll RF, *et al.* Weight Growth Velocity and Postnatal Growth Failure in Infants 501 to 1500 Grams: 2000-2013. *Pediatrics.* 2015;136(1):e84–92.
23. Wittwer A, Hascoët JM. Impact of introducing a standardized nutrition protocol on very premature infants' growth and morbidity. *PLoS One.* 2020;15(5):1–12.
24. Brennan A-MM, Murphy BP, Kiely ME. Optimising preterm nutrition: present and future. *Proc Nutr Soc.* 2016;75(02):154–61.
25. Ehrenkranz RA, Younes N, Lemons JA, Fanaroff AA, Donovan EF, Wright LL, *et al.* Longitudinal Growth of Hospitalized Very Low Birth Weight Infants. *Pediatrics.* 2004;104(2):280–9.
26. Neu J. Gastrointestinal Maturation and Feeding. *Semin Perinatol.* 2006;30(2):77–80.
27. Neu J. Gastrointestinal development and meeting the nutritional needs of premature infants. *Am J Clin Nutr.* 2007;85(2):629S-634S.

28. Mihatsch W, Shamir R, van Goudoever JB, Fewtrell M, Lapillonne A, Lohner S, *et al.* ESPGHAN/ESPEN/ESPR/CSPEN guidelines on pediatric parenteral nutrition: Guideline development process for the updated guidelines. *Clin Nutr.* 2018;37(6):2306–8.
29. van Goudoever JB, Carnielli V, Darmaun D, Sainz de Pipaon M, Braegger C, Bronsky J, *et al.* ESPGHAN/ESPEN/ESPR/CSPEN guidelines on pediatric parenteral nutrition: Amino acids. *Clin Nutr.* 2018;37(6):2315–23.
30. Lapillonne A, Fidler Mis N, Goulet O, van den Akker CHP, Wu J, Koletzko B, *et al.* ESPGHAN/ESPEN/ESPR/CSPEN guidelines on pediatric parenteral nutrition: Lipids. *Clin Nutr.* 2018;37(6):2324–36.
31. Mesotten D, Joosten K, van Kempen A, Verbruggen S, Braegger C, Bronsky J, *et al.* ESPGHAN/ESPEN/ESPR/CSPEN guidelines on pediatric parenteral nutrition: Carbohydrates. *Clin Nutr.* 2018;37(6):2337–43.
32. Joosten K, Embleton N, Yan W, Senterre T, Braegger C, Bronsky J, *et al.* ESPGHAN/ESPEN/ESPR/CSPEN guidelines on pediatric parenteral nutrition: Energy. *Clin Nutr.* 2018;37(6):2309–14.
33. Jochum F, Moltu SJ, Senterre T, Nomayo A, Goulet O, Iacobelli S, *et al.* ESPGHAN/ESPEN/ESPR/CSPEN guidelines on pediatric parenteral nutrition: Fluid and electrolytes. *Clin Nutr.* 2018;37(6):2344–53.
34. Agostoni AC, Buonocore G, Carnielli VP, De Curtis M, Darmaun D, Decsi T, *et al.* Enteral Nutrient Supply for Preterm Infants: Commentary From the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Committee on Nutrition for the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010;1:85–91.
35. Dutta S, Singh B, Chessell L, Wilson J, Janes M, McDonald K, *et al.* Guidelines for feeding very low birthweight infants. *Nutrients.* 2015;7(1):423–42.
36. Ballard O, Morrow AL. Human Milk Composition. *Nutrients and Bioactive Factors.* *Pediatr Clin North Am.* 2013;60(1):49–74.
37. Lucas A, Cole TJ. Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis. *Lancet.* 1990;336(8730):1519–23.
38. De Silva A, Jones PW, Spencer SA. Does human milk reduce infection rates in preterm infants? A systematic review. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2004;89(6):509–13.
39. Ginovart G, Gich I, Verd S. Human milk feeding protects very low-birth-weight infants from retinopathy of prematurity: a pre–post cohort analysis. *J Matern Neonatal Med.* 2016;29(23):3790–5.

BIBLIOGRAFIA

40. Vázquez DC, García SS, Renau MI, Iglesias-Platas I. Availability of donor milk for very preterm infants decreased the risk of necrotizing enterocolitis without adversely impacting growth or rates of breastfeeding. *Nutrients*. 2019;11(8):1895.
41. 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(6):1–35.
42. Lechner BE, Vohr BR. Neurodevelopmental Outcomes of Preterm Infants Fed Human Milk: A Systematic Review. *Clin Perinatol*. 2017;44(1):69–83.
43. Arslanoglu S, Corpeleijn W, Moro G, Braegger C, Campoy C, Colomb V, *et al*. Donor human milk for preterm infants: Current evidence and research directions. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2013;57(4):535–42.
44. Maas C, Mitt S, Full A, Arand J, Bernhard W, Poets CF, *et al*. A historic cohort study on accelerated advancement of enteral feeding volumes in very premature infants. *Neonatology*. 2012;103(1):67–73.
45. Morgan J, Young L, Mcguire W. Delayed introduction of progressive enteral feeds to prevent necrotising enterocolitis in very low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;2014(12):CD001970.
46. Dorling J, Abbott J, Berrington J, Bosiak B, Bowler U, Boyle E, *et al*. Controlled Trial of Two Incremental Milk-Feeding Rates in Preterm Infants. *N Engl J Med*. 2019;381(15):1434–43.
47. Geary E. Risk of necrotizing enterocolitis and feeding interventions for preterm infants with abnormal umbilical artery Doppler. *Neonatal Netw*. 2013;32(1):5–15.
48. Kwok TC, Dorling J, Gale C. Early enteral feeding in preterm infants. *Semin Perinatol*. 2019;43(7):151159.
49. Buhimschi CS. Endocrinology of lactation. Vol. 31, *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*. 2004. p. 963–79.
50. Neville MC. Physiology of lactation. *Clin Perinatol*. 1999;26(2):251–79.
51. Sampieri CL, Montero H. Breastfeeding in the time of Zika: A systematic literature review. *PeerJ*. 2019;7:e6452.
52. Pham Q, Patel P, Baban B, Yu J, Bhatia J. Factors Affecting the Composition of Expressed Fresh Human Milk. *Breastfeed Med*. 2020;15(9):551–8.
53. Jones E, Spencer SA. Why is preterm milk expression so difficult? *Infant*. 2005;1(3):77–80.
54. Linzell JL, Peaker M. Mechanism of milk secretion. *Physiol Rev*. 1971;51(3):564–97.

55. Davis JPTJ. Physiology, Lactation [Internet]. World Health Organization. 2020 [cited 2021 Oct 11]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499981/>
56. Nommsen-Rivers LA, Chantry CJ, Pearson JM, Cohen RJ, Dewey KG. Delayed onset of lactogenesis among first-time mothers is related to maternal obesity and factors associated with ineffective breastfeeding. *Am J Clin Nutr.* 2010;92(3):574–84.
57. Lubetzky R, Argov-Argaman N, Mimouni FB, Armoni Domany K, Shiff Y, Berkovitz Z, *et al.* Higher leptin but not human milk macronutrient concentration distinguishes normal-weight from obese mothers at 1-month postpartum. *PLoS One.* 2016;29(12):1–11.
58. Forster DA, Jacobs S, Amir LH, Davis P, Walker SP, McEgan K, *et al.* Safety and efficacy of antenatal milk expressing for women with diabetes in pregnancy: Protocol for a randomised controlled trial. *BMJ Open.* 2014;4(10):1–9.
59. Scott JA, Binns CW, Oddy WH. Predictors of delayed onset of lactation. *Matern Child Nutr.* 2007;3(3):186–93.
60. Henderson JJ, Hartmann PE, Newnham JP, Simmer K. Effect of preterm birth and antenatal corticosteroid treatment on lactogenesis II in women. *Pediatrics.* 2008;121(1):e92-100.
61. Andreas NJ, Kampmann B, Mehring Le-Doare K. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Hum Dev.* 2015;91(11):629–35.
62. Haschke F, Haiden N, Thakkar SK. Nutritive and bioactive proteins in breastmilk. *Ann Nutr Metab.* 2017;69(2):17–26.
63. Mosca F, Gianni ML. Human milk: composition and health benefits. *Pediatr Med Chir.* 2017;39(2):155.
64. Contarini G, Povolo M. Phospholipids in milk fat: Composition, biological and technological significance, and analytical strategies. *Int J Mol Sci.* 2013;14(2):2808–31.
65. Uauy R, Mena P, Rojas C. Essential fatty acids in early life: structural and functional role Essential fatty acids: Docosahexaenoic acid: Peroxisome proliferator-activated receptor: Gene expression: Retinal development. *Proc Nutr Soc.* 2018;59:3–15.
66. Smilowitz JT, Lebrilla CB, Mills DA, German JB, Freeman SL. Breast milk oligosaccharides: Structure-function relationships in the neonate. *Annu Rev Nutr.* 2014;34:143–69.
67. 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.

BIBLIOGRAFIA

68. Mimouni FB, Lubetzky R, Yochpaz S, Mandel D. Preterm Human Milk Macronutrient and Energy Composition: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin Perinatol*. 2017;44(1):165–72.
69. Boyce C, Watson M, Lazidis G, Reeve S, Dods K, Simmer K, *et al*. Preterm human milk composition: a systematic literature review. *Br J Nutr*. 2016;116(06):1033–45.
70. Fumeaux CF, Garcia-Rodenas C, Castro C De, Courtet-Compondu M, Thakkar S, Beauport L, *et al*. Longitudinal Analysis of Macronutrient Composition in Preterm and Term Human Milk: a prospective Cohort Study. *Nutrients*. 2019;11(7):1525.
71. Burianova I, Bronsky J, Pavlikova M, Janota J, Maly J. Maternal body mass index, parity and smoking are associated with human milk macronutrient content after preterm delivery. *Early Hum Dev*. 2019;137:104832.
72. Dritsakou K, Liosis G, Valsami G, Polychronopoulos E, Skouroliakou M. The impact of maternal- and neonatal-associated factors on human milk's macronutrients and energy. *J Matern Neonatal Med*. 2017 Jun;30(11):1302–8.
73. Bulut Ö, Çoban A, İnce Z. Macronutrient analysis of preterm human milk using mid-infrared spectrophotometry. *J Perinat Med*. 2019;47(7):785–91.
74. Gates A, Marin T, Leo G De, Stansfield BK. Review of Preterm Human-Milk Nutrient Composition. *Nutr Clin Pract*. 2021;36(6):1136–72.
75. Menjo A, Mizuno K, Murase M, Nishida Y, Taki M, Itabashi K, *et al*. Bedside analysis of human milk for adjustable nutrition strategy. *Acta Paediatr Int J Paediatr*. 2009;98(2):380–4.
76. Fusch G, Kwan C, Kotrri G, Fusch C. “Bed Side” Human Milk Analysis in the Neonatal Intensive Care Unit: A Systematic Review. *Clin Perinatol*. 2017;44(1):209–67.
77. Smilowitz JT, Gho DS, Mirmiran M, German JB, Underwood MA. Rapid measurement of human milk macronutrients in the neonatal intensive care unit: Accuracy and precision of fourier transform mid-infrared spectroscopy. *J Hum Lact*. 2014;30(2):180–9.
78. Bzikowska-Jura A, Czerwonogrodzka-Senczyna A, Olędzka G, Szostak-Węgierek D, Weker H, Wesołowska A. Maternal Nutrition and Body Composition During Breastfeeding: Association with Human Milk Composition. *Nutrients*. 2018;10(10):1379.
79. Horwitz W LG. Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th ed. Aoac Intl, editor. Gaithersburg: AOAC; 2010.

80. Parat S, Groh-Wargo S, Merlino S, Wijers C, Super DM. Validation of mid-infrared spectroscopy for macronutrient analysis of human milk. *J Perinatol.* 2017;37(7):822–6.
81. Billard H, Simon L, Desnots E, Sochard A, Boscher C, Riaublanc A, *et al.* Calibration Adjustment of the Mid-infrared Analyzer for an Accurate Determination of the Macronutrient Composition of Human Milk. *J Hum Lact.* 2016;32(3):NP19–27.
82. De Luca A, Frasquet-Darrieux M, Gaud MA, Christin P, Boquien CY, Millet C, *et al.* Higher leptin but not human milk macronutrient concentration distinguishes normal-weight from obese mothers at 1-month postpartum. *PLoS One.* 2016;11(12):1–11.
83. Groh-Wargo S, Valentic J, Khaira S, Super DM, Collin M. Human Milk Analysis Using Mid-Infrared Spectroscopy. *Nutr Clin Pract.* 2016;31(2):266–72.
84. García-Lara NR, Escuder-Vieco D, García-Algar O, De La Cruz J, Lora D, Pallás-Alonso C. Effect of freezing time on macronutrients and energy content of breastmilk. *Breastfeed Med.* 2012;7(4):295–301.
85. Silvestre D, Fraga M, Gormaz M, Torres E, Vento M. Comparison of mid-infrared transmission spectroscopy with biochemical methods for the determination of macronutrients in human milk. *Matern Child Nutr.* 2014;10(3):373–82.
86. Casadio YS, Williams TM, Lai CT, Olsson SE, Hepworth AR, Hartmann PE. Evaluation of a mid-infrared analyzer for the determination of the macronutrient composition of human milk. *J Hum Lact.* 2010;26(4):376–83.
87. 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(3):465–76.
88. Lafuente MC, Teresa Montes Bueno M, Pastrana N, Segovia C, Jarabo RM, Martín CR, *et al.* A prospective analysis of intake and composition of mother's own milk in preterm newborns less than 32 weeks' gestational age. *J Perinat Med.* 2019;47(1):106–13.
89. Giuffrida F, Austin S, Cuany D, Sanchez-Bridge B, Longet K, Bertschy E, *et al.* Comparison of macronutrient content in human milk measured by mid-infrared human milk analyzer and reference methods. *J Perinatol.* 2019;39(3):497–503.
90. Kreissl A, Zwiauer V, Repa A, Binder C, Thanhaeuser M, Jilma B, *et al.* Human Milk Analyser shows that the lactation period affects protein levels in preterm breastmilk. *Acta Paediatr Int J Paediatr.* 2016;105(6):635–40.
91. Bourlieu C, Michalski MC. Structure-function relationship of the milk fat globule. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2015;18(2):118–27.

BIBLIOGRAFIA

92. Zhu M, Yang Z, Ren Y, Duan Y, Gao H, Liu B, *et al.* Comparison of macronutrient contents in human milk measured using mid-infrared human milk analyser in a field study vs. chemical reference methods. *Matern Child Nutr.* 2017;13(1):1–9.
93. Coppa G V., Gabrielli O, Pierani P, Catassi C, Carlucci A, Giorgi PL. Changes in carbohydrate composition in human milk over 4 months of lactation. *Pediatrics.* 1993;91(3):637–41.
94. Agelet LE, Hurburgh CR. A tutorial on near infrared spectroscopy and its calibration. *Crit Rev Anal Chem.* 2010;40(4):246–60.
95. 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(7):2121–8.
96. Mangel L, Ovental A, Batscha N, Arnon M, Yarkoni I, Dollberg S. Higher Fat Content in Breastmilk Expressed Manually: A Randomized Trial. *Breastfeed Med.* 2015;10(7):352–4.
97. White RD. Circadian Variation of Breast Milk Components and Implications for Care. *Breastfeed Med.* 2017;12(7):398–400.
98. Moran-Lev H, Mimouni FB, Ovental A, Mangel L, Mandel D, Lubetzky R. Circadian Macronutrients Variations over the First 7 Weeks of Human Milk Feeding of Preterm Infants. *Breastfeed Med.* 2015;10(7):366–70.
99. Lubetzky R, Littner Y, Mimouni FB, Dollberg S, Mandel D, Lubetzky R, *et al.* Circadian Variations in Fat Content of Expressed Breast Milk from Mothers of Preterm Infants. *J Am Coll Nutr.* 2006;25(2):151–4.
100. Paulaviciene IJ, Liubsys A, Molyte A, Eidukaite A, Usonis V. Circadian changes in the composition of human milk macronutrients depending on pregnancy duration: A cross-sectional study. *Int Breastfeed J.* 2020;15(1):49.
101. da Silva CBM, do Valle BV, de Matos ÚMA, Villarosa do Amaral YN di, Moreira MEL, Vieira AA. Influence of different breast expression techniques on human colostrum macronutrient concentrations. *J Perinatol.* 2021;41(5):1065–8.
102. Takahashi K, Mizuno K, Itabashi K. The freeze-thaw process and long intervals after fortification denature human milk fat globules. *Am J Perinatol.* 2012;29(4):283–8.
103. Halleux V De, Rigo J. Variability in human milk composition: benefit of individualized. *Am J Clin Nutr.* 2013;98(supplement):529S-535S.
104. Quinn EA. Centering human milk composition as normal human biological variation. *Am J Hum Biol.* 2021;33(1):1–16.
105. Colaizy TT. Effects of milk banking procedures on nutritional and bioactive components of donor human milk. *Semin Perinatol.* 2021;45(2):151382.

106. 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.
107. Paduraru L, Zonda GI, Avasiloaiei AL, Moscalu M, Dimitriu DC, Stamatina M. Influence of refrigeration or freezing on human milk macronutrients and energy content in early lactation: Results from a tertiary centre survey. *Paediatr Child Heal.* 2019;24(4):250–7.
108. Bertino E, Giribaldi M, Baro C, Giancotti V, Pazzi M, Peila C, *et al.* Effect of prolonged refrigeration on the lipid profile, lipase activity, and oxidative status of human milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2013;56(4):390–6.
109. García-Lara NR, Escuder-Vieco D, Alonso Díaz C, Vázquez Román S, De La Cruz-Bértolo J, Pallás-Alonso CR. Type of homogenization and fat loss during continuous infusion of human milk. *J Hum Lact.* 2014;30(4):436–41.
110. Miller EM, Aiello MO, Fujita M, Hinde K, Milligan L, Quinn EA. Field and laboratory methods in human milk research. *Am J Hum Biol.* 2013;25(1):1–11.
111. Pines N, Mandel D, Mimouni FB, Moran Lev H, Mangel L, Lubetzky R. The effect of between-breast differences on human milk macronutrients content. *J Perinatol.* 2016;36(7):549–51.
112. Ghoshal B, Lahiri S, Kar K, Sarkar N. Changes in biochemical contents of expressed breast milk on refrigerator storage. *Indian Pediatr.* 2012;49(10):836–7.
113. Castellote C, Casillas R, Ramirez-Santana C, Perez-Cano FJ, Castell M, Moretones MG, *et al.* Premature Delivery Influences the Immunological Composition of Colostrum and Transitional and Mature Human Milk. *J Nutr.* 2011;141(6):1181–7.
114. Sahin S, Ozdemir T, Katipoglu N, Akcan ABB, Turkmen MK, Kaynak Turkmen M. Comparison of Changes in Breast Milk Macronutrient Content During the First Month in Preterm and Term Infants. *Breastfeed Med.* 2020;15(1):1–7.
115. Hascoët JM, Chauvin M, Pierret C, Skweres S, Van Egroo LD, Rougé C, *et al.* Impact of maternal nutrition and perinatal factors on breast milk composition after premature delivery. *Nutrients.* 2019;11(2):1–8.
116. Hsu YC, Chen CH, Lin MC, Tsai CR, Liang JT, Wang TM. Changes in preterm breast milk nutrient content in the first month. *Pediatr Neonatol.* 2014;55(6):449–54.
117. Zachariassen G, Fenger-Gron J, Hviid MV, Halken S. The content of macronutrients in milk from mothers of very preterm infants is highly variable. *Dan Med J.* 2013;60(6):2–6.

BIBLIOGRAFIA

118. Gates A, Marin T, De Leo G, Waller JL, Stansfield BK. Nutrient composition of preterm mother's milk and factors that influence nutrient content. *Am J Clin Nutr.* 2021;114(5):1719–28.
119. Thakur A, Kler N, Garg P, Gandhi P, Srivastava S. Macronutrient analysis of human milk and factors associated with its composition in mothers of preterm infants ≤ 32 weeks. *Eur J Pediatr.* 2021;180(12):3527.
120. Mandel D, Lubetzky R, Dollberg S, Barak S, Mimouni FB. Fat and energy contents of expressed human breast milk in prolonged lactation. *Pediatrics.* 2005;116(3):e432-5.
121. Dizdar EA, Sari FN, Degirmencioglu H, Canpolat FE, Oguz SS, Uras N, *et al.* Effect of mode of delivery on macronutrient content of breast milk. *J Matern Neonatal Med.* 2014;27(11):1099–102.
122. 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.
123. Yang T, Zhang Y, Ning Y, You L, Ma D, Zheng Y, *et al.* Breast milk macronutrient composition and the associated factors in urban Chinese mothers. *Chin Med J (Engl).* 2014;127(9):1721–5.
124. Michaelsen KF. Nutrition and growth during infancy: The Copenhagen cohort study. *Acta Paediatr Int J Paediatr Suppl.* 1997;420:1–36.
125. Kitano N, Nomura K, Kido M, Murakami K, Ohkubo T, Ueno M, *et al.* Combined effects of maternal age and parity on successful initiation of exclusive breastfeeding. *Prev Med Reports.* 2016;3:121–6.
126. Hausman Kedem M, Mandel D, Domani KA, Mimouni FB, Shay V, Marom R, *et al.* The effect of advanced maternal age upon human milk fat content. *Breastfeed Med.* 2013;8(1):116–9.
127. Lubetzky R, Sever O, Mimouni FB, Mandel D. Human Milk Macronutrients Content: Effect of Advanced Maternal Age. *Breastfeed Med.* 2015;10(9):433–6.
128. Hahn WH, Jeong T, Park S, Song S, Kang NM. Content fat and calorie of human milk is affected by interactions between maternal age and body mass index. *J Matern Neonatal Med.* 2018;31(10):1385–8.
129. Ellsworth L, Perng W, Harman E, Das A, Pennathur S, Gregg B. Impact of maternal overweight and obesity on milk composition and infant growth. *Matern Child Nutr.* 2020;(January):1–14.

130. Sims C, Lipsmeyer M, Turner D, Andres A. Human Milk Composition Differs by Maternal BMI in the First 9 Months Postpartum. *Curr Dev Nutr.* 2020;112(3):548–57.
131. Bzikowska A, Czerwonogrodzka-Senczyna A, Weker H, Wesolowska A. Correlation between human milk composition and maternal nutritional status. *Rocz Panstw Zakl Hig.* 2018;69(4):363–7.
132. Bitman J, Hamosh M, Hamosh P, Lutes V, Neville MC, Seacat J, *et al.* Milk composition and volume during the onset of lactation in a diabetic mother. *Am J Clin Nutr.* 1989;50(6):1364–9.
133. Peila C, Gazzolo D, Bertino E, Cresi F, Coscia A. Influence of diabetes during pregnancy on human milk composition. *Nutrients.* 2020;12(1):1–15.
134. Shapira D, Mandel D, Mimouni FB, Moran-Lev H, Marom R, Mangel L, *et al.* The effect of gestational diabetes mellitus on human milk macronutrients content. *J Perinatol.* 2019;39(6):820–3.
135. Kraut RY, Brown E, Korownyk C, Katz LS, Vandermeer B, Babenko O, *et al.* The impact of breast reduction surgery on breastfeeding: Systematic review of observational studies. *PLoS One.* 2017;12(10):1–17.
136. Napierala M, Mazela J, Merritt TA, Florek E. Tobacco smoking and breastfeeding: Effect on the lactation process, breast milk composition and infant development. A critical review. *Environ Res.* 2016;151:321–38.
137. Joya X, Pacifici R, Salat-Batlle J, Garcíá-Algar O, Pichini S. Maternal and neonatal hair and breast milk in the assessment of perinatal exposure to drugs of abuse. *Bioanalysis.* 2015;7(10):1273–97.
138. Svensson CK. Clinical Pharmacokinetics of Nicotine. *Clin Pharmacokinet.* 1987;12(1):30–40.
139. Luck W, Nau H. Nicotine and cotinine concentrations in serum and milk of nursing smokers. *Br J Clin Pharmacol.* 1984;18(1):9–15.
140. Aimee M, Sumedha B, Lucy B, James SS, Yen-Fu C. Effects of maternal caffeine consumption on the breastfed child: A systematic review. *Swiss Med Wkly.* 2018;148:w14665.
141. Ward RM, Bates BA, Benitz WE, Burchfield DJ, Ring JC, Walls RP, *et al.* The transfer of drugs and other chemicals into human milk. *Pediatrics.* 2001;108(3):776–89.
142. Ryu JE. Caffeine in human milk and in serum of breast-fed infants. *Dev Pharmacol Ther.* 1985;8(6):329–37.

BIBLIOGRAFIA

143. Nehlig A, Debry G. Effects of coffee and caffeine on fertility, reproduction, lactation and development: A review of the human and animal data. *J Gynecol Obstet Biol la Reprod.* 1994;23(3):241–56.
144. Congiu M, Reali A, Deidda F, Dessì A, Bardanzellu F, Fanos V. Breast Milk for Preterm Multiples: More Proteins, Less Lactose. *Twin Res Hum Genet.* 2019;22(4):265–71.
145. Correia L, Cardoso M, Papoila AL, Alves M, Virella D, Ramalho R, *et al.* Does Fetal Growth Adequacy Affect the Nutritional Composition of Mothers' Milk?: A Historical Cohort Study. *Am J Perinatol.* 2021;40(2):163–71.
146. Sokołowska EM, Jassem-Bobowicz JM, Drążkowska I, Świąder Z, Domzalska-Popadiuk I. Gestational Hypertension and Human Breast Milk Composition in Correlation with the Assessment of Fetal Growth—A Pilot Study. *Nutrients.* 2023;15(10):1–12.
147. Beser E, Kose Cetinkaya A, Kucukoglu Keser M, Okman E, Sari FN, Alyamac Dizdar E. Evaluation of Breast Milk Macronutrient Content in Preeclamptic Mothers. *Breastfeed Med.* 2022;17(4):318–21.
148. Peila C, Bertino E, Cresi F, Coscia A. Interactions between preeclampsia and composition of the human milk: what do we know? *J Matern Neonatal Med.* 2022;35(25):6219–25.
149. 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 Paediatr Int J Paediatr.* 2001;90:772–5.
150. Prentice P, Ong KK, Schoemaker MH, Van Tol EAF, Vervoort J, Hughes IA, *et al.* Breast milk nutrient content and infancy growth. *Acta Paediatr Int J Paediatr.* 2016;105(6):641–7.
151. Bauer J, Gerss J. Longitudinal analysis of macronutrients and minerals in human milk produced by mothers of preterm infants. *Clin Nutr.* 2011;30(2):215–20.
152. Maly J, Burianova I, Vitkova V, Ticha E, Navratilova M, Cermakova E. Preterm human milk macronutrient concentration is independent of gestational age at birth. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2019;104(1):F50–6.
153. Anderson GH. The effect of prematurity on milk composition and its physiological basis. *Fed Proc.* 1984;43(9):2438–42.
154. Lönnerdal B, Lonnerdal B, Lönnerdal B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am J Clin Nutr.* 2003;77(6):1537S – 1543.
155. Armoni Domany K, Mandel D, Hausman Kedem M, Lubetzky R. Breast milk fat content of mothers to small-for-gestational-age infants. *J Perinatol.* 2015;35(6):444–6.

156. Phattraprayoon N, Kraisonsin N, Kanjanapattanakul W. Comparison of breast milk compositions among mothers delivering small-for-gestational age, appropriate-for-gestational age, and large-for-gestational age infants. *Breastfeed Med.* 2018;13(9):627–30.
157. Ximenes Melo R, Marano D, da Silva DA, Moreira MEL. The influence of the gender of newborns on human milk composition. *Acta Paediatr Int J Paediatr.* 2020;109(7):1485–6.
158. Hahn WH, Song JH, Song S, Kang N mi. Do gender and birth height of infant affect calorie of human milk? An association study between human milk macronutrient and various birth factors. *J Matern Neonatal Med.* 2017;30(13):1608–12.
159. Quinn EA. No evidence for sex biases in milk macronutrients, energy, or breastfeeding frequency in a sample of filipino mothers. *Am J Phys Anthropol.* 2013;152(2):209–16.
160. Hosseini M, Valizadeh E, Hosseini N, Khatibshahidi S, Raeisi S. The Role of Infant Sex on Human Milk Composition. *Breastfeed Med.* 2020;15(5):341–6.
161. Morgan J, Bombell S, Mcguire W. Early trophic feeding versus enteral fasting for very preterm or very low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;28(3):CD000504.
162. Quigley M, McGuire W. Formula versus donor breast milk for feeding preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014;22(4):CD002971.
163. Li Y, Nguyen DN, de Waard M, Christensen L, Zhou P, Jiang P, *et al.* Pasteurization Procedures for Donor Human Milk Affect Body Growth, Intestinal Structure, and Resistance against Bacterial Infections in Preterm Pigs. *J Nutr.* 2017;147(6):1121–30.
164. John A, Sun R, Maillart L, Schaefer A, Spence EH, Perrin MT. Macronutrient variability in human milk from donors to a milk bank: Implications for feeding preterm infants. *PLoS One.* 2019;14(1):e0210610.
165. Peila C, Moro GE, Bertino E, Cavallarini L, Giribaldi M, Giuliani F, *et al.* The effect of holder pasteurization on nutrients and biologically-active components in donor human milk: A review. *Nutrients.* 2016;8(8):1–19.
166. Arslanoglu S, Boquien CY, King C, Lamireau D, Tonetto P, Barnett D, *et al.* Fortification of human milk for preterm infants: Update and recommendations of the European milk bank association (EMBA) working group on human milk fortification. *Front Pediatr.* 2019;7:76.
167. Brown JV, Lin L, Embleton ND, Harding JE, McGuire W. Multi-nutrient fortification of human milk for preterm infants. *Cochrane database Syst Rev.* 2020 Jun;6(6):CD000343.

BIBLIOGRAFIA

168. Arslanoglu S, Bertino E, Coscia A, Tonetto P, Giuliani F, Moro GE. Update of adjustable fortification regimen for preterm infants: a new protocol. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2012;26(3 Suppl):65–7.
169. Polberger S, Rähä NCR, Juvonen P, Moro GE, Minoli I, Warm A. Individualized protein fortification of human milk for preterm infants: Comparison of ultrafiltrated human milk protein and a bovine whey fortifier. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1999;29(3):323–8.
170. Koletzko B, Poindexter B, Uauy R. Recommended nutrient intake levels for stable, fully enterally fed very low birth weight infants. *World Rev Nutr Diet*. 2014;110:297–9.
171. Embleton ND, van den Akker CHP. Protein intakes to optimize outcomes for preterm infants. *Semin Perinatol*. 2019;43(7):151154.
172. Mcleod G, Sherriff J, Nathan E, Hartmann PE, Simmer K. Four-week nutritional audit of preterm infants born <33 weeks gestation. *J Paediatr Child Health*. 2013;49(4):332–9.
173. Grace E, Hilditch C, Gomersall J, Collins CT, Rumbold A, Keir AK. Safety and efficacy of human milk-based fortifier in enterally fed preterm and/or low birthweight infants: A systematic review and meta-Analysis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2020;106(2):137–42.
174. 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. *J Pediatr*. 2010;156(4):562–7.
175. O'Connor DL, Kiss A, Tomlinson C, Bando N, Bayliss A, Campbell DM, *et al*. Nutrient enrichment of human milk with human and bovine milk-based fortifiers for infants born weighing <1250 g: A randomized clinical trial. *Am J Clin Nutr*. 2018;108(1):108–16.
176. Embleton NE, Pang N, Cooke RJ. Postnatal malnutrition and growth retardation: An inevitable consequence of current recommendations in preterm infants? *Pediatrics*. 2001;107(2):270–3.
177. Embleton ND. Optimal protein and energy intakes in preterm infants. *Early Hum Dev*. 2007;83(12):831–7.
178. American Academy of Pediatrics. American Academy of Pediatrics, Committee on Nutrition. Nutritional needs of low-birth-weight infants. *Pediatrics*. 1977;60(4):519–30.
179. Klevebro S, Lundgren P, Hammar U, Smith LE, Bottai M, Domellöf M, *et al*. Cohort study of growth patterns by gestational age in preterm infants developing morbidity. *BMJ Open*. 2016;6(11):e012872.

180. 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 Int J Paediatr.* 2015;104(10):974–86.
181. Fenton TR, Cormack B, Goldberg D, Nasser R, Alshaikh B, Eliasziw M, *et al.* “Extrauterine growth restriction” and “postnatal growth failure” are misnomers for preterm infants. *J Perinatol.* 2020;40(5):704–14.
182. Zhang J, Merialdi M, Platt LD, Kramer S. M. Defining Normal and Abnormal Fetal Growth: Promises and Challenges. *Am J Obs Gynecol.* 2010;202(6):522–8.
183. Malhotra A, Allison BJ, Castillo-Melendez M, Jenkin G, Polglase GR, Miller SL. Neonatal morbidities of fetal growth restriction: Pathophysiology and impact. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10:55.
184. Ohuma EO, Villar J, Feng Y, Xiao L, Salomon L, Barros FC, *et al.* Fetal Growth Velocity Standards from the Fetal Growth Longitudinal Study of the INTERGROWTH-21st Project. *Am J Obstet Gynecol.* 2021;224(2):208.
185. Fenton TR, Chan HT, Madhu A, Griffin IJ, Hoyos A, Ziegler EE, *et al.* Preterm infant growth velocity calculations: A systematic review. *Pediatrics.* 2017;139(3):e20162045.
186. Fenton TR. A new growth chart for preterm babies: Babson and Benda’s chart updated with recent data and a new format. *BMC Pediatr.* 2003;3:13.
187. Physical status: The use and interpretation of anthropometry. *World Heal Organ - Tech Rep Ser.* 1995;(854):1–454.
188. Sáenz de Pipaón M, Martínez-Biarge M, Dorronsoro I, Salas S, Madero R, Martos GÁ, Argente J QJ. Growth in preterm infants until 36 weeks’ postmenstrual age is close to target recommendations. *Neonatology.* 2014;106(1):30–6.
189. Izquierdo Renau M, Aldecoa-Bilbao V, Esponera CB, De Mendoza BDRH, Sanz MI, Iglesias-Platas I. Applying methods for postnatal growth assessment in the clinical setting: Evaluation in a longitudinal cohort of very preterm infants. *Nutrients.* 2019;11(11):2772.
190. Rochow N, Landau-Crangle E, So HY, Pelc A, Fusch G, Däbritz J, *et al.* Z-score differences based on cross-sectional growth charts do not reflect the growth rate of very low birth weight infants. *PLoS One.* 2019;14(5):e0216048.
191. Figueras-Aloy J, Palet-Trujols C, Matas-Barceló I, Botet-Mussons F, Carbonell-Estrany X. Extrauterine growth restriction in very preterm infant: etiology, diagnosis, and 2-year follow-up. *Eur J Pediatr.* 2020;179(9):1469–79.
192. Villar J, Knight HE, De Onis M, Bertino E, Gilli G, Papageorghiou AT, *et al.* Conceptual issues related to the construction of prescriptive standards for the evaluation of postnatal growth of preterm infants. *Arch Dis Child.* 2010;95(12):1034–8.

BIBLIOGRAFIA

193. Villar J, Giuliani F, Figueras-Aloy J, Barros F, Bertino E, Bhutta ZA, *et al.* Growth of preterm infants at the time of global obesity. *Arch Dis Child.* 2019;104(8):725–7.
194. de Onis M, Garza C, Onyango AW, Rolland-Cachera M-F. Les standards de croissance de l'Organisation mondiale de la santé pour les nourrissons et les jeunes enfants. *Arch Pédiatrie.* 2009;16(1):47–53.
195. Villar J, Ismail LC, Victora CG, Ohuma EO, Bertino E, Altman DG, *et al.* International standards for newborn weight, length, and head circumference by gestational age and sex: The Newborn Cross-Sectional Study of the INTERGROWTH-21st Project. *Lancet.* 2014;384(9946):857–68.
196. Villar J, Giuliani F, Fenton TR, Ohuma EO, Ismail LC, Kennedy SH. INTERGROWTH-21st very preterm size at birth reference charts. *Lancet.* 2016;387(10021):844–5.
197. Cordova EG, Belfort MB. Updates on assessment and monitoring of the postnatal growth of preterm infants. *Neoreviews.* 2020;21(2):e98–108.
198. Krauel Vidal X, Figueras Aloy J, Natal Pujol A, Iglesias Platas I, Moro Serrano M, Fernández Pérez C, *et al.* Restricción posnatal del crecimiento en recién nacidos españoles de muy bajo peso con edad gestacional menor o igual a 32 semanas. *An Pediatr.* 2008;68(3):206–12.
199. Johnson MJ, Wootton SA, Leaf AA, Jackson AA. Preterm birth and body composition at term equivalent age: A systematic review and meta-analysis. *Pediatrics.* 2012;130(3):e640-9.
200. Elk Grove Village Il AAP, editor. Committee on Nutrition American Academy Pediatrics. Assessing nutrition status. In: *Pediatric Nutrition Handbook.* 8 th. 2020.
201. 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(1):85–91.
202. Griffin IJ, Tancredi DJ, Bertino E, Lee HC, Profit J. Postnatal growth failure in very low birthweight infants born between 2005 and 2012. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2016;101(1):F50–5.
203. Avila-Alvarez A, Solar Boga A, Bermúdez-Hormigo C, Fuentes Carballal J. Restricción del crecimiento extrauterino en recién nacidos de menos de 1.500 gramos de peso al nacer. *An Pediatr.* 2018;89(6):325–32.
204. Goldberg DL, Becker PJ, Brigham K, Carlson S, Fleck L, Gollins L, *et al.* Identifying Malnutrition in Preterm and Neonatal Populations: Recommended Indicators. *J Acad Nutr Diet.* 2018;118(9):1571–82.

205. 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. *Pediatr Res.* 2016;79(6):870–9.
206. Raiten DJ, Steiber AL, Hand RK. Executive summary: Evaluation of the evidence to support practice guidelines for nutritional care of preterm infants-the Pre-B Project. *Am J Clin Nutr.* 2016;103(2):599S-605S.
207. Fenton TR, Nasser R, Eliasziw M, Kim JH, Bilan D, Sauve R. Validating the weight gain of preterm infants between the reference growth curve of the fetus and the term infant. *BMC Pediatr.* 2013;13:92.
208. Belfort M, Cherkerzian S, Bell K, Soldateli B, Ramos EC, Palmer C, *et al.* Macronutrient intake from human milk, infant growth, and body composition at term equivalent age: A longitudinal study of hospitalized very preterm infants. *Nutrients.* 2020;12(8):1–12.
209. Lin YH, Hsu YC, Lin MC, Chen CH, Wang TM. The association of macronutrients in human milk with the growth of preterm infants. *PLoS One.* 2020;15(3):1–12.
210. Asbury MR, Unger S, Kiss A, Ng DVY, Luk Y, Bando N, *et al.* Optimizing the growth of very-low-birth-weight infants requires targeting both nutritional and nonnutritional modifiable factors specific to stage of hospitalization. *Am J Clin Nutr.* 2019;110(6):1384–94.
211. Menon G, Williams TC. Human milk for preterm infants: Why, what, when and how? *Arch Dis Child - Fetal Neonatal Ed.* 2013;98(6):559–62.
212. Corpeleijn WE, Kouwenhoven SMP, Paap MC, Van Vliet I, Scheerder I, Muizer Y, *et al.* Intake of own Mother's milk during the first days of life is associated with decreased morbidity and mortality in very low birth weight infants during the first 60 days of life. *Neonatology.* 2012;102(4):276–81.
213. Henderson G, Anthony MY, McGuire W. Formula milk versus maternal breast milk for feeding preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007;(4):CD002972.
214. Altobelli E, Angeletti PM, Verrotti A, Petrocelli R. The impact of human milk on necrotizing enterocolitis: A systematic review and meta-analysis. *Nutrients.* 2020;12(5):1322.
215. Vohr BR, Poindexter BB, Dusick AM, McKinley LT, Higgins RD, Langer JC, *et al.* Persistent beneficial effects of breast milk ingested in the neonatal intensive care unit on outcomes of extremely low birth weight infants at 30 months of age. *Pediatrics.* 2007;120(4):e953-9.
216. Dani C, Poggi C. Nutrition and bronchopulmonary dysplasia. *J Matern Neonatal Med.* 2012;25(Suppl. 3):37–40.

BIBLIOGRAFIA

217. VanderVeen DK, Martin CR, Mehendale R, Allred EN, Dammann O, Leviton A, *et al.* Early Nutrition and Weight Gain in Preterm Newborns and the Risk of Retinopathy of Prematurity. *PLoS One*. 2013;8(5):e64325.
218. Nielsen S, Nielsen DS, Lauritzen L, Jakobsen M, Michaelsen KF. Impact of diet on the intestinal microbiota in 10-month-old infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2007;44(5):613–8.
219. Makrides M, Gibson RA, McPhee AJ, Collins CT, Davis PG, Doyle LW, *et al.* Neurodevelopmental outcomes of preterm infants fed high-dose docosahexaenoic acid: A randomized controlled trial. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2009;301(2):175–82.
220. Morrow AL, Lagomarcino AJ, Schibler KR, Taft DH, Yu Z, Wang B, *et al.* Early microbial and metabolomic signatures predict later onset of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Microbiome*. 2013;1(1):13.
221. Mai V, Young CM, Ukhanova M, Wang X, Sun Y, Casella G, *et al.* Fecal microbiota in premature infants prior to necrotizing enterocolitis. *PLoS One*. 2011;6(6):e20647.
222. Robinson DT, Caplan MS. Linking fat intake, the intestinal microbiome, and necrotizing enterocolitis in premature infants. *Pediatr Res*. 2015;77(1):121–6.
223. Sjöström ES, Lundgren P, Öhlund I, Holmström G, Hellström A, Domellöf M. Low energy intake during the first 4 weeks of life increases the risk for severe retinopathy of prematurity in extremely preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2016;101(2):F108–13.
224. Lai NM, Rajadurai S V, Tan K. Increased energy intake for preterm infants with (or developing) bronchopulmonary dysplasia/chronic lung disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006;3:CD005093.
225. Brunton JA, Saigal S, Atkinson SA. Growth and body composition in infants with bronchopulmonary dysplasia up to 3 months corrected age: A randomized trial of a high-energy nutrient- enriched formula fed after hospital discharge. *J Pediatr*. 1998;133(3):340–5.
226. Denne SC. Energy expenditure in infants with pulmonary insufficiency: Is there evidence for increased energy needs? *J Nutr*. 2001;131(3):935S-937S.
227. Ziegler EE, Thureen PJ, Carlson SJ. Aggressive nutrition of the very low birthweight infant. *Clin Perinatol*. 2002;29(2):225–44.
228. Ottolini KM, Andescavage N, Keller S, Limperopoulos C. Nutrition and the developing brain: the road to optimizing early neurodevelopment: a systematic review. *Pediatr Res*. 2020;87(2):194–201.

229. Tan M, Abernethy L, Cooke R. Improving head growth in preterm infants - A randomised controlled trial II: MRI and developmental outcomes in the first year. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2008;93(5):F342-6.
230. Coviello C, Keunen K, Kersbergen KJ, Groenendaal F, Leemans A, Peels B, *et al.* Effects of early nutrition and growth on brain volumes, white matter microstructure, and neurodevelopmental outcome in preterm newborns. *Pediatr Res.* 2018;83(1):102–10.
231. Schneider J, Fumeaux CJF, Duerden EG, Guo T, Foong J, Graz MB, *et al.* Nutrient intake in the first two weeks of life and brain growth in preterm neonates. *Pediatrics.* 2018;141(3):e20172169.
232. Isaacs EB, Gadian DG, Sabatini S, Chong WK, Quinn BT, Fischl BR, *et al.* The effect of early human diet on caudate volumes and IQ. *Pediatr Res.* 2008;63(3):308–14.
233. Baños-Peláez M, Avila-Sosa V, Fernández-Carrocer LA, González-Pérez G, Carrera-Muiños S, Rivera-Rueda MA, *et al.* Estimating neonatal necrotizing enterocolitis based on feeding practices. *Children.* 2021;8(4):1–16.
234. Andrews ET, Ashton JJ, Pearson F, Beattie RM, Johnson MJ. Early postnatal growth failure in preterm infants is not inevitable. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2019;104(3):10–2.
235. Hu F, Tang Q, Wang Y, Wu J, Ruan H, Lu L, *et al.* Analysis of Nutrition Support in Very Low-Birth-Weight Infants With Extrauterine Growth Restriction. *Nutr Clin Pract.* 2019;34(3):436–43.
236. Borràs-Novell C, Herranz Barbero A, Aldecoa-Bilbao V, Feixas Orellana G, Balcells Esponera C, Sánchez Ortiz E, *et al.* Infrared analyzers for the measurement of breastmilk macronutrient content in the clinical setting. *Expert Rev Mol Diagn.* 2020;20(9):867–87.
237. Euro Who [Internet]. [cited 2019 Nov 20]. Available from: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/nutrition/a-healthy-lifestyle/body-mass-index-bmi>
238. C. Molinet, JM. Bogaña, J. Bellart, A. Pericot, S. Santos, A. Roldan MG-RS. Diabetes gestacional [Internet]. 2018. Available from: <https://medicinafetalbarcelona.org/protocolos/es/patologia-materna-obstetrica/diabetes-gestacional.html>
239. Anna Peguero, Edurne Mazarico, Sandra Hernández, Patricia Ferrer, Dolors Gómez-Roig, Mònica Domenech, Marta Magaldi, Anna Plaza, Patricia Ferrer F, Figueras. HIPERTENSIÓN Y GESTACIÓN [Internet]. 2020. Available from: <https://medicinafetalbarcelona.org/protocolos/es/patologia-materna-obstetrica/hipertensión-y-gestación.pdf>

BIBLIOGRAFIA

240. Espa S, Introducci O, Cient NS. Prenatal control of normal pregnancy. *Progresos Obstet y Ginecol.* 2018;61(5):510–27.
241. Servicio de Medicina MaternoFetal Hospital Clínic. Defectos del crecimiento fetal (protocolo). 2008;1–7. Available from: https://medicinafetalbarcelona.org/clinica/images/protocolos/patologia__fetal/cir-peg.pdf
242. Maryanne T Perrin, Mandy B Belfort, James I Hagadorn, Jacqueline M McGrath, Sarah N Taylor, Lauren M Tosi EAB. The Nutritional Composition and Energy Content of Donor Human Milk: A Systematic Review. *Adv Nutr An Int Rev J.* 2020;11(4):960–70.
243. University O. INTERGROWTH-21st [Internet]. 2021 [cited 2019 Jan 10]. Available from: <https://intergrowth21.tghn.org/>
244. The Committee for the Classification of Retinopathy of Prematurity. An international classification of retinopathy of prematurity. The Committee for the Classification of Retinopathy of Prematurity. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960).* 1984;102(8):1130–4.
245. Riverola A, Salvia M, Bartrons J. Ductus arterioso permeable en el pretérmino (protocolo). 2015.
246. De Pipaón Marcos MS, Bueno MTM, SanJosé B, Torralba E, Gil M, Parada I, *et al.* Acquisition of full enteral feeds may depend on stooling pattern in very premature infants. *J Perinat Med.* 2012;40(4):427–31.
247. Harris PA, Taylor R, Minor BL, Elliott V, Fernandez M, O'Neal L, *et al.* The REDCap consortium: Building an international community of software platform partners. Vol. 95, *Journal of Biomedical Informatics.* 2019. p. 103208.
248. Vandembroucke JP, Von Elm E, Altman DG, Gøtzsche PC, Mulrow CD, Pocock SJ, *et al.* Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE): Explanation and elaboration. *Epidemiology.* 2007;18(6):805–35.
249. MIRIS Solutions. Human Milk Analyzer User Manual. 2017 [cited 2019 May 21]; Available from: www.MirisSolutions.com/support/user-manual
250. Arslanoglu S, Moro GE, Ziegler EE. Preterm infants fed fortified human milk receive less protein than they need. *J Perinatol.* 2009;29(7):489–92.
251. Ziegler EE. Protein Needs of Preterm Infants: Why Are They so Difficult to Meet? *Nestle Nutr Inst Workshop Ser.* 2016;86:121–8.
252. Ziegler EE. Human milk and human milk fortifiers. *World Rev Nutr Diet.* 2014;110:2315–27.

253. Aggett PJ, Agostoni C, Axelsson I, De Curtis M, Goulet O, Hernell O, *et al.* Feeding preterm infants after hospital discharge: A commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006;42(5):596–603.
254. Da Cunha RDES, Lamy Filho F, Rafael EV, Lamy ZC, De Queiroz ALG. Breast milk supplementation and preterm infant development after hospital discharge: A randomized clinical trial. *J Pediatr (Rio J).* 2016;92(2):136–42.
255. O'Connor DL, Khan S, Weishuhn K, Vaughan J, Jefferies A, Campbell DM, *et al.* Growth and nutrient intakes of human milk-fed preterm infants provided with extra energy and nutrients after hospital discharge. *Pediatrics.* 2008;121(4):766–76.
256. Young L, Embleton ND, McGuire W. Nutrient-enriched formula versus standard formula for preterm infants following hospital discharge. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016;12(12):CD004696.
257. R J Cooke, I J Griffin, K McCormick, J C K Wells, J S Smith SJR & ML. Feeding Preterm Infants after Hospital Discharge: Effect of Dietary Manipulation on Nutrient Intake and Growth. *Pediatr Res.* 1998;43:355–360.
258. King C. Three year experience of using breast milk fortifier post discharge in preterm babies. *Arch Dis Child - Fetal Neonatal Ed.* 2014;99(1):A47–8.
259. Mahajan S, Chawla D, Kaur J, Jain S. Macronutrients in breastmilk of mothers of preterm infants. *Indian Pediatr.* 2017;54(8):635–7.
260. Perrella S, Gridneva Z, Lai CT, Stinson L, George A, Bilston-John S, *et al.* Human milk composition promotes optimal infant growth, development and health. *Semin Perinatol.* 2021;45(2):151380.
261. Fleischer Michaelsen K, Skafte L, Badsberg JH, Jørgensen M. Variation in macronutrients in human bank milk: Influencing factors and implications for human milk banking. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1990;11(2):229–39.
262. INE. Instituto Nacional de Estadística [Internet]. Indicadores de Fecundidad. Edad Media a la Maternidad. 2022 [cited 2022 Jun 21]. Available from: <https://www.ine.es/jaxiT3/Datos.htm?t=1579>
263. Makgoba M, Savvidou MD, Steer PJ. An analysis of the interrelationship between maternal age, body mass index and racial origin in the development of gestational diabetes mellitus. *BJOG.* 2012 Feb;119(3):276–82.
264. Javier Aranceta Bartrina, Carmen Pérez Rodrigo, Goiuri Alberdi Aresti, Natalia Ramos Carrera SLM. Prevalencia de obesidad general y obesidad abdominal en la población adulta española. *Rev Española Cardiol.* 2016;69(6):579–86.
265. Rode L, Kjærgaard H, Ottesen B, Damm P, Hegaard HK. Association between gestational weight gain according to body mass index and postpartum weight in a large cohort of Danish women. *Matern Child Health J.* 2012;16(2):406–13.

BIBLIOGRAFIA

266. Bravi F, Wiens F, Decarli A, Dal Pont A, Agostoni C, Ferraroni M. Impact of maternal nutrition on breast-milk composition: A systematic review. *Am J Clin Nutr.* 2016;104(3):646–62.
267. Keikha M, Bahreynian M, Saleki M, Kelishadi R. Macro- and Micronutrients of Human Milk Composition: Are They Related to Maternal Diet? A Comprehensive Systematic Review. *Breastfeed Med.* 2017;12(9):517–27.
268. Mitoulas LR, Kent JC, Cox DB, Owens RA, Sherriff JL, Hartmann PE. Variation in fat, lactose and protein in human milk over 24h and throughout the first year of lactation. *Br J Nutr.* 2002;88(1):29–37.
269. Fríguls B, Joya X, García-Algar O, Pallás CR, Vall O, Pichini S. A comprehensive review of assay methods to determine drugs in breast milk and the safety of breastfeeding when taking drugs. *Anal Bioanal Chem.* 2010;397(3):1157–79.
270. da-Silva VA, Malheiros LR, Moraes-Santos AR, Barzano MA, McLean AE. Ethanol pharmacokinetics in lactating women. *Braz J Med Biol Res.* 1993;26(10):1097–103.
271. Bailey DN, Weibert RT, Naylor AJ. A study of salicylate and caffeine excretion in the breast milk of two nursing mothers. *J Anal Toxicol.* 1982;6(2):64–8.
272. Mennella JA. Short-term effects of maternal alcohol consumption on lactational performance. *Alcohol Clin Exp Res.* 1998;22(7):1389–92.
273. Vohr BR, Boney CM. Gestational diabetes: The forerunner for the development of maternal and childhood obesity and metabolic syndrome? *J Matern Neonatal Med.* 2008;21(3):149–57.
274. Nommsen LA, Lovelady CA, Heinig MJ, Lönnerdal B, Dewey KG. Determinants of energy, protein, lipid, and lactose concentrations in human milk during the first 12 mo of lactation: The DARLING Study. *Am J Clin Nutr.* 1991;53(2):457–65.
275. Nissen E, Uvnäs-Moberg K, Svensson K, Stock S, Widström AM, Winberg J. Different patterns of oxytocin, prolactin but not cortisol release during breastfeeding in women delivered by Caesarean section or by the vaginal route. *Early Hum Dev.* 1996;45(1–2):103–18.
276. Ramin SM, Porter JC, Gilstrap LC, Rosenfeld CR. Stress hormones and acid-base status of human fetuses at delivery. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991;73(1):182–6.
277. Anderson GH, Atkinson SA, Bryan MH. Energy and macronutrient content of human milk during early lactation from mothers giving birth prematurely and at term. *Am J Clin Nutr.* 1981 Feb;34(2):258–65.
278. Ximenes Melo R, Marano D, da Silva DA, Moreira MEL, Peila C, Gazzolo D, *et al.* The Role of Infant Sex on Human Milk Composition. *Nutrients.* 2020;39(December 2019):1–15.

279. De Curtis M, Rigo J. The nutrition of preterm infants. *Early Hum Dev.* 2012;88(SUPPL. 1):2011–3.
280. Senterre T, Rigo J. Reduction in postnatal cumulative nutritional deficit and improvement of growth in extremely preterm infants. *Acta Paediatr Int J Paediatr.* 2012;101(2):64–70.
281. Hurria A, Cohen HJ, Extermann M. WHO_TRS_854.pdf. *J Geriatr Oncol.* 2010;1(1):40–4.
282. García-Muñoz Rodrigo F, Figueras Aloy J, Saavedra Santana P, García-Alix A. Crecimiento posnatal hasta el alta hospitalaria en recién nacidos extremadamente prematuros españoles. *An Pediatría.* 2017;87(6):301–10.
283. Ehrenkranz RA, Das A, Wrage LA, Poindexter BB, Higgins RD, Stoll BJ, *et al.* Early nutrition mediates the influence of severity of illness on extremely LBW infants. *Pediatr Res.* 2011;69(6):522–9.
284. Sakurai M, Itabashi K, Sato Y, Hibino S, Mizuno K. Extrauterine growth restriction in preterm infants of gestational age ≤ 32 weeks. *Pediatr Int.* 2008;50(1):70–5.
285. Cohen E, Baerts W, van Bel F. Brain-Sparing in Intrauterine Growth Restriction: Considerations for the Neonatologist. *Neonatology.* 2015;108(4):269–76.
286. Tozzi MG, Moscuza F, Michelucci A, Lorenzoni F, Cosini C, Ciantelli M, *et al.* ExtraUterine Growth Restriction (EUGR) in preterm infants: Growth patterns, nutrition, and epigenetic markers. A pilot study. *Front Pediatr.* 2018;6:408.
287. Peila C, Spada E, Giuliani F, Maiocco G, Raia M, Cresi F, *et al.* Extrauterine growth restriction: Definitions and predictability of outcomes in a cohort of very low birth weight infants or preterm neonates. *Nutrients.* 2020;12(5):1224.
288. Shah PS, Wong KY, Merko S, Bishara R, Dunn M, Asztalos E, *et al.* Postnatal growth failure in preterm infants: Ascertainment and relation to long-term outcome. *J Perinat Med.* 2006;34(6):484–9.
289. Clark, Reese H; Thomas, Pam; Peabody J. Extrauterine growth restriction remains a serious problem in prematurely born neonates. *Pediatrics.* 2003;111(5):986–90.
290. Lindsay K, Schehr TSJ. Concept Analysis of Growth Failure in Preterm Infants in the NICU. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs.* 2017;46(6):870–7.
291. Lin Y-C, Chu C-H, Chen Y-J, Chen R-B, Huang C-C. Gestational Age-Related Associations between Early-Life Feeding Trajectories and Growth Outcomes at Term Equivalent Age in Very Preterm Infants. *Nutrients.* 2022 Feb;14(5):1032.
292. 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. *J Pediatr.* 2013;163(6):1564–9.

BIBLIOGRAFIA

293. A García-Alix 1, M Sáenz-de Pipaón, M Martínez, S Salas-Hernández JQ. Ability of neonatal head circumference to predict long-term neurodevelopmental outcome. *Rev Neurol.* 2004;39(6):548–54.
294. Sammallahhti S, Pyhälä R, Lahti M, Lahti J, Pesonen AK, Heinonen K, *et al.* Infant growth after preterm birth and neurocognitive abilities in young adulthood. *J Pediatr.* 2014;165(6):1109–15.
295. Hay WW. Strategies for feeding the preterm infant. *Neonatology.* 2008;94(4):245–54.
296. Genoni G, Binotti M, Monzani A, Bernascone E, Stasi I, Bona G, *et al.* Nonrandomised interventional study showed that early aggressive nutrition was effective in reducing postnatal growth restriction in preterm infants. *Acta Paediatr.* 2017 Jul 14;106(10):1589–95.
297. Koletzko B, Goulet O, Hunt J, Krohn K, Shamir R. Guidelines on Paediatric Parenteral Nutrition (ESPEN/ESPGHAN). *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2005;41 Suppl 2(November):S1–87.
298. Mitchell EJ, Meakin G, Anderson J, Dorling J, Gale C, Haines R, *et al.* The FEED1 trial: protocol for a randomised controlled trial of full milk feeds versus intravenous fluids with gradual feeding for preterm infants (30-33 weeks gestational age). *Trials.* 2022 Jan;23(1):64.
299. Willemijn E Corpeleijn 1, Stefanie M P Kouwenhoven JB van G. optimal growth of preterm infants. *World Rev Nutr Diet.* 2013;106:149–55.
300. Han J, Zhang L, Li S, Zhang Y, Jiang Y, Chen X, *et al.* Associations of early nutrition with growth and body composition in very preterm infants: a prospective cohort study. *Eur J Clin Nutr.* 2022;76(1):103–10.
301. Mabhandi T, Ramdin T, Ballot DE. Growth of extremely low birth weight infants at a tertiary hospital in a middle-income country. *BMC Pediatr.* 2019;19(1):1–9.
302. Ekhard E Ziegler. Nutrient requirements of premature infants. *Nestle Nutr Work Ser Pediatr Progr.* 2007;59:161–72.
303. 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(3):390–7.
304. Van Goudoever JB, Sulkers EJ, Lafeber HN, Sauer PJJ. Short-term growth and substrate use in very-low-birth-weight infants fed formulas with different energy contents. *Am J Clin Nutr.* 2000;71(3):816–21.
305. Tonkin E, Miller J, Makrides M, McPhee AJ, Morris SA, Gibson RA, *et al.* Dietary protein intake, breast feeding and growth in human milk fed preterm infants. *Int J Environ Res Public Health.* 2018;15(6):1196.

306. Cormack, B.E.; Bloomfield F. Audit of feeding practices in babies<1200 g or 30 weeks gestation during the first month of life. *Paediatr Child Heal.* 2006;42:458–463.
307. Olsen IE, Richardson DK, Schmid CH, Ausman LM, Dwyer JT. Extremely Premature Infants. *Güncel Retin Derg (Current Retin Journal).* 2018;110(6):59–62.
308. Loui, A.; Tsalikaki, E.; Maier, K.; Walch, E.; Kamarianakis, Y.; Obladen M. Growth in high risk infants < 1500 g birthweight during the first 5 weeks. *Early Hum Dev.* 2008;84:645–650.
309. Sauer CW, Kim JH. Human milk macronutrient analysis using point-of-care near-infrared spectrophotometry. *J Perinatol.* 2011;31(5):339–43.
310. Adriana Martins de Lima 1, Ana Lucia Goulart 2, Adriana Bruscatto Bortoluzzo 3 BIK. Nutritional practices and postnatal growth restriction in preterm newborns. *Rev Assoc Med Bras.* 2015;61(6):500–6.
311. Maas C, Mathes M, Bleeker C, Vek J, Bernhard W, Wiechers C, *et al.* Effect of increased enteral protein intake on growth in human milk-fed preterm infants a randomized clinical trial. *JAMA Pediatr.* 2017;171(1):16–22.
312. Belfort MB, Edwards EM, Greenberg LT, Parker MG, Ehret DY, Horbar JD. Diet, weight gain, and head growth in hospitalized US very preterm infants: A 10-year observational study. *Am J Clin Nutr.* 2019;109(5):1373–9.
313. Ernst KD, Radmacher PG, Rafail ST, Adamkin DH. Postnatal malnutrition of extremely low birth-weight infants with catch-up growth postdischarge. *J Perinatol.* 2003;23(6):477–82.
314. McLeod G, Sherriff J, Hartmann PE, Nathan E, Geddes D, Simmer K. Comparing different methods of human breast milk fortification using measured v. assumed macronutrient composition to target reference growth a randomised controlled trial. *Br J Nutr.* 2016;115(3):431–9.
315. Cormack BE, Bloomfield FH. Increased protein intake decreases postnatal growth faltering in ELBW babies. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2013 Sep;98(5):F399-404.
316. Stefanescu BM, Gillam-Krakauer M, Stefanescu AR, Markham M, Kosinski JL. Very low birth weight infant care: Adherence to a new nutrition protocol improves growth outcomes and reduces infectious risk. *Early Hum Dev.* 2016;94:25–30.
317. Graziano PD, Tauber KA, Cummings J, Graffunder E, Horgan MJ. Prevention of postnatal growth restriction by the implementation of an evidence-based premature infant feeding bundle. *J Perinatol.* 2015;35(8):642–9.

BIBLIOGRAFIA

318. Senterre T, Rigo J. Optimizing early nutritional support based on recent recommendations in vlbw infants and postnatal growth restriction. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2011;53(5):536–42.
319. Ramel SE, Brown LD, Georgieff MK. The Impact of Neonatal Illness on Nutritional Requirements: One Size Does Not Fit All. *Curr Pediatr Rep.* 2014;2(4):248–54.
320. Scott A Lorch. The clinical and policy implications of new measures of premature infant growth. *Pediatrics.* 2015;135(3):703–4.

ANNEXES

Annex 1. Publicació Borràs-Novell *et al.* 2022 titulada *Influence of maternal and perinatal factors on macronutrient content of very preterm human milk during the first weeks after birth.*

www.nature.com/jp

Journal of Perinatology

ARTICLE OPEN

Check for updates

Influence of maternal and perinatal factors on macronutrient content of very preterm human milk during the first weeks after birth

Cristina Borràs-Novell ¹, Ana Herranz Barbero ¹, Carla Balcells Esponera², Miriam López-Abad², Victoria Aldecoa Bilbao ¹, Montserrat Izquierdo Renau² and Isabel Iglesias Platas^{2,3}

© The Author(s) 2022

OBJECTIVE: To identify changes in macronutrient content of very preterm human milk associated with perinatal factors.
STUDY DESIGN: Milk macronutrients were measured on weeks 1, 2, 4 and 8 with mid-infrared transmission spectrometers.
RESULT: We assessed 625 samples (from 117 mothers and 130 very preterm infants). Average concentrations were: protein 1.3 ± 0.3 g/dl, carbohydrates 7.3 ± 0.6 g/dl, fat 3.7 ± 1.0 g/dl and energy 296.0 ± 41.0 kJ/dl (70.7 kcal/dl). Gestational age negatively correlated with protein ($\rho = -0.307, p < 0.001$) and energy ($r = -0.193, p = 0.003$). Advanced maternal age, gestational age and intrauterine growth restriction were independently associated with milk protein content over the first 4 weeks (adjusted R^2 : 0.113, $p = 0.002$).
CONCLUSION: These findings may help neonatologists identify patients fed Mother's Own Milk who are at increased risk of poor postnatal growth.

Journal of Perinatology (2023) 43:52–59; <https://doi.org/10.1038/s41372-022-01475-6>

INTRODUCTION

Postnatal growth restriction is one of the most prevalent problems in preterm infants [1]. Around 50% of growth in very premature infants (VPI) is estimated to depend on nutritional support [2]. Following an initial period of parenteral nutrition, enteral feeding is provided as milk, with Mother's Own Milk (MOM) as the best option [3], due to its strong association with a reduction in the incidence of some prematurity-related diseases (such as necrotizing enterocolitis), and with a more favourable neurodevelopmental outcome [4–6] both of which might be related to an array of bioactive factors [7]. The last published guidance for enteral nutrition in preterm infants by the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) [8] recommends an intake of 110–135 kcal/kg/day with between 3.5 and 4.0 (for patients weighing 1000–1800 g) and 4.0–4.5 g/kg/day (if under 1000 g) of protein. Despite all other clear benefits, the nutritional content of human milk is insufficient to meet these high demands, and fortification is required to increase the concentration of protein, calcium and phosphorus [9].

Macronutrient content of human milk is highly variable and it changes in association with time [10], maternal age, diabetes or obesity, multiple pregnancy or parity, neonatal birth weight or gender [11–15]. Most available information on this topic applies to lactation after term delivery, but more recent studies focus in the relationship between preterm milk composition and maternal, pregnancy and neonatal factors [11, 12, 16–19]. Disparity in

methodological aspects and results make it complicated to draw firm conclusions [20]. Studies span different gestational ages, analyze single or pooled samples and use a variety of techniques to determine macronutrient content.

Nutrient variability in milk may cause cumulative deficits over time in VPI despite fortification and may play a role in poor postnatal growth [21, 22]. Although targeted fortification could help, it requires considerable economic and human resources [23]. Information on the impact of maternal, gestational or neonatal characteristics on milk macronutrient composition could help identify mother-infant pairs at higher risk of extrauterine growth restriction and move towards a more individualized nutritional support [24].

In this context, we aimed to measure macronutrient content of very preterm milk and to identify changes associated with time and maternal, gestational and neonatal characteristics.

METHODS

We designed an observational prospective bicentric cohort study. The study followed the reporting guidelines for observational studies (Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology - STROBE) [25]. The protocol was approved by the local research ethics committees from Fundació Sant Joan de Déu (PIC-147-17) and Hospital Clínic de Barcelona (HCB/2016/0959).

Lactating mothers and their VPI (delivery at or before 32⁰ weeks of gestation) admitted to the Neonatal Unit between January 2018 and

¹Neonatology Department, BCNatal – Centre de Medicina Maternofetal i Neonatologia de Barcelona, Hospital Clínic, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. ²Neonatology Department, BCNatal – Centre de Medicina Maternofetal i Neonatologia de Barcelona, Hospital Sant Joan de Déu, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. ³Neonatal Intensive Care Unit, Norfolk and Norwich University Hospital, Norwich, UK. [✉]email: cborrasn@clinic.cat

Received: 22 April 2022 Revised: 15 July 2022 Accepted: 21 July 2022
Published online: 5 August 2022

SPRINGER NATURE

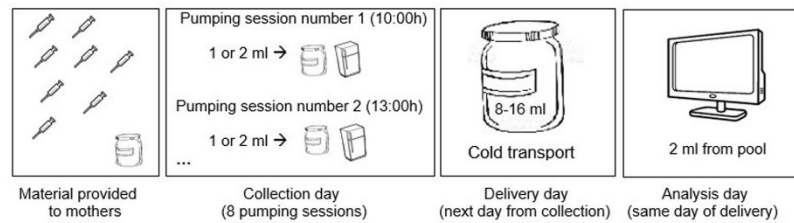


Fig. 1 Sample collection process. The image belongs to the instructions given to participating mothers at recruitment.

January 2020 were consecutively approached for inclusion in the study when milk production exceeded enteral feeding requirements. Mothers of newborns with congenital malformations, known chromosomal, genetic or metabolic anomalies or low chances of short-term survival as per judgment of the attending clinician were excluded. Parents of eligible neonates provided written informed consent. The study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki.

Representative samples of milk produced in a 24 h period (10am to 10am) were obtained by educating participants upon recruitment for the extraction, collection and conservation of samples. They were instructed to manually homogenize their milk immediately after each pumping session by swirling the bottle, before transferring 1–2 ml with a sterile syringe to an independent container, separated from the milk that was going to be used for feeding. This was repeated after each expression (minimum of 15 min), with a recommendation for 8 or more sessions a day, whether by hand or with the help of a manual or electric pump. Two ml from the pool (8–16 ml in total) were used for milk macronutrient analysis; the remaining milk was frozen at -80°C for further research related to other aspects of preterm human milk, as showed in Fig. 1. This was repeated on weeks 1, 2, 4 and 8 after delivery or until discharge, whichever was first. On weeks 3, 5, 6, and 7 mothers delivered a single morning sample. Due to the singular biological relevance and the limited volume of colostrum, the first study sample was collected between day 7 and 10 of lactation. Overall composition over the first 4 weeks of life was calculated for each macronutrient as the average of the results of daily pooled samples for weeks 1, 2, and 4.

Macronutrient content was measured with a mid-infrared transmission spectrometer (MIRIS Human Milk Analyzer[®], MIRIS solutions, Uppsala, Sweden), following manufacturer's instructions. MIRIS Human Milk Analyzer[®] measures lipids and total protein (g/dl) and estimates true protein, carbohydrates (g/dl) and energy (kcal/dl). For this study, true protein (reflects the nitrogen associated with protein) was estimated by subtracting a theoretical 20% non-protein nitrogen from the measured total protein [26] and energy was calculated by the formula: $4.4 \text{ kcal} \cdot \text{g}$ of total protein + $9.25 \text{ kcal} \cdot \text{g}$ of fat + $4 \text{ kcal} \cdot \text{g}$ of carbohydrate [27], and was transformed into kilojoules (kJ). This device has demonstrated repeatability of $<0.05\%$ and accuracy of $<0.1\%$ [11] and has been previously shown to be adequate for macronutrient measurement of human milk, although some variability may arise from the presence of human oligosaccharides and non-protein nitrogen and the technique is also vulnerable to heterogeneity in sample preparation [28]. Given that some of the limitations arise from sample treatment, efforts were taken to standardize collection and pre-analytical treatment as much as possible and actual measurements were mostly restricted to two trained operators (CBN, MLA), one per site. Milk aliquots were warmed to room temperature, manually homogenized, and subsequently heated up to 40°C in a thermal block or water bath before injection in the cuvette. We mainly addressed protein and fat/energy content, as the main determinants of preterm growth [22] and used 24 h pooled milk to mitigate the effects of circadian variation. Week 1 and week 4 were assumed to represent early/transitional and mature composition, respectively.

Maternal, obstetric and neonatal demographic and clinical data were obtained from clinical charts and from self-reported information during an interview upon recruitment. Intrauterine growth restriction (IUGR) was defined as estimated foetal weight under percentile 3 or under percentile 10 with placental dysfunction. Hypertensive disorder of pregnancy was defined as maternal blood pressure higher than 140/90 mmHg and increased angiogenic factors or evidence of damage to a target organ (including hepatic, renal, hematological or cerebral disease) not attrib-

table to another cause. Delivery modes were vaginal delivery (which included instrumental delivery) and caesarean section (specifying with or without labour). Labour was defined as the presence of painful uterine contractions together with cervical dilatation.

All data were collected and managed in a database specifically created for this study using REDCap electronic data capture tools hosted at Hospital Sant Joan de Déu, within the REDCap secure platform with codification of participants [29].

Statistical analysis was performed with the SPSS[®] (Social Package for Social Sciences, IBM Corporation, USA) software, v25. Normality was tested with the Kolmogorov–Smirnov test and by visual inspection of histograms. Pearson and Spearman correlations were used to explore relationships between quantitative variables; differences between groups were analyzed by chi-square tests for categorical variables, Student's *t* or ANOVA for continuous variables with normal distribution or non-parametric tests if distribution was not normal. In order to assess the impact of maternal/perinatal conditions on macronutrient content while considering potential confounding effects, we used linear regression models with the macronutrient concentration at a specific time point as the dependent variable and the conditions that reached significance in univariate analysis as independent variables. Differences in macronutrients over time in the whole sample were assessed by a linear mixed model to account for repeated measures and missing data, using an autoregressive heterogeneous covariance structure, and time as a fixed effect, where fixed effects of time (weeks) were categorical. Statistical significance was set at 0.05.

Based on previously reported data on preterm milk composition and accepting an alpha risk of 0.05 and 80% statistical power, we calculated that we would need a minimum sample of 33 patients per group (based on maternal/perinatal conditions) to detect a difference of 7 kcal/100 mL and of 0.15 g of protein/100 mL, both of which have been previously shown to have an impact on preterm growth [30].

RESULTS

We recruited 192 mothers delivering very preterm infants at 32⁰ or less week's gestation during the study period. Of them, 117 women (having delivered 130 VPI) contributed samples with a valid macronutrient reading during hospital stay. All mother-infant/s dyads/triads were followed up until discharge.

Maternal and neonatal characteristics

Forty-five mothers (38.8%) were over 35 years old, and more than half (66, 56.4%) were primiparous women. In relation to maternal body mass index, eleven (9.4%) mothers were underweight, twenty-one (17.9%) were overweight and seventeen (14.5%) were obese. Eleven mothers (9.4%) suffered from gestational diabetes.

There were twenty multiple gestations (17.1%). Twenty mothers (17.1%) suffer from hypertensive disorders of pregnancy and 23 mothers (19.7%) were diagnosed with IUGR. About half of deliveries were vaginal (54, 46.2%) and the other half by caesarean section (62–53.0%), of which 25 (40.3%) were elective caesarean sections without labour. Regarding lactation history, 30 women (25.6%) had previously breastfed for a median of 13.4 ± 10.7 months (exclusively for a median of 4.8 ± 2.5 months).

Mean gestational age at delivery was 28.7 ± 2.3 weeks (range 23^3 – 32^0) and mean birth weight 1167 ± 380 grams (range: 460–1900). There were 69/130 (53.1%) boys.

Global milk macronutrient composition and evolution with lactation time

Infrared technology was used to analyze 648 human milk samples. Twenty-three results (3.5%) were considered outliers and excluded, as they fell outside the measuring range of the device \pm reported accuracy [31], leaving 625 valid readings. Three-hundred and nineteen of them (51.4%) correspond to 24 h pools, and Table 1 summarizes their average macronutrient and energy content. Associations between milk composition and time and maternal/neonatal characteristics were explored using these 319 pooled samples in order to avoid the possible effects of circadian rhythms.

There was a decrease in fat, protein and energy and an increase in carbohydrate content with length of lactation. Differences were significant from week 1 to 4 when analyzed from the results of 24 h pooled samples (weeks 1, 2, and 4), with significant differences between the 3 time points in all-paired analysis for protein, carbohydrate and energy and between weeks 1 and 4 for fat (Fig. 2). We did not attempt to analyze later weeks due to a much smaller sample size per time point.

Macronutrient concentration in milk in relation to maternal, gestational and neonatal characteristics

Table 2 summarizes statistically significant results of univariate analysis of associations between maternal/perinatal conditions and preterm milk macronutrient content in the 24-hour pooled samples at different time points during lactation.

Maternal conditions. Advanced maternal age was related to higher milk protein concentration (Table 2), without differences in energy content. There was a weak positive correlation between maternal age and week 1 and week 2 milk protein concentration ($r = 0.216, p = 0.037$; $r = 0.322, p = 0.001$, respectively).

Overweight and obese mothers had higher protein, fat, and energy content in mature (week 4) milk (Table 2), with no differences in overall composition over the first 4 weeks.

Pregnancy characteristics. Nutritional content was lower in the milk of mothers delivering multiples, both in early lactation, mature milk and average protein and energy content over the first 4 weeks (Table 2).

Mothers with hypertensive disorders of pregnancy produced early milk with lower fat and energy content, but the contrary was true regarding week 4 protein, which was higher in mothers with pre-eclampsia/eclampsia (Table 2).

Protein concentration was higher in milk from mothers of singleton IUGR babies, both at week 4 and over the first 4 weeks of lactation (Table 2).

We found no differences between mothers that had and had not experienced gestational diabetes.

Labour and delivery. There were no differences in milk composition between mothers who underwent caesarean section and those who did not, but women who had been in labour had lower protein in week 4. There were no detectable differences in the average protein and energy content over the first 4 weeks.

Lactation history. Average protein content over the first 4 weeks of lactation was lower in women who had previously breastfed. There was a positive moderate correlation between duration of previous lactation (in months) and protein content during the first 4 weeks of lactation ($\rho = 0.436, p = 0.029$).

Table 1. Macronutrient and Energy Concentration in Very Premature Mother's Milk in the Pooled Samples from Weeks 1, 2, 4, and 8.

	Week 1 (n = 94)		Week 2 (n = 99)		Week 4 (n = 84)		Week 8 (n = 42)		p-value*	Average concentration in pooled samples from weeks 1, 2, 4, and 8 (n = 319)			
	Mean \pm SD	Range	Mean \pm SD	Range	Mean \pm SD	Range	Mean \pm SD	Range		Mean \pm SD	Range		
True protein (g/dl)	1.5 ± 0.3	1.3–2.2	1.3 ± 0.2	1.1–2.2	1.1 ± 0.2	1.1–2.2	1.1 ± 0.2	1.1–2.2	<0.0001	1.3 ± 0.3	0.7–2.5	1.3 ± 0.2	0.9–2.5
Carbohydrate (g/dl)	7.1 ± 0.6	5.6–8.2	7.3 ± 0.5	5.6–8.2	7.5 ± 0.5	5.6–8.9	7.5 ± 0.5	5.6–8.9	<0.0001	7.3 ± 0.6	5.6–8.9	7.2 ± 0.5	6.0–8.2
Lipids (g/dl)	3.9 ± 1.1	1.2–6.4	3.8 ± 1.0	1.1–6.5	3.4 ± 0.9	1.1–6.5	3.7 ± 0.9	1.1–6.5	<0.0001	3.7 ± 1.0	1.1–6.5	3.7 ± 0.9	1.2–6.4
Energy (kcal/dl)	305.6 ± 45.2	170.8–401.9	300.1 ± 39.3	171.6–414.4	281.3 ± 35.6	171.6–414.4	294.3 ± 36.8	171.6–414.4	<0.0001	296.0 ± 41.0	171.6–414.4	296.8 ± 36.4	170.8–401.9
Energy (kcal/dl)	73.0 ± 10.8	40.8–96.0	71.7 ± 9.4	41.0–99.0	67.2 ± 8.5	41.0–99.0	70.3 ± 8.8	41.0–99.0	<0.0001	70.7 ± 9.8	41.0–99.0	70.9 ± 8.7	40.8–96.0

SD Standard deviation.

*p-value for the linear mixed effects model for repeated measures per subject with week as fixed effect

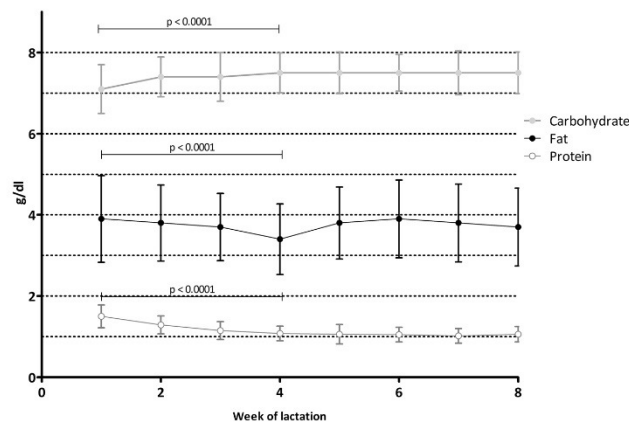


Fig. 2 Macronutrient concentration (g/dl) by week of lactation. Circles indicate the mean and error bars represent standard deviation ($n = 625$). Statistical analysis was performed on the results of 24 h pooled samples (weeks 1, 2, and 4, $n = 277$), resulting in significant differences from week 1 to 4 (type III test of fixed effects for fat: $F 9.468$, $p < 0.0001$; differences were significant between week 1 and 4: $p < 0.0001$, week 2 and 4: $p = 0.001$, but not between weeks 1 and 2: $p = 0.199$. Protein: $F 110.245$, $p < 0.0001$, with significant differences between weeks in all paired analysis; Carbohydrate: $F 16.918$, $p < 0.0001$, with significant differences between weeks in all paired analysis. Energy: $F 11.839$, $p < 0.0001$, with significant differences between weeks in all paired analysis).

Neonatal characteristics. Gestational age was negatively weak correlated with protein content on week 1 ($\rho: -0.337$, $p < 0.001$), week 4 ($\rho: -0.217$, $p = 0.036$) and average protein content during the first 4 weeks ($\rho: -0.307$, $p < 0.001$). It also negatively weak correlated with fat ($r: -0.202$, $p = 0.038$) and energy ($r: -0.229$, $p = 0.018$) on week 1 and with average energy content during the first 4 weeks ($r: -0.193$, $p = 0.003$). There were no differences according to neonatal gender.

Multivariate analysis

The only independent predictors of early milk protein and energy (week 1) content were gestational age and having suffered a hypertensive disorder of pregnancy. Protein concentration at 4 weeks was independently influenced by multiple gestation, maternal pre-pregnancy BMI higher than 25 and the presence of labour before birth. Energy content on week 4 was related to both maternal overweight/obesity and hypertensive disorders of pregnancy.

The best model for predicting average milk protein content over the first 4 weeks included older maternal age (35 years or older), duration of pregnancy and presence of IUGR (Fig. 3). We could not find a combination of maternal and pregnancy characteristics which were predictive of milk energy content over the first 4 weeks. Final regression models are summarized in Table 3.

DISCUSSION

Our results on global macronutrient (protein, carbohydrate, fat) concentrations are in line with those from similar populations [12, 16, 22, 32]. Fat content was the most variable, with up to 6-fold concentration difference between samples, followed by protein (4-fold concentration range), as previously reported [32, 33].

Evolution of milk composition with lactation time

We have confirmed previous findings suggesting that macronutrient composition of preterm human milk changes over time,

with an inverse relationship between protein content and days of lactation. In contrast with other reports [13, 16, 18], average protein concentration in our population remains above 1 g/dl at least for the first 8 weeks. Even so, milk from mothers included in our study would fail to meet protein intake recommendations [8] after standard fortification at 160 ml/kg/day of volume intake in 3 out of 4 samples for patients under 1000 g. Arslanoglu et al. [34] observed a consistent deficit between 0.5 and 0.8 g/dl when comparing estimated and measured protein intake of fortified human milk [34]. Regarding fat, most studies describe an increase in content over time [10, 17, 18, 35], but they generally include a first measurement within the first days of lactation, while our schedule would miss the lipid increase from colostrum to transitional milk (first sample on day 7). In our samples, fat decreased over the first month and then increased. Although some authors report erratic distributions of fat content [13, 18], we think that, in our case, it is likely that women contributing samples from week 4 onwards were mothers to infants of lower gestational ages, who, as seen, tend to have milk with a higher fat content.

Macronutrient concentration in milk in relation to maternal characteristics

Maternal age. Some differences have been reported regarding fat content in relation to maternal age [11, 36–38], but not protein concentration. This might be due to heterogeneous target populations, sampling or cut points for the definition of advanced maternal age. Older mothers might also carry a higher risk of obstetric complications like gestational diabetes and preeclampsia, which might act as confounders [39, 40], although this was not the case in our sample.

Maternal BMI. Most previous studies find differences similar to ours in milk macronutrient at different points in the first month of lactation between obese and non-obese mothers, particularly regarding a higher fat content, and occasionally also a higher protein content [11, 13, 14, 17, 37, 41]. It has been speculated that

Table 2. Results of univariate analysis of associations between maternal and gestational conditions and preterm milk macronutrient content at different time points ($n = 277$).

Nutrient	Condition	Time point	Concentration	95% CI of difference	p-value		
Protein in g/dl	Maternal	Age (years old)	Week 1	<35	1.5 ± 0.3	0.005–0.240	0.043
			≥35	1.6 ± 0.3			
		1 st 4 weeks of lactation	<35	1.3 ± 0.2	0.023–0.211	0.022	
			≥35	1.4 ± 0.3			
	BMI (kg/m ²)	Week 4	<25	1.1 ± 0.2	0.020–0.183	0.010	
			≥25	1.2 ± 0.2			
	Gestational	Multiple	Week 1	Yes	1.4 ± 0.3	0.007–0.302	0.003
				No	1.5 ± 0.3		
			Week 4	Yes	1.0 ± 0.1	0.098–0.221	<0.001
				No	1.1 ± 0.2		
		1 st 4 weeks of lactation	Yes	1.2 ± 0.3	0.004–0.244	0.001	
			No	1.4 ± 0.2			
		IUGR	Week 4	Yes	1.2 ± 0.2	(–0.230)–(–0.045)	0.010
				No	1.1 ± 0.2		
1 st 4 weeks of lactation	Yes	1.4 ± 0.3	(–0.235)–(–0.006)	0.047			
	No	1.3 ± 0.2					
Hypertensive disorders	Week 4	Yes	1.2 ± 0.2	(–0.221)–(–0.015)	0.043		
		No	1.1 ± 0.2				
Labour and delivery	Labour	Week 4	Yes	1.1 ± 0.2	0.051–0.229	0.004	
			No	1.2 ± 0.2			
Lactation history	Previous lactation	1 st 4 weeks of lactation	Yes	1.3 ± 0.3	(–0.028)–0.192	0.029	
			No	1.4 ± 0.2			
Fat in g/dl	Maternal	BMI (kg/m ²)	Week 4	<25	3.2 ± 0.8	0.067–0.907	0.018
			≥25	3.7 ± 0.9			
	Gestational	Multiple	Week 4	Yes	3.0 ± 0.0	0.22–0.925	0.018
				No	3.5 ± 0.9		
Hypertensive disorder of pregnancy	Week 1	Yes	3.3 ± 1.2	0.116–1.267	0.019		
		No	4.0 ± 1.0				
Energy in kJ/dl (in kcal/dl)	Maternal	BMI (kg/m ²)	Week 4	<25	274.2 ± 34.7 (65.6 ± 8.3)	0.663–8.676	0.023
				≥25	293.9 ± 35.6 (70.2 ± 8.5)		
	Gestational	Multiple	Week 4	Yes	262.9 ± 22.2 (62.8 ± 5.3)	2.412–9.266	0.001
				No	285.9 ± 36.4 (68.3 ± 8.7)		
		1 st 4 weeks of lactation	Yes	286.3 ± 36.4 (68.4 ± 8.7)	(–1.244)–7.255	0.043	
			No	298.9 ± 36.4 (71.4 ± 8.7)			
Hypertensive disorder of pregnancy	Week 1	Yes	279.6 ± 52.7 (66.8 ± 12.6)	0.243–14.286	0.014		
		No	309.8 ± 42.3 (74.0 ± 10.1)				

this could be the result of higher substrate availability due to increased serum concentrations of free fatty acids and amino acids in obese women [14] or relate to other metabolic abnormalities [11, 42].

Macronutrient concentration in milk in relation to obstetric characteristics

Multiple pregnancy. Multiple birth has seldom been considered when studying milk composition. Congiu et al. described a higher protein and lower fat content in a small sample of preterm multiples, while our results point to a lower concentration of protein, fat and energy in mature milk of mothers of multiples [43]. The much higher proportion of small for gestational age in the multiples in the Italian study (18.6 vs 3.7%) might partially

explain the discrepancy. Lower macronutrient concentration has been related to higher milk yields [44]. We unfortunately do not have data on milk production from our participants, but there might be a selection bias due to the criteria of milk volumes been enough to cover for infant feeding requirements, which will obviously be higher when providing for more than one baby.

Pregnancy complications. In agreement with our results, a lower earlier fat content and a higher protein density after the first few weeks following preterm birth in mothers with a history of preeclampsia [45] have been reported. The relationship between suboptimal fetal growth and human milk macronutrients is controversial, likely due to heterogeneity in definition of IUGR and in the gestational age of target populations. The

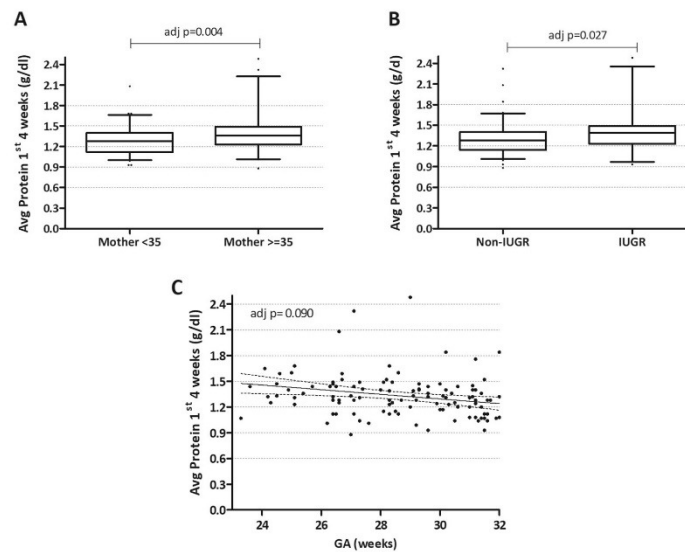


Fig. 3 Factors associated with average protein concentration over the first 4 weeks of lactation (g/dl) in multivariate analysis. The average protein concentration was calculated based on pooled samples from weeks 1, 2 and 4 ($n = 277$). **A, B** Boxplots comparing mean concentration between groups by maternal age and presence of IUGR, with boxes outlined between the first and the third quartile, and a horizontal line in the median. The whiskers span between the 5th and the 95th centile. **C** Scatterplot showing average protein content over the first 4 weeks against gestational age at birth. Best-fit regression line with 95% CI is also shown.

forementioned study by Correia et al. described a weak negative association of IUGR with fat but not protein content during the first weeks, which is in disagreement to our findings [45]. This may be due to differences in other characteristics (maternal BMI, breastfeeding history) that we have found to have an association and were not included in their analysis.

Labour and delivery. It is biologically plausible that physiologic changes associated with labour, rather than the final delivery route, might change milk composition in the same way it has been shown to impact the maternal hormonal response to breastfeeding (especially oxytocin and prolactin levels) [46]. In our data, the presence of labour related to a lower concentration of protein in week 4, in line with other authors [13, 36]. Results are more controversial regarding early milk [13, 38], and other studies [32] find no differences at all at any time point.

Lactation history. In agreement with another cohort of mothers delivering very prematurely [37], women who had previously breastfed had lower protein concentration during the first month. It has been hypothesized that this is due to a faster onset of type II lactogenesis and an increased milk production [37]. Surprisingly, within this subgroup of mothers we also see a positive correlation between duration of previous lactation and milk protein content during the first 4 weeks after delivery. Although it may seem unexpected, it has been reported that protein content increases in prolonged (more than 12 months) or in tandem lactations [47]. It could be speculated that duration of previous lactation or a shorter interlactation period (as would be expected to be associated with longer periods of breastfeeding an older sibling) might have an impact on subsequent milk composition, although we could not find any previous research on this topic.

Macronutrient concentration in milk in relation to neonatal characteristics

We found an inverse relationship between gestational age and protein concentration during the first month of lactation, as reported by most authors [11, 37, 43, 48]. This has been proposed to be the result of mammary gland immaturity with a reduced in blood flow, incomplete differentiation of epithelial cells and an absence of junctions [49, 50].

Our study has some limitations. Macronutrient analysis of the samples were performed uniquely. Some studies confirm their results by performing duplicate analysis [32] or by checking the results with classical methods [26]. Even efforts were made to ensure identical methodology; results may be influenced by center. Our results do not differentiate between colostrum and transitional milk.

According to the findings of our observational study, gestational age negatively correlated with both protein and energy content of milk, and younger mothers, with lower BMI, having non-IUGR babies and multiples might have lower average protein content during the first weeks of lactation. Neonatologists should be aware that intake calculations based on general estimations of milk macronutrients may well be inaccurate and standard fortification may leave some patients well under the high protein intake requirements of VPI [51]. Identifying mothers at risk of having lower protein or caloric milk density could help guide more personalized nutritional interventions [16, 51, 52], like adjusted, targeted or double fortification, as cumulative protein and caloric intake deficits over the first few weeks of life of a VPI will negatively affect postnatal growth [2]. Although changes in composition were numerically small, some were consistent over the first month of lactation, so that any impact on neonatal growth would be amplified when calculating cumulative deficits

Table 3. Multivariate analysis of perinatal factors influencing maternal milk composition by linear regression. Best fitting models were selected by the backwards method, with a p-value cut-off of 0.100, after inputting all variables with statistical significance in the univariate analysis.

Time point	Nutrient	Best Model		Coefficients	Standardized β coefficients	Adjusted p-value
		Adjusted R ²	p-value			
Week 1	Protein ^a	0.051	0.018	Gestational age	-0.247	0.018
	Energy ^b	0.055	0.014	Hypertensive disorder of pregnancy	-0.257	0.014
Week 2	Protein ^c	0.085	0.002	Maternal age (years)	0.307	0.002
Week 4	Protein ^d	0.326	<0.0001	Multiple gestation	-0.227	0.024
				Maternal BMI \geq 25	0.286	0.005
	Energy ^e	0.083	0.016	Labour before birth	-0.447	<0.0001
				Maternal BMI \geq 25	0.257	0.023
1st 4 weeks of lactation	Protein ^f	0.113	0.002	Hypertensive disorder of pregnancy	0.209	0.062
				Maternal age \geq 35 years	0.272	0.004
				IUGR	0.209	0.027
				Gestational age	-0.160	0.090

Initial factors in the models: ^aProtein week 1: multiple pregnancy, Hypertensive disorder of pregnancy, maternal age, gestational age / ^bEnergy week 1: Hypertensive disorder of pregnancy, presence of labour, gestational age, alcohol consumption / ^cProtein week 2: multiple pregnancy, maternal age (years), gestational age / ^dProtein week 4: multiple pregnancy, IUGR, Hypertensive disorder of pregnancy, presence of labour, gestational age, maternal BMI $<$ 25 or \geq 25 kg/m² / ^eEnergy week 4: multiple pregnancy, Hypertensive disorder of pregnancy, maternal BMI $<$ 25 or \geq 25 kg/m², smoking / ^fAverage protein over the 1st 4 weeks of lactation: multiple pregnancy, Hypertensive disorder of pregnancy, maternal age $<$ 35 or \geq 35 years old, gestational age, IUGR, previous breastfeeding.

[2]. Our study supports the need for nutritional analysis of human milk that could be focused on children with poor postnatal growth or on mothers with factors associated to production of milk with lower nutritional density.

DATA AVAILABILITY

The datasets generated and analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

REFERENCES

- Horbar JD, Ehrenkranz RA, Badger GJ, Edwards EM, Morrow KA, Soll RF, et al. Weight growth velocity and postnatal growth failure in infants 501 to 1500 grams: 2000-2013. *Pediatrics* 2015;136:e84-92.
- Embleton NE, Pang N, Cooke RJ. Postnatal malnutrition and growth retardation: An inevitable consequence of current recommendations in preterm infants? *Pediatrics* 2001;107:270-3.
- Dutta S, Singh B, Chessell L, Wilson J, Janes M, McDonald K, et al. Guidelines for feeding very low birthweight infants. *Nutrients* 2015;7:423-42.
- Lechner BE, Vohr BR. Neurodevelopmental outcomes of preterm infants fed human milk: A systematic review. *Clin Perinatol*. 2017;44:69-83.
- Lucas A, Cole TJ. Breast milk and neonatal necrotizing enterocolitis. *Lancet* 1990;336:1519-23.
- Baños-Peláez M, Avila-Sosa V, Fernández-Carrocera LA, González-Pérez G, Carrera-Muñoz S, Rivera-Rueda MA, et al. Estimating neonatal necrotizing enterocolitis based on feeding practices. *Children* 2021;8:1-16.
- Ballard O, Morrow AL. Human milk composition. Nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am*. 2013;60:49-74.
- Agostoni AC, Buonocore G, Carnielli VP, De Curtis M, Darmaun D, Decsi T, et al. Enteral nutrient supply for preterm infants: Commentary from the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Committee on Nutrition for the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010;1:85-91.
- Arslanoglu S, Boquien CY, King C, Lamireau D, Tonetto P, Barnett D, et al. Fortification of human milk for preterm infants: Update and recommendations of the European milk bank association (EMBA) working group on human milk fortification. *Front Pediatr*. 2019;7:1-14.
- Mimouni FB, Lubetzky R, Yochpaz S, Mandel D. Preterm human milk macronutrient and energy composition: A systematic review and meta-analysis. *Clin Perinatol*. 2017;44:165-72.

- Dritsakou K, Liosis G, Valsami G, Polychronopoulos E, Skouroliakou M. The impact of maternal- and neonatal-associated factors on human milk's macronutrients and energy. *J Matern Neonatal Med*. 2017;30:1302-8.
- Hascoët JM, Chauvin M, Pierret C, Skweres S, Van Egroo LD, Rougé C, et al. Impact of maternal nutrition and perinatal factors on breast milk composition after premature delivery. *Nutrients* 2019;11:1-8.
- Burianova I, Bronsky J, Pavlikova M, Janota J, Maly J. Maternal body mass index, parity and smoking are associated with human milk macronutrient content after preterm delivery. *Early Hum Dev*. 2019;137:104832.
- Bzikowska-Jura A, Czerwonogrodzka-Senczynna A, Oleđzka G, Szostak-Węgierek D, Weker H, Wesolowska A. Maternal nutrition and body composition during breastfeeding: Association with human milk composition. *Nutrients* 2018;10:1379.
- Ximenes Melo R, Marano D, da Silva DA, Moreira MEL. The influence of the gender of newborns on human milk composition. *Acta Paediatr Int J Paediatr*. 2020;109:1485-6.
- Kreissl A, Zwiauer V, Repa A, Binder C, Thanhaeuser M, Jilma B, et al. Human Milk Analyser shows that the lactation period affects protein levels in preterm breastmilk. *Acta Paediatr Int J Paediatr*. 2016;105:635-40.
- Bulut Ö, Çoban A, Ince Z. Macronutrient analysis of preterm human milk using mid-infrared spectrophotometry. *J Perinat Med*. 2019;47:785-91.
- Lafuente MC, Teresa Montes Bueno M, Pastrana N, Segovia C, Jarabo RM, Martin CR, et al. A prospective analysis of intake and composition of mother's own milk in preterm newborns less than 32 weeks' gestational age. *J Perinat Med*. 2019;47:106-13.
- Maly J, Burianova I, Vitkova V, Ticha E, Navratilova M, Cermakova E. Preterm human milk macronutrient concentration is independent of gestational age at birth. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2019;104:F50-6.
- Gates A, Marin T, Leo GD, Stansfield BK. Review of preterm human-milk nutrient composition. *Nutr Clin Pr*. 2021;36:1136-72.
- Andrews ET, Ashton JJ, Pearson F, Beattie RM, Johnson MJ. Early postnatal growth failure in preterm infants is not inevitable. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2019;104:10-2.
- Belfort M, Cherkerzian S, Bell K, Soldatelli B, Ramos EC, Palmer C, et al. Macronutrient intake from human milk, infant growth, and body composition at term equivalent age: A longitudinal study of hospitalized very preterm infants. *Nutrients* 2020;12:1-12.
- Embleton ND, van den Akker CHP. Protein intakes to optimize outcomes for preterm infants. *Semin Perinatol*. 2019;43:151154.
- Brennan A-MM, Murphy BP, Kiely ME. Optimising preterm nutrition: present and future. *Proc Nutr Soc*. 2016;75:154-61.
- Vandenbroucke JP, Von Elm E, Altman DG, Gøtzsche PC, Pocock SJ, et al. Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE): Explanation and elaboration. *Epidemiology* 2007;18:805-35.

26. Groh-Wargo S, Valentic J, Khaira S, Super DM, Collin M. Human milk analysis using mid-infrared spectroscopy. *Nutr Clin Pr.* 2016;31:266–72.
27. García-Lara NR, Escuder-Vieco D, García-Algar O, De La Cruz J, Lora D, Pallás-Alonso C. Effect of freezing time on macronutrients and energy content of breastmilk. *Breastfeed Med.* 2012;7:295–301.
28. Borràs-Novell C, Herranz Barbero A, Aldecoa-Bilbao V, Feixas Orellana G, Balcells Esponera C, Sánchez Ortiz E, et al. Infrared analyzers for the measurement of breastmilk macronutrient content in the clinical setting. *Expert Rev Mol Diagn.* 2020;20:867–87.
29. Harris PA, Taylor R, Minor BL, Elliott V, Fernandez M, O'Neal L, et al. The REDCap consortium: Building an international community of software platform partners. *J Biomed Inform.* 2019;95:103208.
30. Hu F, Tang Q, Wang Y, Wu J, Ruan H, Lu L, et al. Analysis of nutrition support in very low-birth-weight infants with extrauterine growth restriction. *Nutr Clin Pr.* 2019;34:436–43.
31. MIRIS Solutions. Human Milk Analyzer User Manual. 2017 [cited 2019 May 21]; Available from: www.MirisSolutions.com/support/user-manual.
32. Fumeaux CF, García-Rodenas C, Castro CDE, Courtet-Compondu M, Thakkar S, Beauport L, et al. Longitudinal analysis of macronutrient composition in preterm and term human milk: A prospective cohort study. *Nutrients* 2019;11:1525.
33. Pham Q, Patel P, Baban B, Yu J, Bhatia J. Factors affecting the composition of expressed fresh human milk. *Breastfeed Med.* 2020;15:551–8.
34. Arslanoglu S, Moro GE, Ziegler EE. Preterm infants fed fortified human milk receive less protein than they need. *J Perinatol.* 2009;29:489–92.
35. Boyce C, Watson M, Lazidis G, Reeve S, Dods K, Simmer K, et al. Preterm human milk composition: a systematic literature review. *Br J Nutr.* 2016;116:1033–45.
36. Sahin S, Ozdemir T, Katipoglu N, Akcan ABB, Turkmen MK, Kaynak Turkmen M. Comparison of changes in breast milk macronutrient content during the first month in preterm and term infants. *Breastfeed Med.* 2020;15:1–7.
37. Zachariassen G, Fenger-Gron J, Hviid MV, Halken S. The content of macronutrients in milk from mothers of very preterm infants is highly variable. *Dan Med J.* 2013;60:2–6.
38. Dizdar EA, Sari FN, Degirmencioglu H, Canpolat FE, Oguz SS, Uras N, et al. Effect of mode of delivery on macronutrient content of breast milk. *J Matern Neonatal Med.* 2014;27:1099–102.
39. Hahn WH, Jeong T, Park S, Song S, Kang NM. Content fat and calorie of human milk is affected by interactions between maternal age and body mass index. *J Matern Neonatal Med.* 2018;31:1385–8.
40. Makgoba M, Savvidou MD, Steer PJ. An analysis of the interrelationship between maternal age, body mass index and racial origin in the development of gestational diabetes mellitus. *BJOG.* 2012;119:276–82. Feb.
41. Sims C, Lipsmeyer M, Turner D, Andres A. Human milk composition differs by maternal BMI in the first 9 months postpartum. *Curr Dev Nutr.* 2020;4:1080–1080.
42. 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 concentrations of human milk. *Breastfeed Med.* 2012;7:179–88.
43. Congiu M, Reali A, Deidda F, Dessi A, Bardanzellu F, Fanos V. Breast milk for preterm multiples: More proteins, less lactose. *Twin Res Hum Genet.* 2019;22:265–71.
44. Nommsen LA, Lovelady CA, Heinig MJ, Lönnerdal B, Dewey KG. Determinants of energy, protein, lipid, and lactose concentrations in human milk during the first 12 mo of lactation: The DARLING Study. *Am J Clin Nutr.* 1991;53:457–65.
45. Correia L, Cardoso M, Papiola AL, Alves M, Virella D, Ramalho R, et al. Does fetal growth adequacy affect the nutritional composition of mothers' milk?: A Historical Cohort Study. *Am J Perinatol.* 2021; <https://doi.org/10.1055/s-0041-1727278>.
46. Nissen E, Uvnäs-Moberg K, Svensson K, Stock S, Widström AM, Winberg J. Different patterns of oxytocin, prolactin but not cortisol release during breastfeeding in women delivered by Caesarean section or by the vaginal route. *Early Hum Dev.* 1996;45:103–18.
47. Verd S, Ginovart G, Calvo J, Ponce-Taylor J, Gaya A. Variation in the protein composition of human milk during extended lactation: A narrative review. *Nutrients* 2018;10:1–10.
48. 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.
49. Anderson GH. The effect of prematurity on milk composition and its physiological basis. *Fed Proc.* 1984;43:2438–42.
50. Lönnerdal B, Lönnerdal B, Lönnerdal B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am J Clin Nutr.* 2003;77:1537S–1543S.
51. Halleux VDE, Rigo J. Variability in human milk composition: benefit of individualized. *Am J Clin Nutr.* 2013;98:529S–535S.
52. Picaud JC, Houeto N, Buffin R, Loys CM, Godbert I, Haÿs S. Additional protein fortification is necessary in extremely low-birth-weight infants fed human milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2016;63:103–5.

C. Borràs-Novell et al.

59

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CB-N: Methodology, formal analysis, investigation, preparation. AHB: Methodology, formal analysis, investigation, preparation. CBE: Methodology, formal analysis, investigation, review. MLA: formal analysis, investigation, review. VAB: formal analysis, review. MIR: Methodology, investigation, review. IIP: Conceptualization, methodology, formal analysis, investigation, preparation.

FUNDING

This manuscript is part of the Health Research Project from Instituto Nacional Carlos III (Ministry of Science and Innovation, Government of Spain) entitled "Human milk: nutrients and bioactive factors. Relationship with the development of the intestinal microbiota, the growth and health of the premature newborn" granted to IIP, with financial support from the National R+D+I Plan (PI17/00107) of the ISCIII (Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación Sanitaria), which was co-funded by the European Union Regional Development Fund (FEDER).

COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

ADDITIONAL INFORMATION

Correspondence and requests for materials should be addressed to Cristina Borràs-Novell.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022