

Tidlig introduksjon av kumelk i spedbarnsalder og risiko for type 1 diabetes

En systematisk oversikt

Ole Andreas Stølen, stud.med.



Litteraturstudium ved Medisinsk Fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

April 2014

Veileder: Geir Joner

© Forfatter

År: 2014

Tittel: Tidlig introduksjon av kumelk i spedbarnsalder og risiko for type 1 diabetes

Forfatter: Ole Andreas Stølen

<http://www.duo.uio.no/>

Abstract

Background: Several different factors point to the significance of the role of non-genetic causes in the etiology of type 1 diabetes. Some studies have suggested a positive correlation between early exposure to cow's milk in infancy and increased later risk of developing the disease, while other studies have not found such a correlation. The issue is still unresolved, and in this systematic review I will investigate the most relevant literature on the subject.

Methods: I conducted a systematic literature search in Medline and Embase databases, using predetermined inclusion and exclusion criteria. All studies comparing infant cow's milk exposure with type 1 diabetes risk were included in the review. A total of 19 studies were included, most of them being retrospective case-control designed studies.

Results: The included studies were categorized in terms of whether they showed a positive, negative or no correlation between infant cow's milk exposure and risk of type 1 diabetes, and with regard to the quality of the studies. Six of the studies' results were considered to be "positive and convincing" for increased risk of type 1 diabetes with early infant exposure, four were "positive and plausible" or "positive and lacking", and 12 showed "no effect".

Conclusions: Divergent results could be seen between the different studies included in this review with regards to whether early infant cow's milk exposure increases the risk of developing type 1 diabetes or not. On the basis of the findings in this review, one can therefore not conclude with a positive, negative or a non-existing relationship between the respective exposure and the disease.

Innholdsfortegnelse

1	Innledning.....	1
1.1	Insidens for type 1 diabetes i ulike deler av verden og endring over tid.....	1
1.2	Migrasjonsstudier	3
1.3	Tvillingstudier	5
1.4	Ulike faktorerers betydning for utviklingen av type 1 diabetes	7
1.4.1	Gener	7
1.4.2	Virus	7
1.4.3	Vitamin D.....	7
1.4.4	Omega-3 fettsyrer.....	9
1.4.5	Perinatale faktorer	9
2	Metode.....	11
2.1	Metodevalg	11
2.2	Datainnsamling.....	11
2.3	Inklusjonskriterier.....	13
2.4	Eksklusjonskriterier	14
2.5	Utvelgelse av studier og ekstraksjon av data.....	14
2.6	Metodekritikk	16
3	Resultater.....	18
3.1	Oversikt over studiene i tabellen	18
3.2	Gjennomgang av hovedresultatene i studiene	18
4	Diskusjon.....	1
4.1	Intern validitet.....	1
4.1.1	Seleksjonsskjevhet	1
4.1.2	Utøverskjevhet	2
4.1.3	Frafallsskjevhet	2
4.1.4	Måleskjevhet	3
4.1.5	Rapporteringsskjevhet.....	3
4.1.6	Konfundering	4
4.1.7	Tilfeldig variasjon	4
4.2	Ekstern validitet.....	5
4.3	Reliabilitet	6

4.4	Resultater	6
4.4.1	Mulige virkningsmekanismer	7
5	Konklusjon	9
	Litteraturliste	10
	Tabell 1: PICO	12
	Tabell 2: Søkehistorikk	12
	Tabell 3: Utvalgte studier	14
	Tabell 4: Resultater	20

1 Innledning

Type 1 diabetes (T1D) er kjennetegnet ved et selektivt tap av insulinproduserende celler i de Langerhanske øyer i pankreas hos genetisk disponerte individer. Presentasjonen av klinisk sykdom forutgår av en asymptomatisk fase med varighet av varierende lengde (1). I løpet av den perioden, oppstår diabetesrelaterte autoantistoffer i den perifere blodsirkulasjonen. Disse er markører for tiltagende autoimmunitet mot beta-cellene. Det finnes dokumentasjon på at denne autoimmuniteten kan induseres tidlig i livet (2, 3). Type 1 diabetes er en sykdom som debuterer i ung alder, krever livslang behandling med insulin, og er forbundet med betydelig komorbiditet.

1.1 Insidens for type 1 diabetes i ulike deler av verden og endring over tid

Insidensen for type 1 diabetes (T1D) varierer enormt mellom landene med flest tilfeller, og landene der sykdommen nærmest er en sjeldenhet. I 1990 begynte Verdens Helseorganisasjon et multinasjonalt prosjekt for barnediabetes (DIAMOND). Siden da har standardiserte insidensdata blitt samlet inn til WHO DIAMOND Prosjektet fram til 1999. Data ble samlet inn for barn ≤ 14 år fra 114 befolkningspopulasjoner fra 112 sentre i 57 land (4). Totalt inkluderte studien 41 % av alle verdens barn med alderen 14 år eller yngre. Øverst på lista kom Finland med en aldersjustert insidens i løpet av perioden på 40.9 nye tilfeller per 100 000 personår. Dette var over 400 ganger så høy insidens som Kina og Venezuela som hadde en insidens på 0.1 per 100 000 personår. Nest etter Finland kom Sardinia (37.8) og deretter Sverige (30.0), Kuwait (22.3), Storbritannia, Canada, Norge (20.8), Danmark (16.6), New Zealand, USA og Australia (14.5). Med unntak av Kuwait, hadde Asia ellers veldig lav insidens. Europa og Nord-Amerika utpekte seg som de områdene med aller høyest insidens. I land der det var flere diabetessentre, viste det seg også å være en markert variasjon i aldersjustert insidens mellom ulike deler av landet. Alt i alt var det ingen forskjell mellom kjønnene. Generelt sett økte insidensen med økende alder.

Studien viste en trend der den globale insidensen av T1D økte med i gjennomsnitt 2.8 % per år i løpet av perioden. Økningen var noe større i siste halvdel av perioden, men forskjellen var ikke statistisk signifikant. Denne økningen var størst i de yngste aldersgruppene: 4.0 % i gruppen 0-4 år, 3.0 % i gruppen 5-9 år og 2.1 % i gruppen 10-14 år. Dette gjaldt imidlertid

først og fremst befolkningene i Europa. Videre var økningen sterkest i sentrene med veldig høy insidens. Inndelt etter kontinenter var det statistisk signifikant insidensøkning på 4.0 % i Asia, 3.2 % i Europa og 5.3 % i Nord-Amerika. I Sentral-Amerika var det en signifikant reduksjon i insidens, men en nedadgående trend der ble kun påvist på Cuba. Generelt sett var den økende trenden sterkest i sentre med veldig høy og moderat høy insidens.

Funnet av en global trend med økning i insidensen av T1D på 2.8 % per år, stemmer overens med tidligere studier som har rapportert en trend på 2.5-3.0 % økning i insidens per år (5, 6). En slik økning i insidens er for rask til å kunne forklares av genetiske forhold. Økningen må derfor skyldes økt eksponering av miljøfaktorer som disponerer for diabetes, eller en redusert eksponering for beskyttende faktorer i miljøet. Det er blant annet slike studier som har ført til en sterk økning i jakten på ulike typer miljøfaktorer som kan forklare hvorfor stadig flere barn får denne sykdommen. I Europa ble samarbeidsforskningsprosjektet EURODIAB ACE etablert på slutten av 1980-tallet (7) for å samle informasjon om T1D i Europa. I perioden 1989-1998 fant de en total årlig økning i insidens på 3.2 % (5). Det var imidlertid stor variasjon i økningen mellom de ulike landene. Sentrale deler av Øst-Europa viste sterkest økning, mens Sardinia og Nord-Europa (unntatt Finland) ikke viste noe tegn på økning. Den mest nærliggende forklaringen synes å være ulik endring i visse typer miljøeksponering.

Den uttalte variasjonen i insidens mellom ulike verdensdeler og land (4), kan i seg selv godt skyldes at ulike folkeslag er i besittelse av ulike typer gener som disponerer for T1D i varierende grad. Men, som allerede nevnt i forbindelse med DIAMOND prosjektet, finnes det også store forskjeller i insidens og insidenstrender innenfor de ulike verdensdelene (4-10), mellom naboland (4, 7, 8, 10-13), og innad i land (4, 14-16). Spennet i insidens mellom landene i Europa er mer enn tidobbelt (7, 8). Genetiske variasjoner er ikke tilstrekkelig til å forklare et slikt spenn, fordi Europeere (med unntak av enkelte utkantspopulasjoner) er relativt homogene sammenlignet med urfolkene på andre kontinenter (17). I de baltiske landene Finland, Estland, Latvia, Litauen og Polen er det store forskjeller i insidens for T1D. Insidensen i Finland er minst 3 ganger så høy som i Estland, og omtrent 5 ganger høyere enn i Latvia, Litauen og Polen. Genetisk bakgrunn ser ut til å kunne forklare en del av forskjellen, men ettersom Finner og Estere i stor grad er genetisk like, og insidensen i Estland likevel er nærmere insidensen i Latvia, Litauen og Polen, behøves det andre enn genetiske faktorer for å forklare denne store forskjellen (13). Insidensen for T1D i Kina er den laveste i hele verden, og Kina har også den største geografiske og etniske forskjellen i insidens sett i noe land. Den

høyeste insidensen målt i et område, var 12 ganger høyere enn for området med lavest insidens. Mye av forskjellen kan skyldes ulik genetisk bakgrunn, men det er sannsynlig at også miljøfaktorer utgjør en vesentlig del av forklaringen. Kostholds- og livsstilsvaner varierer mye mellom ulike deler av Kina, de kaukasiske befolkningsgruppene har mye lavere insidens av T1D enn i de fleste vestlige land, og studier på den genetiske sammensetningen av befolkningen i Kina med fokus på risikogener, tyder også på at forskjeller i miljøfaktorer må til for å forklare hele insidensspennet (16). Undersøkelser fra Norge viser også en tydelig variasjon i insidens for T1D, og variasjonen mellom fylkene med høy og lav insidens har endret seg og blitt nærmest reversert (15, 18-20). Dette mer enn antyder innflytelse fra ikke-genetiske etiologiske faktorer. Geografisk variasjon har også blitt påvist i blant annet Finland. Der er det funnet høy-risiko-områder for T1D, noe som har blitt tilskrevet en kombinasjon av genetiske og ikke-genetiske risikofaktorer. Men heller ikke der har mønsteret holdt seg stabilt, men flyttet på seg slik som i Norge (14, 15). En slik endring taler «i favør av» at debuten av T1D er betydelig assosiert med ikke-genetiske risikofaktorer i miljøet. Funn av betydelige variasjoner innad i land har også blitt gjort i blant annet Italia og Storbritannia (21, 22).

Trenden med økende insidens av T1D i store deler av verden, har vært størst i den yngste aldersgruppen på 0-4 år, og minst i den eldste gruppen på 10-14 år (4, 10, 23). De fleste tolker dette som et uttrykk for en økning i eksponering av risikofaktorer som barnet utsettes for i starten av livet, spesielt under svangerskapet og gjennom det første leveåret.

1.2 Migrasjonsstudier

Forskning på sykdomsforekomst blant populasjoner som har migrert mellom to geografiske områder med svært ulik forekomst av den aktuelle sykdommen, har den fordel at man kan undersøke om det oppstår flere eller færre sykdomstilfeller i en slik gruppe i det nye landet, sammenlignet med sykdomsforekomsten i opprinnelseslandet blant samme etniske gruppe. Dersom for eksempel sykdomsforekomsten blant en etnisk gruppe immigranter, eller som stammer fra immigranter, i et land med høy insidens for sykdommen, er tilnærmet identisk med samme etniske gruppe i et opprinnelsesland med lav insidens, vil det tale for en sterk genetisk komponent. Men det finnes mange kompliserende forhold som kan gjøre migrasjonsstudier vanskelig å fortolke. Alder ved migrasjon, hvor lenge personen har oppholdt seg i det nye landet, om personen er født i opprinnelseslandet eller i det nye landet, om én eller to foreldre tilhører den aktuelle etniske gruppen, og i hvilken grad livsstilen og

kostholdet til individene i gruppen har endret seg. Likevel finnes det studier som kan gi god og nyttig informasjon, også om T1D.

Sverige har en av verdens høyeste forekomst av T1D (4). I 2013 ble det publisert en studie i *British Medical Journal* fra Sverige. I studien så de på insidens for T1D blant personer mellom 0 og 30 år født mellom 1969 og 2009, født av svenske foreldre eller immigrantforeldre. Sammenlignet med svenske barn, hadde barn (0-14 år) og unge voksne (15-30 år) med én utenlandskfødt forelder, henholdsvis 30 % og 15-20 % lavere insidensrate (24). Forskjellen var enda større blant de med to utenlandskfødte foreldre. Det peker mot sterke genetiske komponenter. Men det ble også funnet en nærmest identisk forskyvning i alle grupper mot en tidligere debut av sykdommen, noe som taler for felles miljøfaktorer som gjør seg gjeldende i begge grupper. Betydningen av foreldrenes opphav for sykdomsforekomsten, har også blitt påvist i andre studier (25-30), og mange av dem peker mot en sterk genetisk komponent. I Tyskland hadde barn av italienske migranter lavere insidens av T1D, mens barn av foreldre immigrert fra Sardinia hadde høyere insidens, sammenlignet med tyske barn (26). Insidenstillene for disse gruppene var nærmere insidenstillene i opprinnelseslandene enn i Tyskland. En annen studie fra Tyskland, viste også at barn med avstamning fra tidligere Jugoslavia og fra Hellas, i tillegg til Italia, hadde insidens nærmere nivået i sine opprinnelsesland, sammenlignet med tyske barn (28). Barn med sardinsk avstamning som bodde i Italia, viste seg å ha høyere risiko for å få T1D enn barn fra det italienske fastlandet (25). Japanske barn på Hawaii hadde mye lavere risiko for å få T1D enn andre barn i samme oppvekstmiljø, og insidensen hos disse var sammenlignbar med insidensen i Japan (29).

Men det finnes også mye forskning som viser omtrent motsatte resultater som de nevnt ovenfor, og som dermed argumenterer for en sterk ikke-genetisk etiologisk komponent. I Sverige sammenlignet man insidens for T1D hos adopterte, immigranter, barn født i Sverige med utenlandskfødte foreldre, og barn av svenskfødte foreldre (30). Resultatene viste at barn født i Sverige av utenlandskfødte foreldre hadde 60-70 % høyere prevalens av T1D, sammenlignet med adopterte barn og immigranter med opphav i samme område av verden. Barn født av svenske foreldre hadde høyest insidens. Disse tallene taler for en betydelig økt risiko for sykdommen ved å bli født i Sverige, noe som må skyldes ikke-genetiske faktorer. Samtidig spiller også opphavet en vesentlig rolle. Selv adoptivbarn som ble adoptert ved veldig lav alder til Sverige, hadde ikke økt risiko sammenlignet med barn som hadde immigrert med sine foreldre. Eksponeringer i livmoren eller tidlig i spedbarnsalder, må derfor

utgjøre viktige risikofaktorer for T1D. Barn av jødisk-etiopiske immigranter i Israel hadde høyere risiko for å få T1D jo lengre foreldrene hadde bodd i Israel før barnet ble født (31). Ferskere immigranter som fremdeles holdt fast ved religiøse og kulturelle vaner fra Etiopia, bevarte en midlertidig beskyttelse mot sykdommen. Også Jemenittiske jøder hadde en sterk økning i insidens for T1D etter immigrering til Israel, sammenlignet med Jemenittiske jøder i Jemen (32). I Leicestershire i England hadde sør-asiatiske barn veldig lik insidens som i den hvite- og andre etniske grupper (33). Dette til tross for veldig lav insidens i opprinnelsesområdene i Sør-Asia. Fransk-kanadiere i Montreal har en lavere insidens for T1D enn resten av befolkningen, men dobbelt så høy insidens som franskmenn i Frankrike (34). En forklaring kan være at franskmennene kan ha blandet seg noe med folk som stammer fra Storbritannia og andre steder i Europa. Men det er også store forskjeller i miljøet mellom Frankrike og Montreal som kan spille en etiologisk rolle. Ashkenazi-jøder i Montreal hadde nesten tre ganger så høy risiko for T1D sammenlignet med Ashkenazi jøder i Israel. For denne gruppen er det trolig ingen genetisk innblanding som kan forklare denne forskjellen.

1.3 Tvillingstudier

Dersom det er opphopning av en spesiell sykdom i en familie, tolkes det ofte som et tegn på en sterk genetisk komponent som årsak til sykdommen. Problemet er bare at man ikke kan vite i hvilken grad et felles delt miljø i familien har sammenheng med sykdomsutviklingen. Eneeggede tvillinger deler 100 % av sine gener med hverandre, mens toeggede tvillinger kun har cirka 50 % felles gener. Man antar at eneeggede og toeggede tvillingpar deler felles miljø i like stor grad, og dersom man kan påvise en signifikant høyere konkordans for sykdommen blant eneeggede enn blant toeggede tvillinger, anses det derfor som en sikker test for genetisk bidrag i etiologien til en sykdom. Imidlertid har det blitt rettet kritikk både mot hvorvidt eneeggede tvillinger er helt genetisk identiske (35, 36), og at konkordansforskjellen mellom eneeggede og toeggede tvillingpar også kan tenkes å skyldes ulike intrauterine forhold mellom forskjellige typer tvillinger (37). Når det gjelder sistnevnte forhold, er det ikke vist at dette har signifikant betydning (38). Høy konkordans, eller samstemmighet, blant eneeggede tvillinger sammenlignet med toeggede, tyder på at genetiske faktorer spiller en sterk rolle. En lav konkordans peker mot miljøfaktorer som sentrale i etiologien.

Konkordansen kan måles på forskjellige måter, og oppgis vanligvis som parvis konkordans og proband-konkordans. Parvis konkordans er antall tvillingpar der begge tvillingene har

sykdommen, delt på antall tvillingpar der én eller begge tvillingene har sykdommen. Proband-konkordansen gir et tall for den kumulative gjentakelsesrisikoen, det vil si sannsynligheten for at en tvilling får sykdommen når tvillingsøskenen, som betegnes «indekstvillingen», allerede er blitt syk. Vanligvis vil konkordansen i slike tvillingstudier støtte opp under etiologisk innflytelse fra både gener og miljø, i varierende grad. Det har blitt gjort mange tvillingstudier på konkordans for T1D (39-45). Men på grunn av ulike studiedesign, og at flere av disse ikke er populasjonsbaserte, kan studiene være vanskelige å sammenligne med hverandre. Ikke-populasjonsbaserte studier er sterkt utsatt for systematiske feil. I Australia fant man 46 tvillingpar der minst én tvilling hadde T1D, blant totalt 19,387 tvillingpar. Proband-konkordansen var 61 % blant eneggede og 12 % blant toeggede tvillinger (39). I en populasjonsbasert tvillingkohort i Finland på 22,650 tvillingpar, fant man 228 par der minst én i hvert par hadde T1D. Den parvise konkordansen var 27.3 % for eneggede og 3.8 % for toeggede tvillinger, mens proband-konkordansen var 42.9 % for eneggede og 7.4 % for toeggede tvillinger (40). Denne studien blir sett på som svært pålitelig på grunn av det er en stor, landsbasert og populasjonsbasert kohort, og at konstateringen av sykdomstilfellene var nærmere 100 % sikker. Også en dansk tvillingstudie har god kvalitet (43). Der fant man en proband-konkordans på 53 % for eneggede og 11 % for toeggede. Parvis konkordans var 38 % for eneggede og 6 % for toeggede. Ved aldersjustering ble imidlertid den kumulative proband-konkordansen opptil 35 års alder så mye som 70 % for eneggede og 13 % for toeggede. Oppfølging over 40 år i USA og Storbritannia av eneggede tvillinger uten diabetes som hadde tvillingsøsken med T1D, viste at den kumulative insidensen ikke oversteg 50 % (45). I denne utregningen korrigerer de for systematisk feil ettersom studien var en klinikkbasert og konkordante tvillingpar ved oppstart ikke ble inkludert. De finske og danske studiene, samt den Britisk-Amerikansk studien (45), fant også at risikoen for å få T1D var høyest blant dem der indekstvillingen hadde fått diagnosen ved veldig ung alder. Risikoen blant disse var høyest det første året etter diagnostisering av indekstvillingen, for deretter å avta kraftig gjennom de neste 10 årene (45), selv om det fantes unntak. Disse funnene tyder på at prosessen som fører til destruksjon av Beta-cellene i de Langerhanske øyer i pankreas og T1D, ser ut til å oppstå innen et relativt kort tidsintervall.

Så lenge langt ifra alle eneggede tvillingpar er konkordante for T1D, er det i seg selv nok til å fastslå at også miljøfaktorer er av avgjørende etiologisk betydning.

1.4 Ulike faktorerers betydning for utviklingen av type 1 diabetes

1.4.1 Gener

Mottakeligheten for T1D avgjøres av en kompleks interaksjon mellom flere forskjellige gener og miljøfaktorer. Kun 10-15 % av nydiagnostiserte pasienter med T1D har en positiv familiehistorie med sykdommen. Likevel er det tydelig at man kan arve økt tilbøyelighet til å få sykdommen. Det vet vi fordi 6 % av barn til foreldre med sykdommen får T1D, og 7 % av søsknene, rundt ca. 40 % av eneggede tvillingsøsken, sammenlignet med 0,4 % i den generelle befolkningen i samme land. Av den genetiske risikoen for T1D, utgjør HLA varianter omtrent 50 %, mens den resterende risikoen utgjøres av fler enn 40 andre gener. En økende andel nye tilfeller av T1D oppstår hos barn med lavrisiko HLA genotyper, noe som tyder på at insidensøkningen kan være drevet av faktorer i miljøet. (46, 47). Det er også viktig å være klar over at det er stor heterogenitet i barnediabetes, og at ikke all diabetes som debuterer i barndommen er type 1 diabetes (48).

1.4.2 Virus

Allerede i 1926 fant Adams en åpenbar sammenheng mellom akutte luftveisinfeksjoner og diabetes. Senere har mange påvist en klar sesongvariasjon i presentasjonen av T1D, noe som tilskrives en mulig rolle til infeksjøs agens, spesielt virus, i sykdomsutviklingen. Det har vært forsket på ulike virus, men enterovirus har vært mest omtalt. Mye forskning tyder nå på at enterovirus kan bidra i sykdomsutviklingen gjennom ulike mekanismer, i hvert fall hos noen pasienter, men dets rolle er likevel langt fra bevist. Stor heterogenitet i studiedesign og resultater, samt mange små studier, gjør at det er vanskelig å trekke sikre konklusjoner, og det er behov for større og grundigere studier. Gjennom hygienehypotesen har det også vært forsket på om virusinfeksjoner kan redusere risikoen for T1D, noe som åpenbart bidrar ytterligere til forvirringen. (49-52). Dersom det er slik at visse virusinfeksjoner kan gi økt risiko for utvikling av T1D, vil utviklingen av en vaksine mot dette viruset kunne være et viktig forebyggende tiltak (53).

1.4.3 Vitamin D

Flere studier på «nonobese diabetic mice» (NOD-mus), har vist at 1,25-dihydroksyvitamin D₃ spiller en immunmodulerende rolle i forebyggingen av T1D (54, 55). Mekanismen går gjennom vitamin D reseptoren (VDR) som uttrykkes på antigenpresenterende celler, aktiverte T-celler (54, 55) og på beta-celler i de Langerhanske øyer i pankreas (54). NOD-mus som manglet vitaminet har vist en høyere risiko for å utvikle T1D, og med et mer aggressivt forløp der mangelen er tilstede tidlig i livet (56, 57). Dersom 1,25-dihydroksyvitamin D₃, som er den aktive formen av D-vitamin, gis tidlig i høy dose, beskytter eller reduserer den alvorlighetsgraden av pankreas-insulitt via en dobbeltmekanisme der både beta-cellene i pankreas og immuncellene påvirkes (58). Også på et stadium der det autoimmune angrepet allerede er initiert, kan tilskudd med aktivt vitamin D sammen med cyklosporin A forebygge utvikling til klinisk diabetes (59). Dette stadiet kalles det pre-diabetiske stadium. Selv om dette er forsøk på dyr, kan det lære oss mye om D-vitamins rolle i immunsystemet og spesielt i forhold til autoimmunitet og T1D. Annen type forskning har bekreftet at D-vitamin også kan spille en viktig rolle hos mennesker.

I mange land er det gjort observasjonsstudier der man har sett på nivå av 25-hydroksyvitamin D hos pasienter med T1D sammenlignet med kontroller som ikke har T1D. En case-kontroll studie fra Qatar viste at 90.6 % av barn med T1D hadde mangel av vitaminet, mens 85.3 % av de ikke-diabetiske kontrollene hadde mangel (60). I Nord-India var andelen med vitaminmangelen 58 % ved T1D og 35 % hos kontrollene (61). Svenskene har også studert dette, og i Diabetes Incidence Study in Sweden (DISS), fant man lavere nivå av vitaminet hos nydiagnostiserte pasienter med T1D sammenlignet med friske kontroller. Dette var også tilfellet åtte år etter diagnostisering (62). Gutter hadde lavest nivå, og det er også blant disse at insidensen er høyest (62). Kun en studie fra den meget solrike staten Florida i USA, viste ingen forskjell i nivå for vitaminet hos type 1 diabetikere sammenlignet med kontroller og førstegenerasjons slektninger (63). Det kunne være naturlig å tenke at dette skyldtes at de aller fleste i dette området hadde rikelig med vitamin D i blodet, men dette var ikke tilfelle, og forskerne ble overrasket over den høye andelen av D-vitaminmangel i alle grupper i studien (63). Disse studiene kan imidlertid ikke si oss noe om hvorvidt det er vitaminmangelen som fører til sykdommen, eller om det er sykdommen som fører til vitaminmangelen. Tar man intervensjonsforsøkene med mus med i betraktningen, er det imidlertid mye som tyder på at det er vitaminmangelen som kommer først av «høna og egget», siden tilskudd av vitaminet forebygger T1D hos NOD-mus (56, 57). Sørensen et al. (64) fant i Norge en klar negativ assosiasjon mellom mors serumkonsentrasjon av 25-hydroksyvitamin D under svangerskapet

og risiko for T1D hos avkommet. Oddsen for T1D var over dobbelt så høy hos avkom av mødre med de laveste nivåene, sammenlignet med mødrene med høyest nivå av vitaminet.

Soleksponering er sterkt relatert til breddegrad, og predikerer nivå av 25-hydroksyvitamin D i blodet ettersom syntesen skjer i huden når den treffes av stråler fra sola. En verdensomspennende undersøkelse viste en negativ assosiasjon mellom UVB stråling og insidens for T1D, og en positiv assosiasjon mellom høy breddegrad og insidens for T1D (65). Når man undersøker forskjeller mellom land slik som i denne studien, kan resultatene være vanskelig å tolke på grunn av mulige konfunderende faktorer. For eksempel kan genetisk variasjon og grad av velstand i de ulike landene påvirke resultatet. Derfor er undersøkelser innad i land og blant etnisk identiske grupper mer pålitelige. I Australia, Sverige og Kina er det vist en tydelig positiv assosiasjon for forekomst av T1D med både økt breddegrad, og redusert soleksponering (16, 66, 67). Tilsvarende har ikke blitt funnet i Norge, der man istedenfor har et motsatt bilde med høyest forekomst i sør og lavest i nord (20).

1.4.4 Omega-3 fettsyrer

En populasjonsbasert kase-kontroll studie fra Vest-Agder i Norge, viste en negativ assosiasjon mellom inntak av tran under svangerskapet og risiko for at barna fikk T1D før 15 års alder. Den metodiske kvaliteten på studien var imidlertid ikke veldig god, og resultatene kan være påvirket av informasjonsbias eller ukjente konfunderende faktorer. Men assosiasjonen var homogen og uavhengig av tiden mellom svangerskap og da informasjonen ble samlet inn, og det er sannsynlig at resultatene kan være riktige. Hvorvidt det er D-vitaminet eller omega-3 fettsyrene i tranen som utgjør en mulig effekt, kunne ikke studien svare på (68). Senere har en nasjonal kase-kontroll studie fra Norge også vist en negativ assosiasjon mellom bruk av tran i spedbarnsalder og risiko for T1D. Man fant imidlertid ikke noen assosiasjon mellom inntak av andre D-vitamin tilskudd i spedbarnsalder, eller inntak av tran eller D-vitamintilskudd under svangerskapet, og risiko for T1D. En mulig forklaring på en beskyttende effekt av omega-3 fettsyrer, kan være at de påvirker genuttrykk og har antiinflammatoriske egenskaper (69). Inntak av omega-3 fettsyrer etter ettårsalder hos barn med økt risiko for T1D, var forbundet med redusert risiko for utvikling av antistoffer mot beta-cellene i pankreas i en amerikansk studie (70).

1.4.5 Perinatale faktorer

En systematisk oversikt og metaanalyse fant en sammenheng mellom fødselsrekkefølge og risiko for T1D. Etter å ha justert for konfunderende faktorer som mors alder, brysternæring og diabetes hos mor, fant man at barn født som nummer to eller senere i søskenflokket, opplevde en relativ risikoreduksjon for type 1 diabetes på rundt 10 %. Det er likevel mulig at dette kan skyldes konfunderende faktorer som ikke ble registrert. Men det kan også skyldes at barn som vokser opp med eldre søsken er mer utsatt for infeksjoner tidlig i livet og dermed blir beskyttet mot T1D, noe som vil passe med hygienehypotesen (71). Fødselsvekt har også blitt undersøkt i relasjon til risiko for T1D. En metaanalyse viste at barn med fødselsvekt mellom 3,5 og 4 kg hadde en risikoøkning på 6 %, og barn over 4 kg ved fødsel en risikoøkning på 10 %, sammenlignet med barn som veide mellom 3,0 og 3,5 kg ved fødselen. Dette gjaldt også etter justering for en rekke konfunderende faktorer, men det er likevel mer sannsynlig at fødselsvekt kun er en indikator for ukjent eksponering i form av for eksempel mors kosthold, mors vekt eller sykdom hos mor (72). Mange studier har entydig vist at keisersnitt øker risikoen for T1D betraktelig. Selv etter justering for en lang rekke konfunderende faktorer, viste en metaanalyse en 20 % risikoøkning for T1D etter keisersnitt. Heller ikke her kan ukjente konfunderende faktorer utelukkes. En mulig forklaring på risikoøkningen ved keisersnitt, er at bakteriefloraen i tarmen påvirkes, og at dette kan påvirke utviklingen av immunsystemet (73). Flere studier har vist at tidlig rask vekst i barnets første leveår er forbundet med økt risiko for T1D (74-76). Problemet med ukjente konfunderende faktorer er også tilstede her. Inntak av morsmelkerstatning øker insulinutskillelsen og risikoen for T1D sammenlignet med brystmelkernæring. I tillegg kan også diabetes hos mor, overvekt under svangerskapet, og genetisk disposisjon ha betydning for veksten (75). Assosiasjonen mellom tidlig rask vekst og T1D støtter likevel akselerasjons-hypotesen og hypotesen om beta-celle stress, som argumenterer for at insulinresistens har felles betydning for både type 1 og type 2 diabetes (76). Blodtype inkompatibilitet mellom mor og foster, spesielt ABO inkompatibilitet, er også vist å være en risikofaktor for senere utvikling av T1D (77).

2 Metode

2.1 Metodevalg

Forskningen rundt risikofaktorer og årsaker til type 1 diabetes er svært omfattende.

Problemstillingen jeg har valgt å undersøke nærmere i denne oppgaven, er hvilken betydning tidlig introduksjon av kumelk i kosten til spedbarn kan ha for risiko for senere utvikling av type 1 diabetes. I min oppgave har jeg valgt litteraturstudium som metode. En litteraturstudie er en systematisk oversikt som vurderer og oppsummerer primærstudier ved hjelp av en tydelig beskrevet fremgangsmåte. Kunnskapsgrunlaget i en litteraturstudie er hentet fra vitenskapelige artikler i ulike databaser. Riktignok skaper ikke dette ny kunnskap, men ved å systematisere kunnskap kan man likevel komme til nye erkjennelser og se problemet fra nye perspektiver. Med tanke på alt som allerede er gjort og som gjøres innen forskning på dette feltet, er det lite sannsynlig, og heller ikke noe realistisk mål, at denne oppgaven vil øke innsikten på dette feltet blant forskningsmiljøene.

Begrunnelsen for dette metodevalget er flersidig. For det første er en slik tilnærming en effektiv måte å få en helhetlig oversikt over allerede eksisterende relevant kunnskap. Derneft var det denne muligheten jeg hadde for å skrive om dette temaet. I tillegg gir metoden meg relevant og nyttig erfaring i å søke etter og kritisk vurdere vitenskapelige artikler. Som lege er det viktig å ha fokus på evidensbasert kunnskap, og via denne type kunnskap er det forskningens mål å forbedre klinisk praksis. Gjennom denne oppgaven får jeg muligheten til å fordype meg i et tema, samtidig som det gir meg viktig lærdom i hvordan å forholde seg til vitenskap.

Selv om det allerede finnes svært mye forskning rundt denne problemstillingen, har man langt ifra kommet i mål med tanke på å avgjøre hvilken rolle denne faktoren spiller i diabetesutviklingen. Problemstillingens natur gjør at høykvalitets eksperimentelle studier er nærmest fraværende. Både etiske vurderinger og hva som er praktisk mulig å få til, gjør at man dessverre ikke har mulighet til å forholde seg til noen forskningsmessig «gullstandard» på dette feltet. Litteraturen her har derfor sine begrensninger.

2.2 Datainnsamling

PICO, som står for population, intervention, comparison og outcome, er en nyttig metode man kan bruke for å stille et presist spørsmål. Å stille et presist spørsmål er viktig for å søke frem relevant forskning som kan være med på å besvare spørsmålet. Det er derfor et godt utgangspunkt for et vellykket litteratursøk.

Tabell 1: PICO

Spørsmål om etiologi	Hvem (P)	Eksposering (I)	Kontroll (C)	Utfall (O)
	Spedbarn	Introdusert for kumelk, tidlig introdusert for kumelk, høy eksponering	Ikke introdusert for kumelk, senere introduksjon, lavere eksponering	Type 1 diabetes

Kjernespørsmålet som min problemstilling hører inn under, er spørsmål om etiologi, altså hvorfor noen får denne sykdommen (type 1 diabetes), mens andre holder seg friske. Valg av forskningsmetode avgjøres på bakgrunn av hvilke type kjernespørsmål man opererer med. For å innhente kunnskap om etiologi, er kohortstudier og kase-kontroll studier de foretrukne forskningsmetodene. Det betyr ikke at spørsmål om etiologi ikke kan besvares ved bruk av intervensjonsstudier, for eksempel en randomisert kontrollert studie (RCT). En RCT er for så vidt også en kase-kontroll studie, og egner seg derfor godt til å kunne si noe om årsaken til en sykdom. Kunnskap om min problemstilling, finnes overveiende i observasjonsstudier, men det finnes intervensjonsstudier, både på mus (hvorfra kunnskap kun i begrenset grad kan overføres til mennesker), men også på spedbarn som er den aktuelle populasjonen jeg tar utgangspunkt i.

I et litteratursøk er det viktig at man fanger opp mest mulig (sensitivitet), samtidig som man unngår irrelevante referanser (spesifisitet). Søkeordene jeg brukte i datainnsamlingen tok derfor utgangspunkt i problemstillingen, samt spørsmålsstillingen i PICO skjemaet. I tabellen nedenfor framgår søkeord og søkehistorikk i aktuelle databaser. Jeg gjorde søk i Medline og Embase, begge via Ovid. De siste søkene ble gjort i mars 2014. En begrensning jeg la inn på søkene, var at jeg kun søkte etter artikler fra år 2000 og nyere. Dette var for å komme fram til den mest oppdaterte og beste forskningen, men også av tidsmessige hensyn fordi jeg så meg nødt til å begrense søket for ikke å få alt for mange studier. I tillegg begrenset jeg søket til kun å gjelde studier som så på spørsmål om etiologi, og valgte maksimal sensitivitet for ikke å gå glipp av noen relevante studier.

Tabell 2: Søkehistorikk

Database	Søk nr.:	Søkeord /kombinasjoner	Antall treff
Medline via Ovid	1	exp Infant/ OR exp Child/ OR infant*.mp. OR childhood.mp.	2084589
	2	Milk/ OR Milk Proteins OR Infant Formula/ OR infant formula.mp. OR cow* milk.mp. OR bovine milk.mp.	55009
	3	Diabetes Mellitus, Type 1/ OR type 1 diabetes.mp.	65396
	4	1 AND 2 AND 3	236
	5	limit 4 to yr="2000 -Current"	131
	6	limit 6 to (yr="2000 -Current" and "causation-etiology (maximizes sensitivity)")	87
EMBASE via Ovid	1	infant/ OR infancy/ OR infant*.mp. OR childhood/ OR childhood.mp.	1079260
	2	milk/ OR milk protein/ OR cow* milk.mp. OR bovine milk.mp. OR artificial milk/ OR infant formula.mp.	81077
	3	insulin dependent diabetes mellitus/	79566
	4	1 AND 2 AND 3	242
	5	limit 4 to "causation-etiology (maximizes sensitivity)" AND yr="2000 -Current"	135
	6	limit 5 to exclude medline journals	11
Symbolforklaringer: / = emneord (subject heading), søkeord* = trunkering, mp = title, abstract, original title, name of substance word, subject heading word, keyword heading word, protocol supplementary concept word, rare disease supplementary concept word, unique identifier (tekstordsøk)			

2.3 Inklusjonskriterier

Inklusjonskriteriene bør følge logisk av problemstillingen man ønsker å besvare. Derfor tok jeg utgangspunkt i kategoriene i mitt PICO skjema ved valg av inklusjonskriterier. Alle studier med en epidemiologisk design (tverrsnitt, kasus-kontroll, kohort eller randomisert kontrollert studie) som evaluerte alder ved introduksjon av kumelk i spedbarnsalder, varighet eller mengde av kumelkinntak, og effekten på utvikling av T1D i barndommen, ble inkludert. En del av studiene så kun på inntak av kumelk i barndommen, og ikke i spedbarnsalder, i relasjon til T1D. Disse ble ikke inkludert. Heller ikke ble studier inkludert som kun hadde diabetesrelatert autoimmunitet og prediabetes, og ikke T1D, som endepunkt. Selv om diabetesrelatert autoimmunitet (islet autoimmunity) er kjent å være relatert til progresjon til klinisk T1D, er ikke denne relasjonen absolutt. Det er vanligvis en nær sammenheng mellom varighet av utelukkende brystmelkernæring og alder ved introduksjon av kumelk hos

spedbarn. De studiene som kun så på varighet av utelukkende og total brystmelkernæring, ble likevel ikke inkludert siden inntaket av kumelk ikke var undersøkt, og det da er svært vanskelig å vite i hvilken grad effekten på risiko for T1D skyldes beskyttelse av brystmelk eller risiko ved kumelk. Resultatene av brystmelkernæring i relasjon til T1D er derfor heller ikke tatt med i resultatdelen, annet enn at den er justert for i en del av studiene.

2.4 Eksklusjonskriterier

I den kritiske lesningen av litteraturen som blir fanget inn som følge av inklusjonskriteriene, brukes eksklusjonskriteriene til å bestemme hvor mye av litteraturen man blir sittende igjen med. Systematiske gjennomganger, brev eller kommentarer til artikler, artikler som kun gjaldt studiedesign eller compliance (artikler om TRIGR-studien (Trial to Reduce IDDM in the Genetically at Risk)), studier uten kontrollgruppe, studier gjort på dyr, artikler uten tilgjengelig fulltekst, og økologiske studier ble ekskludert.

2.5 Utvelgelse av studier og ekstraksjon av data

Totalt ble 98 artikler vurdert med hensyn til inklusjonskriteriene. De inkluderte artiklene ble deretter vurdert med hensyn til eksklusjonskriteriene. Etter å ha vurdert artiklene på bakgrunn av seleksjonskriteriene, satt jeg igjen med 15 studier. Kun én av dem (Bandurska-Staniewicz & Rutkowska (78)) ble funnet ved søk i Embase via Ovid. Ved å søke i referanselistene til de utvalgte studiene, samt i noen av de systematiske gjennomgangene, fant jeg fram til ytterligere fire studier som innfridde seleksjonskriteriene (Fredriksen et al. (79), Lempainen et al. (80), Malcova et al. (81), og Pérez-Bravo et al. (82)). Dermed satt jeg igjen med totalt 19 studier.

Tabell 3: Utvalgte studier

UTVALGTE STUDIER			
	Tittel	Forfatter	År
1	Infant exposures and development of type 1 diabetes mellitus: The Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY)	Frederiksen et al. (79)	2013
2	Breastfeeding protects against type 1 diabetes mellitus: a case-sibling study	Alves et al. (83)	2012
3	Association between environmental factors and risk of type 1 diabetes - a case-control study	Ahadi et al. (84)	2011

4	Dietary intervention in infancy and later signs of beta-cell autoimmunity	Knip et al. (85)	2010
5	Interplay between PTPN22 C1858T polymorphism and cow's milk formula exposure in type 1 diabetes	Lempainen et al. (80)	2009
6	Early infant feeding and type 1 diabetes	Savilahti & Saarinen (86)	2009
7	Early infant feeding and risk of type 1 diabetes mellitus-a nationwide population-based case-control study in preschool children	Rosenbauer et al. (87)	2008
8	Environmental risk factors for type 1 diabetes in the north of Poland	Bandurska-Staniewicz & Rutkowska (78)	2008
9	Early nutrition and risk of Type 1 diabetes mellitus--a nationwide case-control study in preschool children	Rosenbauer et al. (88)	2007
10	Absence of breast-feeding is associated with the risk of type 1 diabetes: a case-control study in a population with rapidly increasing incidence.	Malcova et al. (81)	2006
11	Early childhood risk factors associated with type 1 diabetes--is gender important?	Svensson et al. (89)	2005
12	Early infant diet and risk of type 1 diabetes mellitus in Belgrade children	Sipetic et al. (90)	2005
13	Infant diet and type 1 diabetes in China	Strotmeyer et al. (91)	2004
14	Longer breastfeeding is an independent protective factor against development of type 1 diabetes mellitus in childhood	Sadauskaite-Kuehne et al. (92)	2004
15	Duration of breast feeding and bovine serum albumin antibody levels in type 1 diabetes: a case-control study	Pérez-Bravo et al. (82)	2003
16	Rapid early growth is associated with increased risk of childhood type 1 diabetes in various European populations	EURODIAB Substudy 2 Study Group (74)	2002
17	IDDM and early exposure of infant to cow's milk and solid food	Esfarjani et al.	2001
18	Differences in beta-casein fractions in Icelandic versus Scandinavian cow's milk may influence diabetogenicity of cow's milk in infancy and explain low incidence of insulin-dependent diabetes mellitus in Iceland	Thorsdottir et al. (93)	2000
19	Cow's milk consumption, HLA-DQB1 genotype, and type 1 diabetes: a nested case-control study of siblings of children with diabetes.	Virtanen et al. (94)	2000

For å få best mulig oversikt, og for å ekstrahere informasjonen fra studiene på enklest måte, valgte jeg å bruke en tabelloversikt. Tabellen inneholder følgende: navn på forfatter og årstall for publisering av artikkelen, lokalisasjon og tidsrom studien er gjort, studiedesign og studiepopulasjon, alderen på barna i studien, hensikten med studien, hovedfunn/aktuelle funn, faktorer som er justert for ved multivariabel analyse, samt hvordan kontrollene er matchet til kasesene. I kolonnen lengst til høyre, er resultatene i studiene klassifisert med hensyn til funn

og kvalitet/signifikans. Funn klassifiseres som «positiv», «invers» eller «ingen effekt», der «positiv» betyr at studien viser en positiv sammenheng mellom mye eller tidlig kumelk i spedbarnsalder og økt risiko for senere utvikling av T1D, mens invers betyr en motsatt eller omvendt sammenheng. Kvalitet/signifikans klassifiseres som enten «overbevisende», «plausibel» eller «mangelfull», der «overbevisende» resultater er statistisk signifikante, størrelsen på utvalget er tilstrekkelig stort, og det er gjort en passende justering i multivariabel analyse og passende matchende kontroller. «Plausibel» betegner resultater som er statistisk signifikante, men med manglende oppfyllelse av én av de andre kriteriene for «overbevisende». «Mangelfull» brukes for resultater som er statistisk signifikante, men der både utvalgsstørrelse og justering/matching er utilstrekkelig.

2.6 Metodekritikk

En litteraturstudie er en systematisk sammenfatning av allerede eksisterende kunnskap. Dermed genereres det heller ingen ny kunnskap, og strengt tatt kan det ikke kalles forskning. Samtidig er det nødvendig å systematisere kunnskap og sammenfatte all forskningen på et bestemt område slik at man kan se det store bildet, og gjøre seg opp en totalvurdering uavhengig av kun det enkeltstudier måtte vise. Problemstillingen i denne litteraturstudien er allerede anvendt i tidligere oversiktsartikler. Flere av disse er imidlertid ikke systematiske oversikter. Blant de systematiske oversiktene, kan det også være andre tilnærminger enn i denne litteraturstudien, som for eksempel at brystmelkernæring er inkludert, og at til en viss grad andre studier er inkludert. For min egen del, er læringsutbyttet stort, siden jeg får god erfaring med å søke etter vitenskapelige artikler, tolkning og vurdering av forskningsdata.

Som søkestrategi søkte jeg i de største og mest relevante databasene, både på emneord og tekstord og tok utgangspunkt i PICO-skjemaet. På den måten ville jeg sikre at jeg ikke gikk glipp av noen relevante studier. Antall treff i søkene mine viser også at jeg har søkt bredt. I tillegg lette jeg i referanselistene, og fant ytterligere fire studier. Det kan imidlertid tyde på at mitt primære søk kunne vært bedre, og jeg kan ikke utelukke å ha gått glipp av relevante studier. Siden jeg ville søke bredt og inkludere alle relevante studier, har det medført at studier med ulik design og også studier av lav metodisk kvalitet har blitt inkludert. Dette har jeg forsøkt å ta høyde for, og vektleggingen av de ulike studiene blir naturligvis ulik.

Min egen forståelse og subjektive oppfatning av emnet, kan ha vært med på å påvirke både datainnsamling og selve analysen, men dette vil det alltid være en risiko for i forskning og kunnskapshåndtering.

3 Resultater

3.1 Oversikt over studiene i tabellen

Siden jeg hadde begrenset søket til å gjelde artikler publisert i år 2000 eller nyere, er alle de inkluderte studiene fra denne tidsperioden. Det finnes også en del studier som ser på kumelk i spedbarnsalder i relasjon til T1D, men de ble som altså ikke tatt med i denne oppgaven. De inkluderte studiene har sett på populasjoner i mange forskjellige land: USA (79), Brasil (83), Iran (84), Finland (80, 85, 86, 94), Tyskland (87, 88), Polen (78), Tsjekkia (81), Danmark (89), Serbia (90), Kina (91), Sverige (92), Litauen (74, 92), Chile (82), Østerrike (74), Latvia (74), Luxemburg (74), Nord-Irland (74), Iran (95) og Island (93). Tre av studiene var kohortstudier (79, 80, 86) der en av disse var blandet kohort og RCT (86), én studie var en randomisert-kontrollert studie (85), og de 15 resterende studiene var kasus-kontroll studier (74, 78, 81-84, 87-95).

Seks av studiene har resultater som er klassifisert som «positiv og overbevisende» (83, 84, 87-89, 92), resultater fra fire studier er klassifisert som «positiv og plausibel» eller «positiv og mangelfull» (78, 83, 90, 91), én studies resultater er «invers og plausibel» (86), mens hele 12 studier har resultater kvalifisert som «ingen effekt» (74, 79-82, 84, 85, 90, 91, 93-95). Det er flere klassifiseringer enn det er antall studier fordi noen av studiene har flere ulike resultater, både med tanke på effekt av alder ved første introduksjon av kumelk, og effekt av mengde eller varighet av kumelkinntak.

3.2 Gjennomgang av hovedresultatene i studiene

Tilnærmet alle studiene så på mange andre faktorer i relasjon til utvikling av T1D i tillegg til kumelkinntak i spedbarnsalder. Mange av disse faktorene er nevnt i kolonnen for justering. Det kan også være slik at det er andre faktorer som er analysert i studiene enn dem som justeres for i multivariable analyser, fordi det vanligvis kun justeres for faktorer som har vist seg å være relatert til det utfallet man undersøker.

Frederiksen et al. (79) fant at barn som utviklet diabetes var introdusert for kumelk senere enn friske barn, altså i utgangspunktet et inverst funn, men funnet var ikke statistisk signifikant, og man må konkludere med «ingen effekt». I motsetning til dette fant Alves et al. (83) en

statistisk signifikant lavere alder ved introduksjon av kumelk blant kasuser sammenlignet med kontroller. Alder ved introduksjon av kumelk var lik mellom de to gruppene i studien til Ahadi et al. (84), men i den samme studien fant man at type 1 diabetikere hadde vært eksponert for kumelk over en lengre periode i spedbarnsalder enn de friske kontrollene. Intervensjonsstudien til Knip et al. (85) viste en reduksjon i T1D risiko ved hydrolysert kumelkbasert melkeerstatning, spesielt ved per-protokoll analyse, men studien hadde for liten styrke til å gi noe sikkert resultat. Lempainen et al. (80) fant ingen økt risiko for T1D ved tidlig introduksjon av kumelk selv om det var justert for flere ulike genotyper. Derimot fant man at tidlig introduksjon av kumelk var relatert til utvikling av diabetesrelatert autoimmunitet for noen genotyper, men disse resultatene er ikke tatt med i denne oppgaven. Sen start av daglig inntak av kumelk var statistisk signifikant relatert til økt risiko for T1D i studien til Savilahti & Saarinen (86), altså et inverst funn. Med en studiepopulasjon på 760 kasuser, kom Rosenbauer et al. i begge sine artikler fram til positive og overbevisende resultater for at tidlig introduksjon av kumelk ga økt risiko for T1D (87, 88). Bandurska-Stankiewicz & Rutkowska (78) fant at tidligere introduksjon av kumelk var relatert til høyere risiko for T1D, men tallfestet ikke dette. Malcova et al. (81) fant ingen signifikant forskjell mellom kasus og kontroll, selv om dette var den største kasuspopulasjonen med 868 pasienter. Svensson et al. (89) fant en redusert risiko for T1D ved sen introduksjon av kumelk, men dette resultatet var kun statistisk signifikant for jenter. I utgangspunktet viste Sipetic et al. (90) en klart økt risiko for T1D ved introduksjon av kumelk før 5 måneders alder, men etter å ha justert for en rekke ytterligere faktorer, forsvant denne effekten. I Kina fant Strotmeyer et al. (91) redusert risiko for T1D ved introduksjon av flaskemelk (tilsatt D-vitamin) i en alder av 7-12 måneder, men for kumelkbasert melkeerstatning var det ingen aldersforskjell ved introduksjon mellom kasuser og kontroller.

I studien til Sadauskaite-Kuehne et al. (92) fra Sverige og Litauen, hadde barn i Sverige som ble introdusert for kumelk (morsmelkerstatning) senere enn 3 og 7 måneders alder, signifikant lavere risiko for å få T1D ved en alder av 5-9 år. Ved introduksjon etter 7 måneders alder, hadde barna også betydelig lavere risiko for å få T1D inntil en alder av 15 år. I utvalget fra Litauen, så man på alder ved introduksjon av hjemmelaget kumelkinnblandet morsmelkerstatning, men fant ingen effekt. Pérez-Bravo et al. (82) fant ingen signifikant forskjell i alder ved kumelkintroduksjon mellom kasus-kontroll gruppene. EURODIAB studien (74) fra Østerrike, Litauen, Latvia, Luxemburg og Nord-Irland, fant ingen forskjell mellom kasuser og kontroller, men hadde ikke gjort noen justeringer for alder ved

introduksjon av kumelk. Esfarjani et al. (95) kunne ikke vise til noen effekt av alder ved introduksjon av kumelk i Iran. På Island så Thorsdottir et al. (93) ingen forskjell i alder ved introduksjon av kumelk, hyppighet eller varighet av inntak mellom kasus- og kontrollgruppen. Barna i studien til Virtanen et al. (94) ble inndelt etter ulike HLA risikogrupper for T1D. For ingen av disse gruppene var introduksjon av kumelk før en alder av 2 måneder signifikant assosiert med utvikling av T1D.

Tabell 4: Resultater

Studie	Tid og sted	Studiedesign og utvalg	Alder	Formål med studien	Hovedresultater	Justering og matching	Resultatklassifisering
Fredriksen et al. (2013) DAISY (Diabetes Autoimmunity Study in the Young)	Denver, Colorado, USA,	Kohort: 1.835 barn med genetisk disposisjon for T1D. 53 utviklet T1D.		Å undersøke sammenhengen mellom kosthold i spedbarnsalder og utvikling av T1D.	Alder (mnd) ved introduksjon av kumelk - risiko for T1D: Barn med T1D - 4.4 mnd, friske barn - 3.5 mnd. HR (95 % KI): 1.01 (0.93-1.10), p=0.79	Justert for HLA-genotype, førstegrads slektning med T1D, mors utdannelse, og fødselsmåte.	Ingen effekt
Alves et al. (2012)	Brasil, 2009-2010	Kasus: 123 Kontroll: 123 friske søsken		Sammenligne hyppighet og varighet av brysternæring mellom søsken med og uten T1D.	Varighet av utelukkende brysternæring/alders (mnd) ved introduksjon av kumelk: Kasus: 3.3, kontroll: 4.6, differanse: 1.3 mnd, 95 % KI for differanse: 0.9-1.7 mnd., p<0.001 (Etter justering: differanse: 0.9 mnd., 95 % KI: 0.6-1.5 mnd., p<0.001)	Justert for alder ved introduksjon av kornblanding og fast føde, som var de eneste to statistisk signifikante konfunderende faktorene.	Positiv og overbevisende/plausibel
Ahadi et al. (2011)	Iran, 2004-2009	Kasus: 101 Kontroll: 101	≤ 16 år	Undersøke sammenhengen mellom T1D og ulike miljøfaktorer.	Varighet av kumelkinntak > 6 mnd i spedbarnsalder - risiko for T1D (multivariabel logistisk regresjon): OR (95 % KI): 4.38 (1.05-18.20), P=0.03. Alder ved introduksjon av morsmelkerstatning - risiko for T1D: Ingen forskjell	Justert for mors alder, fødselsmåte, brystmelkernæring over 12 mnd, og tilskudd av D-vitamin. Kontroller: friske barn, normalt blodsukkernivå, ingen historie med bruk av diabetesmedisiner, matchet for alder og kjønn.	Positiv og overbevisende for varighet av kumelkinntak > 6 mnd. Ingen effekt for alder ved introduksjon.

Knip et al. (2010) TRIGR-Pilot (Trial to Reduce IDDM in the Genetically at Risk)	Finland, 1995-	RCT - dobbelt blindet Kasus: 113 Kontroll: 117 Alle var genetisk disponerte	≤ 10 år	Teste hypotesen om at hydrolysert kumelbasert morsmelkerstatning som supplement til brystmelk vil redusere kumulativ insidens av diabetes-assosierte autoantistoffer og risiko for T1D, sammenlignet med kumelbasert morsmelkerstatning, hos genetisk disponerte.	Randomisert til hydrolysert kumelbasert morsmelkerstatning - risiko for T1D: "Intention to treat" analyse: HR (95 % KI): 0.80 (0.30-2.14), justert for varighet av eksponering av hydrolysat: 0.48 (0.14-1.61). "Per-protocol" analyse: HR (95 % KI): 0.40 (0.11-1.51).	Justert for varighet av eksponering, "per-protocol".	Ingen effekt
Lempainen et al. (2009) DIPP (Finnish Diabetes Prediction and Prevention)	Finland, 1994-2002	Kohort Kasus: 156 Kontroll: 563 Alle hadde HLA-variant som disponerte for T1D	6-14 år	Å studere effekten av polymorfismene <i>INS</i> -23A/T, <i>PTPN22</i> 1858C/T, og <i>CTLA-4</i> +49A/G på utvikling av T1D-assosierte antistoffer og klinisk T1D hos barn eksponert for kumelbasert melkeerstatning tidlig og sent i spedbarnsalder.	Alder ved introduksjon av kumelk - <6 mnd vs. >6 mnd - andel med progresjon til T1D: <i>PTPN22</i> 1858T: 0.21 (23/107) vs. 0.15 (6/41), p=0.35. <i>PTPN22</i> 1858CC: 0.08 (27/338) vs. 0.09 (9/100), p=0.79. Kombinert effekt av <i>PTPN22</i> genotypene og tidlig introduksjon av kumelk: HR (95 % KI): 1.7 (0.5-5.6), p=0.37. <i>INS</i> -23Hphl AA: 0.15 (40/274) vs. 0.13 (11/83). <i>INS</i> -23Hphl AT/TT: 0.06 (10/168) vs. 0.07 (4/58). Ingen signifikante forskjeller	Justert for genotyper. Kontroller matchet for HLA-DQB1 genotype, kjønn, fødselsdato og fødested.	Ingen effekt

Savilahti & Saarinen (2009)	Helsinki, Finland, 1994-1995	Kohort (Begynte med RCT på sykehusets fødeavdeling mtp melkeerstatning): 6,209 barn, 45 utviklet T1D.		Vurdere sammenhengen mellom tidlig spedbarnskosthold og T1D.	Alder ved start av daglig inntak av kumelkbasert melkeerstatning - <3.8 mnd versus ≥3.8 mnd - risiko for T1D OR (95 % KI): 0.66 (0.38-1.13) versus 1.33 (1.03-1.72). Justert verdi for alder ≥ 3.8 mnd: OR (95 % KI): 1.2 (1.1-8.7), p=0.026. Inntatt kumelk for første gang - <0.1 versus ≥0.1 mnd - risiko for T1D: OR (95 % KI): 0.91 (0.63-1.32) versus 1.09 (0.79-1.52).	Justert verdi justert for første introduksjon med kumelk, introduksjon av grønnsaker og kornblanding, og total varighet av brystmelkernæring.	Invers og plausibel, for sen start av daglig inntak med kumelk
Rosenbauer et al. (2008)	Tyskland, 1992-1995	Kasus: 760 Kontroll: 1,871	< 5 år	Undersøke sammenhengen mellom risiko for T1D og kosthold og miljøeksponering i spedbarnsalder.	Alder ved introduksjon av melkeerstatning/kumelk < 5 mnd - risiko for T1D: OR (95 % KI): 1.30 (1.04-1.61), p<0.019	Justert for nåværende melkeinntak, T1D i familien, sosial status, mors alder, endring i bosted, antall barn, og fødselsvekt. Kontroller matchet for alder (±1 år), kjønn og bosted.	Positiv og overbevisende
Bandurska-Stankiewicz & Rutkowska (2008)	Polen, 1994-2003	Kasus: 331 Kontroll: frisk befolkning nord i Polen	≤ 29 år	Estimere innflytelsen av utvalgte miljøfaktorer på insidensen av T1D.	Kort periode med utelukkende morsmelkernæring, og tidlig introduksjon av kumelk relatert til høyere risiko for T1D.	Kontroller: den friske befolkningen nord i Polen.	Positiv og mangelfull
Rosenbauer et al. (2007)	Tyskland, 1992-1995	Kasus: 760 Kontroll: 630	< 5 år	Undersøke sammenhengen mellom risiko for T1D og kosthold og miljøeksponering i spedbarnsalder.	Alder ved introduksjon av melkeerstatning/kumelk < 5 mnd - risiko for T1D: OR (95 % KI): 1.34 (1.03-1.74), P<0.030	Justert for kjønn, alder, alder ved introduksjon av flaskeernæring, alder ved introduksjon av fast føde, nåværende melkeinntak, T1D i familien, og sosial status. Kontroller matchet for alder.	Positiv og overbevisende

Malcova et al. (2006)	Praha, Tsjekkia, 2000	Kasus: 868 Kontroll: 1,466 (de fleste skolekamerater til pasientene)	≤ 18 år ved studiestart	Studere sammenhengen mellom T1D og variable faktorer i perinatalperioden og spedbarnsalder.	Alder ved introduksjon av kumelk eller annen tilleggsnæring (1-3 mnd) - risiko for T1D: OR (95 % KI): 1.11 (0.83-1.50). Lineær reduksjon i risiko for T1D med senere introduksjon.	Justert for varighet av brystmelkernæring, mors alder, fødselsrekkefølge, og fødselsår. Kontroller: jevnaldrende klassekamerater.	Ingen effekt
Svensson et al. (2005)	Danmark, 1996-1999	Kasus: 602 Kontroll: 1,490	≤ 14 år	Studere intrauterine- og tidlige barndomsrisikofaktorer for T1D, og vurdere kjønnsforskjeller i forhold til dette.	Alder ved introduksjon av kumelk ≥ 3 mnd - risiko for T1D: OR (95 % KI): 0.66 (0.48-0.90). Kun signifikant for jenter.	Justert for mors alder, fødselskohort, og kjønn. Kontroller matchet for kjønn og alder (samme fødselsmåned).	Positiv og overbevisende (for jenter)
Sipetic et al. (2005)	Beograd, Serbia, 1994-1997	Kasus: 105 Kontroll: 210 barn med hudsykdom	≤ 16 år	Å undersøke hvorvidt kosthold i spedbarnsalder er assosiert med utvikling av T1D.	Alder ved introduksjon av kumelk < 5 mnd - risiko for T1D: OR (95 % KI): *2.87 (1.68-4.89), †3.37 (2.05-5.55). Ved justering for ytterligere faktorer signifikant relatert til T1D i studien, fant man ingen sammenheng (ikke tallfestet).	Justert for barnets alder, mors og fars alder ved fødsel, alder ved introduksjon av kumelk og: *(fars utdannelse, antall familiemedlemmer, sosioøkonomisk status, svangerskapsalder, og postnatal intensivbehandling), †(varighet av brystmelkernæring). Kontroller matchet for alder (±1 år), kjønn, og bosted.	Positiv og plausibel, eller ingen effekt.
Strotmeyer et al. (2004)	Kina, 1985-1998	Kasus: 247 Kontroll: 443		Avgjøre om inntak av melk og fast føde i første leveår er ulikt mellom barn med T1D og friske barn.	Alder ved introduksjon av kumelkbasert morsmelkerstatning - risiko for T1D: Ingen forskjell mellom kasus og kontroll. Alder ved introduksjon av kumelk fra flaske (tilsatt D-vit.) (7-12 mnd) - risiko for T1D: OR (95 % KI): 0.60 (0.43-0.85), p=0.004. Ingen forskjell ved tidligere alder.	Multivariabel logistisk regresjon justert for div. variabler (ikke spesifikt nevnt). Kontroller matchet for alder (±5 år), kjønn, etnisk gruppering, og bosted.	Ingen effekt for morsmelkerstatning. Positiv og plausibel for flaskemelk.

Sadauskaite-Kuehne et al. (2004)	Sørøst-Sverige og Litauen, 1995-2000	Sverige: Kasus: 517 Kontroll: 1,034 Litauen: Kasus: 286 Kontroll: 858	≤ 15 år	Å avgjøre hvorvidt tidlig ernæring er en individuell risikofaktor for T1D tross andre livshendelser.	¹Alder ved introduksjon av morsmelkerstatning ≥ 3 mnd (5-9 år gamle) - risiko for T1D (Sverige): OR (95 % KI): 0.57 (0.33-0.98). ¹Alder ved introduksjon av morsmelkerstatning ≥ 7 mnd (0-15 år gamle) - risiko for T1D (Sverige): OR (95 % KI): 0.24 (0.07-0.84). ²Alder ved introduksjon av kumelk ≥ 7 mnd (5-9 år gamle) - risiko for T1D (Sverige): OR (95 % KI): 0.62 (0.39-0.99). Alder ved introduksjon av hjemmelagd kumelkinnblandet erstatning ≥ 2 mnd (10-15 år gamle) - risiko for T1D (Litauen): OR (95 % KI): 0.70 (0.43-1.14)	Justert for mors alder ≥ 35 år, prematuritet, sykehusinnlagt første levemåned, infeksjon i første levemåned, neonatal ikterus første leveuke, intoks hos mor under svangerskapet, infeksjon siste 6 mnd, stressende livshendelse i løpet av siste 6 mnd, familie bor i byen, og mors utdanning. ¹ Minus mors utdanning og alder. ² Minus mors utdanning og alder. Kontroller matchet for alder og kjønn.	Positiv og overbevisende for Sverige
Pérez-Bravo et al. (2003)	Santiago, Chile, 1999-2001	Kasus: 143 Kontroll: 107	0-15 år	Å sammenligne nivået av bovint serumalbumin antistoffer og relasjon til varighet av brystmelkernæring, alder ved introduksjon av kumelk, og HLA-genotype hos barn med og uten T1D.	Alder ved introduksjon av kumelk - kasus vs. Kontroll: 8.3 ± 4.6 mnd vs. 9.2 ± 4.1 mnd, p=0.11	Ingen justering. Kontroller ikke i slekt med kasus.	Ingen effekt

EURODIAB Substudy 2 Study Group (2002)	Østerrike, 1989-1994; Litauen, 1989-1994; Latvia, 1989-1994; Luxemburg, 1989-1995; Nord-Irland, 1990-1992	Kasus: 499 Kontroll: 1,337	< 15 år	Å bekrefte at tidlig vekt er assosiert med risiko for T1D hos europeiske barn, og belyse rollen til ernæring i spedbarnsalder.	Alder ved introduksjon av kumelk < 3 mnd - risiko for T1D: OR (95 % KI): 1.15 (0.74-1.81). Alder ved introduksjon av kumelk eller morsmelkerstatning < 3 mnd - risiko for T1D: OR (95 % KI): 1.01 (0.81-1.25).	Ingen justering. Kontroller matchet for alder.	Ingen effekt
Esfarjani et al. (2001)	Iran	Kasus: 52 Kontroll: 52	1-14 år	Å undersøke assosiasjoner mellom type ernæring, varighet og tidspunkt for introduksjon av fast føde i spedbarnsalder, og insidensen av T1D.	Alder ved introduksjon av kumelk - risiko for T1D: Ingen forskjell mellom kasus- og kontrollgruppen.	Ingen justering. Kontroller matchet for kjønn, alder, sosial status, land og geografisk lokalisasjon.	Ingen effekt
Thorsdottir et al. (2000)	Island	Kasus: 55 Kontroll: 165	3-19 år	Sammenligne barn med T1D med kontroller med hensyn til inntak av kumelk i spedbarnsalder, og undersøke andelen beta-kasein i skandinavisk og islandsk melk.	Alder ved introduksjon av, hyppighet og varighet av kumelkinntak i spedbarnsalder - risiko for T1D: Ingen signifikant forskjell mellom kasus og kontroll.	Kontroller matchet for kjønn og fødselsdato.	Ingen effekt

Virtanen et al. (2000) (Childhood Diabetes in Finland)	Finland, 1986-1989	Kasus: 33 Kontroll: 254	0-12 år	Studere ernæringsmønster i spedbarnsalder og kosthold i barndommen ved intervju og HLA-DQB1 genotyping, hos søsken til barn med T1D.	Alder ved introduksjon av kumelbasert tilleggsernæring < 2 mnd - risiko for T1D inndelt etter HLA-DQB1 risikogruppe: Lav/reduert risiko: OR (95 % KI): 2.74 (0.40-18.8). Moderat risiko: OR (95 % KI): 1.28 (0.17-9.5). Høy risiko: OR (95 % KI): 2.36 (0.40-13.9).	Justert for matchende faktorer, mors utdanning, mors og barns alder, og stratifisert for HLA-DQB1 risikogruppe. Kontroller (søsken til barn med T1D) matchet for kjønn, alder (± 1 år), ikke fra samme familie som kasus, start av oppfølging innen 6 mnd av respektivt kasus, og under risiko for T1D da sykdommen oppsto hos kasus.	Ingen effekt
---	--------------------	----------------------------	---------	--	--	--	--------------

4 Diskusjon

4.1 Intern validitet

Validitet har å gjøre med i hvilken grad vi måler det vi virkelig ønsker å måle.

4.1.1 Seleksjonsskjevhet

Seleksjonsskjevhet innebærer systematiske forskjeller mellom gruppene i populasjonsutvalget, som følge av utvalgsprosedyrer, randomisering og forskjeller i baselinekarakteristika. Rekruttering av deltakere kan potensielt sett ha innvirkning på tilfeldig seleksjon. Alle studiene rekrutterte kasuser fra bestemte sykehus eller klinikker der barna ble født (RCT- og kohortstudier) eller behandlet/innlagt i forbindelse med sykdomsdebut (kasus-kontroll studier), uten å selekere blant disse. Det er derfor ingen ting som tyder på at pasientene med T1D i studiene ikke er representative for pasientgruppen med T1D. Et poeng er derimot at alle studiene har en grense for oppfølging opp til en viss alder eller en grense for alder ved sykdomsdebut innen typisk rundt 15 år som inklusjonskriterium for deltagere. Selv om den overveiende majoriteten av pasienter med T1D debuterer før dette, og alderen ved debut av T1D de siste tiårene har dreid mot de yngste aldersgruppene i mange land (4), er det også personer der T1D debuterer senere i tenårene eller etter dette. Derfor kan man ikke sikkert utelukke at en slik seleksjonen kan ha påvirket resultatene. Populasjonsutvalget i artiklene til Rosenbauer et al. (87, 88) besto utelukkende av pasienter med sykdomsdebut før en alder av 5 år, og jevnaldrende kontroller. Resultatene derfra kan ikke nødvendigvis overføres til å si noe om den kumulative risikoen for utvikling av T1D senere i livet i relasjon til kumelkintroduksjon.

Individene i kontrollgruppene er i de fleste studiene matchet med kasuser for kjønn, alder, og ofte bosted. Det følger vanlig praksis for utvelgelse av kontroller. Bandurska-Stankiewicz & Rutkowska (78) brukte den generelle friske barnebefolkningen i hele Polen som kontrollgruppe, og det kom ikke tydelig fram hvordan data fra disse var blitt innhentet. Kontrollgruppen i studien til Sipetic et al. (90) var barn med hudsykdom innlagt på sykehus og matchet for alder, kjønn og bosted. Med en slik gruppe kan det være forhold som gjør den uegnet som kontrollgruppe i dette tilfellet, men det er vanskelig å vite. Frederiksen et al. (79), Knip et al. (85), Alves et al. (83) og Lempainen et al. (80) studerte barn med genetisk

disposisjon for T1D eller søsken med T1D. Effekten av kumelk i spedbarnsalder hos disse kan ikke uten videre overføres til den generelle befolkningen eller til barn som ikke er disponerte. Det samme gjelder andre veien.

4.1.2 Utøverskjevhet

Utøverskjevhet betegnes som systematiske forskjeller mellom gruppene i intervensjonen, annen behandling som ikke blir vurdert og blinding av deltakere, personell eller de som måler utfall. Knip et al. (85) er vel den eneste studien der dette punktet er relevant. Studien var dobbelt blindet der hverken barnets familie eller helsepersonellet som var involvert visste hvilken type morsmelkerstatning barnet fikk. Dette var for å unngå noen som helst påvirkning av rapportering med tanke på mengde og varighet av inntak av erstatningen.

4.1.3 Frafallsskjevhet

Frafallsskjevheter omhandler systematiske forskjeller mellom gruppene og studiene i forhold til frafall under rekrutteringen og gjennomføringen av studiene. Knip et al. (85) tok hensyn til frafallet i TRIGR-Pilot studien ved å gjøre en intention-to-treat analyse der også frafalne deltagere blir tatt med i utregningen selv om de ikke har fått noen intervensjon. Per-protokoll analysen gav lavere risiko for hydrolysatgruppen enn intention-to-treat analysen, men ingen av resultatene var statistisk signifikante. Frederiksen et al. (79) i DAISY hadde en frafallsprosent på 26 % til første kliniske oppfølging, og deretter et frafall på 2,3 % blant de gjenværende etter dette. I kohortstudien til Savilahti & Saarinen (86) takket 6 267 av 15 400 ja til å delta, og 58 av disse forsvant av ulike grunner slik at 6 209 ble igjen. 75 % av disse registrerte daglig mengde og type av morsmelkerstatning som ble inntatt. Frafallet til Rosenbauer et al. (87) var 29 % for kasuser og 57 % for kontroller under rekruttering og gjennomføring (retur av spørreskjema eller ikke). I artikkelen til Rosenbauer et al. fra 2007 (88) var frafallet tilnærmet identisk som for 2008. Responsraten i rekrutteringen og gjennomføringen var 76 % for kasuser og 73 % for kontroller i studien til Malcova et al. (81). 81 % av kasuser og 48 % av kontroller returnerte utfylt spørreskjema (rekruttering og gjennomføring) i undersøkelsen til Svensson et al. (89). Sipetic et al. (90) hadde en responsrate på 90,5 % blant kasuser og 100 % blant kontroller. For kasusgruppen var responsraten 90,2 % i studien til Strotmeyer et al. (91). Responsraten til kontrollgruppen i studien til Sadauskaite-Kuehne et al. (92), var 72,9 % for Sverige og 94,8 % for Litauen. I

EURODIAB studien (74) var responsraten 89,3 % for kasusgruppen og 74,6 % for kontrollgruppen. I de øvrige studiene er det ikke informert om responsraten.

Man må alltid regne med en del frafall i denne typen studier. I tillegg til størrelsen på frafallet, kan fellestrekk ved årsaker til frafall bidra til skjevhet. Hvorvidt det foreligger slike fellestrekk, er i disse studiene vanskelig å avgjøre. Det viktigste er at frafallet er mest mulig likt mellom gruppene. I studiene ovenfor varierer responsratene relativt mye.

Artikkelforfatterne har imidlertid ikke gjort noe nummer ut av dette, og det er ingen spesiell grunn til å feste ytterligere usikkerhet til resultatene på bakgrunn av dette. Likevel er det slik at en høy responsrate alltid er ønskelig, og vil være med på å styrke validiteten til resultatene.

4.1.4 Måleskjevhet

Når det er systematiske forskjeller i hvordan utfallene er målt eller tolket, eller når utfallsmåleren ikke er blindet, kan det oppstå måleskjevhet. T1D er en sykdom som er relativt enkel å diagnostisere, og de aller fleste studiene bruker WHO-kriterier for diagnostisering. Dessuten ble diagnosen hos hver enkelt kasus i flere av studiene konstatert ved hjelp av både et nasjonalt diabetesregister, reseptregister og lokal diagnostisering på involvert sykehus. Måleskjevheten kan derimot oppstå når de ulike studiene ser på debut av T1D i ulike aldersintervaller, slik som nevnt under punkt 4.1.1 for blant annet Rosenbauer et al. (87, 88).

4.1.5 Rapporteringsskjevhet

En rapporteringsskjevhet kan oppstå når det er systematiske forskjeller mellom rapporterte og ikke-rapporterte resultater eller variabler, det vil si en selektiv rapportering, eller når utfallet systematisk påvirker informasjonen om variablene. Dette er en kjent bekymring innen forskning på årsaker og risikofaktorer til T1D, men også innen mange andre felt. I kasus-kontrollstudiene i denne oppgaven der man ser på ulike variabler under svangerskapet og i de første leveårene i relasjon til T1D, kan selvfølgelig informasjonen som blir gitt fra pasientens familie være påvirket av manglende evne til å huske nøyaktig ting som skjedde for mange år siden. En slik hukommelsesfaktor må man imidlertid i like stor grad regne med for kontrollgruppen, og derfor kan det godt hende det bare er snakk om tilfeldig variasjon som ikke nødvendigvis vil påvirke resultatene. Problemet er at mange foreldre til barn med T1D vil kunne oppleve skyldfølelse i forhold til hva barnet deres har vært utsatt for tidlig i livet, noe som igjen kan påvirke hukommelsen slik at de «husker» at barnet var eksponert og utsatt

for ting på en annen måte og i ulik grad enn det som i virkeligheten var tilfelle. Med en slik skjevhet ville man få en tendens til å overestimere en positiv assosiasjon. Prospektive kohort- og RCT-studier eliminerer denne usikkerhetsfaktoren, noe som er tilfelle for fire av studiene i denne oppgaven (79, 80, 85, 86). Jo yngre deltakerne var da de ble med i studiene, jo kortere tid er det siden spedbarnsalder, og desto høyere er sannsynligheten for at foreldrene husker riktig. Dette gjaldt spesielt studiene til Rosenbauer et al. (87, 88), der deltakerne var under 5 år gamle.

4.1.6 Konfundering

Et tolkningsproblem kan oppstå hvis et fenomen henger sammen med utfallet som blir studert. Det kalles effektforveksling eller konfundering, der en observert sammenheng kan skyldes en bakenforliggende faktor. Muligheten for at konfunderende faktorer kan påvirke resultatene slik at det oppstår en tilsynelatende assosiasjon mellom T1D og ulike variabler i spedbarnsalder, som introduksjon av kumelk, er grunnen til at omtrent alle kasus-kontrollstudiene justerer for en rekke ulike faktorer i multivariable utregninger. Dette er helt nødvendig for å tolke resultatene i enhver kasus-kontrollstudie. Man kjenner allerede til en rekke faktorer som kan påvirke risikoen for T1D, og det er derfor naturlig å justere for dem. Likevel vil det i alle studier hele tiden være usikkerhet rundt hvorvidt det fremdeles foreligger ytterligere konfunderende faktorer man ikke kjenner til, eller ikke har hatt mulighet til å justere for, og dermed heller ikke kan ta høyde for i de matematiske utregningsmodellene. For eksempel justerte Sipetic et al. (90) først for en rekke viktige faktorer, og fant da en positiv og betydelig økt risiko for T1D ved introduksjon av kumelk før en alder av 5 måneder. Men etter å ha justert for en lang rekke ytterligere faktorer, forsvant denne effekten. I kolonnen med resultatklassifisering har jeg forsøkt å vurdere kvaliteten til resultatene på bakgrunn av blant annet justering og matching av kontroller. Usikkerheten er likevel fremdeles noe man må leve med, men også her kommer det an på sannsynlighet, sannsynligheten for i hvilken grad man har justert for relevante faktorer, og dermed kan stole på resultatene.

4.1.7 Tilfeldig variasjon

Når man studerer et fenomen, vil man nesten alltid kun ta for seg et utvalg av en bestemt populasjon. Mellom to utvalg vil resultatene sannsynligvis variere. Mest mulig representative verdier oppnås ved et størst mulig utvalg, og sannsynligheten er da mindre for at forskjellene

skyldes tilfeldig variasjon. Det er som regel alltid knyttet en viss begrensning til hvor stor andel av en aktuell populasjon man kan inkludere i et forskningsprosjekt, både på grunn av kapasitet, midler og naturlige begrensninger. Derfor benytter man konfidensintervall for å beregne hvilke verdier gjennomsnittet til populasjonen sannsynligvis ligger innenfor. Konfidensintervallet viser både om en forskjell er signifikant og sier noe om variabiliteten i populasjonen, og dermed usikkerheten knyttet til resultatene. P-verdi er også et mål på om en forskjell er statistisk signifikant, der en lav verdi, eller liten sannsynlighet for at resultatet har oppstått tilfeldig, svarer til høy signifikans. Alle studiene i denne oppgaven som har oppgitt tallverdier for resultatene, har også angitt statistisk signifikansnivå ved konfidensintervall, p-verdi eller begge deler. Statistisk signifikans er det tatt høyde for i kolonnen med resultatklassifikasjon, slik det også er gjengitt i punkt 3.1. Flere av studiene hadde for små studiepopulasjoner til å kunne oppnå et konfidensintervall utenfor 1, og vi kan derfor ikke gjøre noen konklusjon med bakgrunn i disse.

4.2 Ekstern validitet

Ekstern eller ytre validitet angir i hvilken grad vi kan generalisere resultatene til andre populasjoner og andre kontekster enn dem undersøkelsen gjaldt. Har resultatene overføringsverdi? Den beste bedømmelsen av ekstern validitet, gjøres ved å sammenligne resultater fra ulike undersøkelser om samme problemstilling. Høy ekstern validitet er når resultatene er stabile i tid og rom og på tvers av ulike undersøkelser. Eventuelle forskjeller mellom undersøkelsene bør kunne forklares ut fra kjente egenskaper ved de anvendte metodene og variablene. Et problem i studiene i denne oppgaven er at kumelkvariabelen i spedbarnsalder varierer mye mellom studiene. Varianten av kumelkeksponering varierer mellom spesiallaget kumelkbasert morsmelkerstatning, vanlig morsmelkerstatning, hjemmelaget kumelkinnblandet morsmelkerstatning, vanlig kumelk, D-vitamintilsatt kumelk, kumelk med ulik bestanddel av beta-kasein, alder ved introduksjon, mengde inntatt, og alder ved start av daglig inntak. De aller fleste ser på alder ved første introduksjon av kumelk, som regel naturligvis i form av morsmelkerstatning. Aldersskillet mellom tidlig og sen introduksjon som anvendes i resultatet, er derimot svært ulik mellom studiene. Det er også forskjell i hvorvidt det er genetisk disponerte individer som er studert, eller om dette ikke er selektert etter. Resultatene varierer også fra ingen effekt, til invers effekt og positiv effekt. Riktignok var det kun én studie (86) som viste en invers effekt, og dette gjaldt kun alder ved

start av daglig inntak av kumelkbasert melkeerstatning over 3,8 måneder, og oppstart før dette var ikke signifikant relatert til lavere risiko for T1D. Resultatene er likevel lang ifra stabile, selv om det er mer som peker i retning av en økt risiko for T1D ved tidlig introduksjon, enn i motsatt retning.

4.3 Reliabilitet

Studier er reliable når målingene er uavhengige av hvem som måler og når målingene er konsistente over tid. Reliabilitet er knyttet til hvorvidt undersøkelsen representerer den virkelige situasjonen. Når uavhengige målinger gir tilnærmet identiske resultater, betyr dette at det er høy reliabilitet. Målemetodene i disse studiene er standardisert for diagnostisering av T1D, og måling av variablene stort sett foregår ved bruk av spørreskjemaer. Spørreskjemaene må anses å være like pålitelige mellom de prospektive- og de retrospektive studiene for seg. Når ulike studier har kommet til forskjellige konklusjoner når det gjelder den aktuelle problemstillingen, er ikke resultatene helt reliable siden vi ikke får det samme svaret hver gang. Men her er det til en viss grad ulike ting som måles slik som nevnt blant annet i forrige avsnitt.

4.4 Resultater

I to studier gjort av Elliot et al. (96, 97), var inntak av protein fra kumelk assosiert med økt risiko for T1D blant diabetesdisponerte rotter (BB-rotter) og NOD-mus (non-obese diabetic mice). På mennesker har tidligere studier indikert at tidlig introduksjon til kumelk øker risikoen for autoimmunitet mot beta-cellene i pankreas (98, 99), og T1D (100-102). Andre studier har ikke kunnet vise noen relasjon mellom disse fenomenene (103, 104). En metaanalyse av Gerstein (105) viste at introduksjon av kumelk før en alder av fire måneder var forbundet med en signifikant økning i risiko for T1D med OR på 1,63 (95 % KI 1,22-2,17). Tidlig introduksjon av kumelk henger sammen med kortere varighet av brysternæring, men førstnevnte faktor viste seg å være den dominerende risikofaktoren for T1D i en finsk nasjonal kasus-kontrollstudie der begge disse faktorene ble studert (102).

Slike motstridende resultater som nevnt ovenfor er i overensstemmelse med resultatene fra studiene i denne oppgaven. Det kan være flere ulike forklaringer på slike avvikende resultater. I de fleste moderne samfunn, er kumelkbasert melkeerstatning den første tilleggsernæringen

et spedbarn eksponeres for. Men for eksempel i USA, blir en betydelig andel av spedbarn først introdusert til forskjellige typer grøt, før kumelk. Det er store variasjoner mellom land og kulturer når det gjelder spedbarnsernæring. Også bruken av delvis eller fullstendig hydrolysert kumelkerstatning varierer betydelig mellom land. Variasjoner i genotyper og andelen som har en økt disposisjon for T1D, er det også naturlig å tenke at kan være årsak, i hvert fall til en viss grad, til en del av de avvikende resultatene.

TRIGR-Pilot studien (85) følges nå opp av en mye større og internasjonal intervensjonsstudie (106), men resultatene blir ikke klare før i 2017. Denne vil ha nok styrke og være av tilstrekkelig varighet til å gi bedre svar enn pilotstudien. Hypotesen til studien er: avvenning til en fullstendig hydrolysert morsmelkerstatning (kumelkbasert) vil redusere sannsynligheten for T1D blant genetisk disponerte barn (107).

4.4.1 Mulige virkningsmekanismer

Dersom det virkelig vil vise seg at tidlig introduksjon av kumelk i spedbarnsalder sikkert øker risikoen for T1D, eller at en fullstendig hydrolysert melkeerstatning beskytter mot sykdommen, er det av stor interesse å finne ut hvilke mekanismer som kunne ligge bak en slik effekt. Mulige mekanismer ved en eventuell beskyttende effekt av hydrolysert erstatning som har vært foreslått (107), er listet nedenfor:

1. Eliminering av tidlig eksponering for intakt bovint insulin.
2. Redusert tarmpermeabilitet.
3. Induksjon av regulatorisk T-celle-modning i tarmens lymfoide vev.
4. Modifisering av tarmens bakterieflora.

Hydrolysatet i TRIGR er kasein-basert og inneholder ikke intakte proteiner. Dermed er erstatningen også fri for intakt bovint insulin, som man finner i kumelk (108). Bovint insulin skiller seg fra humant insulin med kun tre aminosyrer. Spedbarn som inntok kumelk før en alder av tre måneder, utviklet en immunrespons mot bovint insulin (109). De spedbarna som tidlig viste tegn på autoimmunitet mot betacellene, manglet evnen til å utvikle oral toleranse mot bovint insulin. Immunresponsen som indueres av bovint insulin hos slike individer, kan på et tidspunkt tenke seg å bli ledet over til å rette seg mot kroppens eget insulin og

insulinproduserende betaceller i pankreas. På den måten kan bovint insulin bidra til sykdomsprosessen og utvikling til T1D. Mekanismen som kontrollerer oral toleranse, vil få tid til å modnes ved avvenning til en hydrolysert erstatning ved at eksponeringen for bovint insulin utsettes.

Ting kan type på at barn som debuterer med T1D har økt tarmpermeabilitet, og at disse har høyere konsentrasjoner av antistoffer og høyere nivå av T-cellerespons mot enkelte proteiner i kosten (110-114). Funn fra TRIGR-pilotstudien viste at barn som senere utviklet T1D, allerede i spedbarnsalder hadde forhøyede konsentrasjoner av antistoffer mot kumelkproteiner (115). Dette kan enten bety at T1D kasuser har økt tarmpermeabilitet tidlig i livet, eller det kan reflektere en dysregulering av immunsystemet i tarmen.

Subklinisk intestinal inflammasjon og intestinal immunaktivering hos pasienter med T1D har blitt påvist i biopsistudier fra tarm (116, 117). Regulatoriske T-celler er antatt å være sentrale i reguleringen av autoimmunitet, og biopsistudier fra tarmen har vist en manglende intestinal aktivering av disse cellene hos type 1 diabetikere (118). Dette kan kanskje forklare den subkliniske intestinale immunaktiveringen og endrede responsen mot kostholdsantigener som ses hos pasienter med T1D.

Bakteriekoloniseringen av tarmen går igjennom to kritiske faser i spedbarnsalderen, først rett etter fødsel og deretter i avvenningsfasen. Kostholdet er vist å være en veldig viktig faktor som påvirker sammensetningen i bakteriefloraen, og bakteriefloraen er funnet å være annerledes for spedbarn som får morsmelkerstatning (119, 120). Graden av mangfold i bakteriefloraen avtar over tid hos personer som senere utvikler T1D, og endres påfallende annerledes enn hos friske (121). I BB-rotter har kumelkhydrolysat vist å beskytte mot T1D og ha gunstig effekt på integriteten i den intestinale barriere, regulatorisk cytokinproduksjon, og sammensetningen i bakteriefloraen i tarmen (122).

5 Konklusjon

Hensikten med denne oppgaven var å undersøke hva forskningslitteraturen sier om relasjonen mellom tidlig introduksjon av kumelk i spedbarnsalder og risiko for T1D. Resultatene mellom de ulike inkluderte studiene er avvikende. De fleste studiene kan ikke vise til noen effekt, men flere viste en positiv assosiasjon. Kun én studie viste en mulig invers assosiasjon. Resultatene fra andre studier er også sprikende. Per i dag finnes det altså ikke nok dokumentasjon som skulle tilsi at man bør utsette introduksjonen av kumelk til sent i spedbarnsalder, heller ikke for de som er genetisk disponert for T1D. Det er heller ikke sikkert at man vil få slik dokumentasjon i framtiden. TRIGR-studien vil vise om kumelkhydrolysat reduserer risikoen eller ikke har noen effekt sammenlignet med kumelkbasert melkeerstatning i spedbarnsalder.

Litteraturliste

1. Knip M. Natural course of preclinical type 1 diabetes. *Hormone research*. 2002;57 Suppl 1:6-11.
2. Kimpimaki T, Kupila A, Hamalainen AM, Kukko M, Kulmala P, Savola K, et al. The first signs of beta-cell autoimmunity appear in infancy in genetically susceptible children from the general population: the Finnish Type 1 Diabetes Prediction and Prevention Study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2001;86(10):4782-8.
3. Ziegler AG, Hummel M, Schenker M, Bonifacio E. Autoantibody appearance and risk for development of childhood diabetes in offspring of parents with type 1 diabetes: the 2-year analysis of the German BABYDIAB Study. *Diabetes*. 1999;48(3):460-8.
4. Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2006;23(8):857-66.
5. Green A, Patterson CC. Trends in the incidence of childhood-onset diabetes in Europe 1989-1998. *Diabetologia*. 2001;44 Suppl 3:B3-8.
6. Onkamo P, Vaananen S, Karvonen M, Tuomilehto J. Worldwide increase in incidence of Type I diabetes--the analysis of the data on published incidence trends. *Diabetologia*. 1999;42(12):1395-403.
7. Green A, Gale EA, Patterson CC. Incidence of childhood-onset insulin-dependent diabetes mellitus: the EURODIAB ACE Study. *Lancet*. 1992;339(8798):905-9.
8. Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. EURODIAB ACE Study Group. *Lancet*. 2000;355(9207):873-6.
9. Karvonen M, Viik-Kajander M, Moltchanova E, Libman I, LaPorte R, Tuomilehto J. Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group. *Diabetes care*. 2000;23(10):1516-26.
10. Patterson CC, Dahlquist GG, Gyurus E, Green A, Soltesz G. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. *Lancet*. 2009;373(9680):2027-33.
11. Padaiga Z, Tuomilehto J, Karvonen M, Podar T, Brigis G, Urbonaite B, et al. Incidence trends in childhood onset IDDM in four countries around the Baltic sea during 1983-1992. *Diabetologia*. 1997;40(2):187-92.
12. Podar T, Solntsev A, Karvonen M, Padaiga Z, Brigis G, Urbonaite B, et al. Increasing incidence of childhood-onset type I diabetes in 3 Baltic countries and Finland 1983-1998. *Diabetologia*. 2001;44 Suppl 3:B17-20.
13. Tuomilehto J, Podar T, Brigis G, Urbonaite B, Rewers M, Adojaan B, et al. Comparison of the incidence of insulin-dependent diabetes mellitus in childhood among five Baltic populations during 1983-1988. *International journal of epidemiology*. 1992;21(3):518-27.
14. Rytönen M, Ranta J, Tuomilehto J, Karvonen M. Bayesian analysis of geographical variation in the incidence of Type I diabetes in Finland. *Diabetologia*. 2001;44 Suppl 3:B37-44.
15. Skriverhaug T, Stene LC, Drivvoll AK, Strom H, Joner G. Incidence of type 1 diabetes in Norway among children aged 0-14 years between 1989 and 2012: has the incidence stopped rising? Results from the Norwegian Childhood Diabetes Registry. *Diabetologia*. 2014;57(1):57-62.
16. Yang Z, Wang K, Li T, Sun W, Li Y, Chang YF, et al. Childhood diabetes in China. Enormous variation by place and ethnic group. *Diabetes care*. 1998;21(4):525-9.

17. Cavalli-Sforza LL, Piazza A. Human genomic diversity in Europe: a summary of recent research and prospects for the future. *European journal of human genetics : EJHG*. 1993;1(1):3-18.
18. Aamodt G, Stene LC, Njolstad PR, Sovik O, Joner G. Spatiotemporal trends and age-period-cohort modeling of the incidence of type 1 diabetes among children aged <15 years in Norway 1973-1982 and 1989-2003. *Diabetes care*. 2007;30(4):884-9.
19. Joner G, Sovik O. Increasing incidence of diabetes mellitus in Norwegian children 0-14 years of age 1973-1982. *Diabetologia*. 1989;32(2):79-83.
20. Joner G, Stene LC, Sovik O. Nationwide, prospective registration of type 1 diabetes in children aged <15 years in Norway 1989-1998: no increase but significant regional variation in incidence. *Diabetes care*. 2004;27(7):1618-22.
21. Cherubini V, Carle F, Gesuita R, Iannilli A, Tuomilehto J, Prisco F, et al. Large incidence variation of Type I diabetes in central-southern Italy 1990-1995: lower risk in rural areas. *Diabetologia*. 1999;42(7):789-92.
22. Metcalfe MA, Baum JD. Incidence of insulin dependent diabetes in children aged under 15 years in the British Isles during 1988. *BMJ (Clinical research ed)*. 1991;302(6774):443-7.
23. Harjutsalo V, Sjoberg L, Tuomilehto J. Time trends in the incidence of type 1 diabetes in Finnish children: a cohort study. *Lancet*. 2008;371(9626):1777-82.
24. Hussen HI, Persson M, Moradi T. The trends and the risk of type 1 diabetes over the past 40 years: an analysis by birth cohorts and by parental migration background in Sweden. *BMJ open*. 2013;3(10):e003418.
25. Bruno G, Pagano G, Faggiano F, De Salvia A, Merletti F. Effect of Sardinian heritage on risk and age at onset of type 1 diabetes: a demographic case-control study of Sardinian migrants. *International journal of epidemiology*. 2000;29(3):532-5.
26. Ehehalt S, Popovic P, Muntoni S, Willasch A, Hub R, et al. Incidence of diabetes mellitus among children of Italian migrants substantiates the role of genetic factors in the pathogenesis of type 1 diabetes. *European journal of pediatrics*. 2009;168(5):613-7.
27. Hjern A, Soderstrom U. Parental country of birth is a major determinant of childhood type 1 diabetes in Sweden. *Pediatric diabetes*. 2008;9(1):35-9.
28. Neu A, Willasch A, Ehehalt S, Kehrner M, Hub R, Ranke MB. Diabetes incidence in children of different nationalities: an epidemiological approach to the pathogenesis of diabetes. *Diabetologia*. 2001;44 Suppl 3:B21-6.
29. Patrick SL, Kadohiro JK, Waxman SH, Curb JD, Orchard TJ, Dorman JS, et al. IDDM incidence in a multiracial population. The Hawaii IDDM Registry, 1980-1990. *Diabetes care*. 1997;20(6):983-7.
30. Soderstrom U, Aman J, Hjern A. Being born in Sweden increases the risk for type 1 diabetes - a study of migration of children to Sweden as a natural experiment. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*. 2012;101(1):73-7.
31. Zung A, Elizur M, Weintrob N, Bistrizter T, Hanukoglu A, Zadik Z, et al. Type 1 diabetes in Jewish Ethiopian immigrants in Israel: HLA class II immunogenetics and contribution of new environment. *Human immunology*. 2004;65(12):1463-8.
32. Weintrob N, Sprecher E, Israel S, Pinhas-Hamiel O, Kwon OJ, Bloch K, et al. Type 1 diabetes environmental factors and correspondence analysis of HLA class II genes in the Yemenite Jewish community in Israel. *Diabetes care*. 2001;24(4):650-3.
33. Raymond NT, Jones JR, Swift PG, Davies MJ, Lawrence G, McNally PG, et al. Comparative incidence of Type I diabetes in children aged under 15 years from South Asian and White or Other ethnic backgrounds in Leicestershire, UK, 1989 to 1998. *Diabetologia*. 2001;44 Suppl 3:B32-6.

34. Siemiatycki J, Colle E, Campbell S, Dewar R, Aubert D, Belmonte MM. Incidence of IDDM in Montreal by ethnic group and by social class and comparisons with ethnic groups living elsewhere. *Diabetes*. 1988;37(8):1096-102.
35. Eisenbarth GS. Lilly lecture 1986. Genes, generator of diversity, glycoconjugates, and autoimmune beta-cell insufficiency in type I diabetes. *Diabetes*. 1987;36(3):355-64.
36. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature*. 1983;302(5909):575-81.
37. Phillips DI. Twin studies in medical research: can they tell us whether diseases are genetically determined? *Lancet*. 1993;341(8851):1008-9.
38. Duffy DL. Twin studies in medical research. *Lancet*. 1993;341(8857):1418-9.
39. Condon J, Shaw JE, Luciano M, Kyvik KO, Martin NG, Duffy DL. A study of diabetes mellitus within a large sample of Australian twins. *Twin research and human genetics : the official journal of the International Society for Twin Studies*. 2008;11(1):28-40.
40. Hyttinen V, Kaprio J, Kinnunen L, Koskenvuo M, Tuomilehto J. Genetic liability of type 1 diabetes and the onset age among 22,650 young Finnish twin pairs: a nationwide follow-up study. *Diabetes*. 2003;52(4):1052-5.
41. Kaprio J, Tuomilehto J, Koskenvuo M, Romanov K, Reunanen A, Eriksson J, et al. Concordance for type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based cohort of twins in Finland. *Diabetologia*. 1992;35(11):1060-7.
42. Kumar D, Gemayel NS, Deapen D, Kapadia D, Yamashita PH, Lee M, et al. North-American twins with IDDM. Genetic, etiological, and clinical significance of disease concordance according to age, zygosity, and the interval after diagnosis in first twin. *Diabetes*. 1993;42(9):1351-63.
43. Kyvik KO, Green A, Beck-Nielsen H. Concordance rates of insulin dependent diabetes mellitus: a population based study of young Danish twins. *BMJ (Clinical research ed)*. 1995;311(7010):913-7.
44. Olmos P, A'Hern R, Heaton DA, Millward BA, Risley D, Pyke DA, et al. The significance of the concordance rate for type 1 (insulin-dependent) diabetes in identical twins. *Diabetologia*. 1988;31(10):747-50.
45. Redondo MJ, Yu L, Hawa M, Mackenzie T, Pyke DA, Eisenbarth GS, et al. Heterogeneity of type I diabetes: analysis of monozygotic twins in Great Britain and the United States. *Diabetologia*. 2001;44(3):354-62.
46. Stankov K, Benc D, Draskovic D. Genetic and epigenetic factors in etiology of diabetes mellitus type 1. *Pediatrics*. 2013;132(6):1112-22.
47. Stanescu DE, Lord K, Lipman TH. The epidemiology of type 1 diabetes in children. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2012;41(4):679-94.
48. Tuomi T, Santoro N, Caprio S, Cai M, Weng J, Groop L. The many faces of diabetes: a disease with increasing heterogeneity. *Lancet*. 2014;383(9922):1084-94.
49. Craig ME, Nair S, Stein H, Rawlinson WD. Viruses and type 1 diabetes: a new look at an old story. *Pediatric diabetes*. 2013;14(3):149-58.
50. Hober D, Alidjinou EK. Enteroviral pathogenesis of type 1 diabetes: queries and answers. *Current opinion in infectious diseases*. 2013;26(3):263-9.
51. Stene LC, Rewers M. Immunology in the clinic review series; focus on type 1 diabetes and viruses: the enterovirus link to type 1 diabetes: critical review of human studies. *Clinical and experimental immunology*. 2012;168(1):12-23.
52. Yeung WC, Rawlinson WD, Craig ME. Enterovirus infection and type 1 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of observational molecular studies. *BMJ (Clinical research ed)*. 2011;342:d35.

53. von Herrath M. Can we learn from viruses how to prevent type 1 diabetes?: the role of viral infections in the pathogenesis of type 1 diabetes and the development of novel combination therapies. *Diabetes*. 2009;58(1):2-11.
54. Chakhtoura M, Azar ST. The role of vitamin d deficiency in the incidence, progression, and complications of type 1 diabetes mellitus. *International journal of endocrinology*. 2013;2013:148673.
55. van Etten E, Mathieu C. Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3: basic concepts. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2005;97(1-2):93-101.
56. Giulietti A, Gysemans C, Stoffels K, van Etten E, Decallonne B, Overbergh L, et al. Vitamin D deficiency in early life accelerates Type 1 diabetes in non-obese diabetic mice. *Diabetologia*. 2004;47(3):451-62.
57. Zella JB, McCary LC, DeLuca HF. Oral administration of 1,25-dihydroxyvitamin D3 completely protects NOD mice from insulin-dependent diabetes mellitus. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2003;417(1):77-80.
58. Mathieu C, Laureys J, Sobis H, Vandeputte M, Waer M, Bouillon R. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 prevents insulinitis in NOD mice. *Diabetes*. 1992;41(11):1491-5.
59. Mathieu C, Waer M, Casteels K, Laureys J, Bouillon R. Prevention of type I diabetes in NOD mice by nonhypercalcemic doses of a new structural analog of 1,25-dihydroxyvitamin D3, KH1060. *Endocrinology*. 1995;136(3):866-72.
60. Bener A, Alsaied A, Al-Ali M, Al-Kubaisi A, Basha B, Abraham A, et al. High prevalence of vitamin D deficiency in type 1 diabetes mellitus and healthy children. *Acta diabetologica*. 2009;46(3):183-9.
61. Borkar VV, Devidayal, Verma S, Bhalla AK. Low levels of vitamin D in North Indian children with newly diagnosed type 1 diabetes. *Pediatric diabetes*. 2010;11(5):345-50.
62. Littorin B, Blom P, Scholin A, Arnqvist HJ, Blohme G, Bolinder J, et al. Lower levels of plasma 25-hydroxyvitamin D among young adults at diagnosis of autoimmune type 1 diabetes compared with control subjects: results from the nationwide Diabetes Incidence Study in Sweden (DISS). *Diabetologia*. 2006;49(12):2847-52.
63. Bierschenk L, Alexander J, Wasserfall C, Haller M, Schatz D, Atkinson M. Vitamin D levels in subjects with and without type 1 diabetes residing in a solar rich environment. *Diabetes care*. 2009;32(11):1977-9.
64. Sorensen IM, Joner G, Jenum PA, Eskild A, Torjesen PA, Stene LC. Maternal serum levels of 25-hydroxy-vitamin D during pregnancy and risk of type 1 diabetes in the offspring. *Diabetes*. 2012;61(1):175-8.
65. Mohr SB, Garland CF, Gorham ED, Garland FC. The association between ultraviolet B irradiance, vitamin D status and incidence rates of type 1 diabetes in 51 regions worldwide. *Diabetologia*. 2008;51(8):1391-8.
66. Nystrom L, Dahlquist G, Ostman J, Wall S, Arnqvist H, Blohme G, et al. Risk of developing insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) before 35 years of age: indications of climatological determinants for age at onset. *International journal of epidemiology*. 1992;21(2):352-8.
67. Staples JA, Ponsonby AL, Lim LL, McMichael AJ. Ecologic analysis of some immune-related disorders, including type 1 diabetes, in Australia: latitude, regional ultraviolet radiation, and disease prevalence. *Environmental health perspectives*. 2003;111(4):518-23.
68. Stene LC, Ulriksen J, Magnus P, Joner G. Use of cod liver oil during pregnancy associated with lower risk of Type I diabetes in the offspring. *Diabetologia*. 2000;43(9):1093-8.
69. Stene LC, Joner G. Use of cod liver oil during the first year of life is associated with lower risk of childhood-onset type 1 diabetes: a large, population-based, case-control study. *The American journal of clinical nutrition*. 2003;78(6):1128-34.

70. Norris JM, Yin X, Lamb MM, Barriga K, Seifert J, Hoffman M, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acid intake and islet autoimmunity in children at increased risk for type 1 diabetes. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2007;298(12):1420-8.
71. Cardwell CR, Stene LC, Joner G, Bulsara MK, Cinek O, Rosenbauer J, et al. Birth order and childhood type 1 diabetes risk: a pooled analysis of 31 observational studies. *International journal of epidemiology*. 2011;40(2):363-74.
72. Cardwell CR, Stene LC, Joner G, Davis EA, Cinek O, Rosenbauer J, et al. Birthweight and the risk of childhood-onset type 1 diabetes: a meta-analysis of observational studies using individual patient data. *Diabetologia*. 2010;53(4):641-51.
73. Cardwell CR, Stene LC, Joner G, Cinek O, Svensson J, Goldacre MJ, et al. Caesarean section is associated with an increased risk of childhood-onset type 1 diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. *Diabetologia*. 2008;51(5):726-35.
74. Group ESS. Rapid early growth is associated with increased risk of childhood type 1 diabetes in various European populations. *Diabetes care*. 2002;25(10):1755-60.
75. Harder T, Roepke K, Diller N, Stechling Y, Dudenhausen JW, Plagemann A. Birth weight, early weight gain, and subsequent risk of type 1 diabetes: systematic review and meta-analysis. *American journal of epidemiology*. 2009;169(12):1428-36.
76. Ljungkrantz M, Ludvigsson J, Samuelsson U. Type 1 diabetes: increased height and weight gains in early childhood. *Pediatric diabetes*. 2008;9(3 Pt 2):50-6.
77. Dahlquist GG, Patterson C, Soltesz G. Perinatal risk factors for childhood type 1 diabetes in Europe. The EURODIAB Substudy 2 Study Group. *Diabetes care*. 1999;22(10):1698-702.
78. Bandurska-Stankiewicz E, Rutkowska J. Environmental risk factors for type 1 diabetes in the north of Poland. *Diabetologia Doswiadczalna i Kliniczna*. 2008;8(2):81-4.
79. Frederiksen B, Kroehl M, Lamb MM, Seifert J, Barriga K, Eisenbarth GS, et al. Infant exposures and development of type 1 diabetes mellitus: The Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *JAMA pediatrics*. 2013;167(9):808-15.
80. Lempainen J, Vaarala O, Makela M, Veijola R, Simell O, Knip M, et al. Interplay between PTPN22 C1858T polymorphism and cow's milk formula exposure in type 1 diabetes. *Journal of autoimmunity*. 2009;33(2):155-64.
81. Malcova H, Sumnik Z, Drevinek P, Venhacova J, Lebl J, Cinek O. Absence of breastfeeding is associated with the risk of type 1 diabetes: a case-control study in a population with rapidly increasing incidence. *European journal of pediatrics*. 2006;165(2):114-9.
82. Perez-Bravo F, Oyarzun A, Carrasco E, Albala C, Dorman JS, Santos JL. Duration of breast feeding and bovine serum albumin antibody levels in type 1 diabetes: a case-control study. *Pediatric diabetes*. 2003;4(4):157-61.
83. Alves JG, Figueiroa JN, Meneses J, Alves GV. Breastfeeding protects against type 1 diabetes mellitus: a case-sibling study. *Breastfeeding medicine : the official journal of the Academy of Breastfeeding Medicine*. 2012;7(1):25-8.
84. Ahadi M, Tabatabaeiyan M, Moazzami K. Association between environmental factors and risk of type 1 diabetes - a case-control study. *Endokrynologia Polska*. 2011;62(2):134-7.
85. Knip M, Virtanen SM, Seppa K, Ilonen J, Savilahti E, Vaarala O, et al. Dietary intervention in infancy and later signs of beta-cell autoimmunity. *The New England journal of medicine*. 2010;363(20):1900-8.
86. Savilahti E, Saarinen KM. Early infant feeding and type 1 diabetes. *European journal of nutrition*. 2009;48(4):243-9.
87. Rosenbauer J, Herzig P, Giani G. Early infant feeding and risk of type 1 diabetes mellitus-a nationwide population-based case-control study in pre-school children. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2008;24(3):211-22.

88. Rosenbauer J, Herzig P, Kaiser P, Giani G. Early nutrition and risk of Type 1 diabetes mellitus--a nationwide case-control study in preschool children. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*. 2007;115(8):502-8.
89. Svensson J, Carstensen B, Mortensen HB, Borch-Johnsen K. Early childhood risk factors associated with type 1 diabetes--is gender important? *European journal of epidemiology*. 2005;20(5):429-34.
90. Sipetic S, Vlajinac H, Kocev N, Bjekic M, Sajic S. Early infant diet and risk of type 1 diabetes mellitus in Belgrade children. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)*. 2005;21(4):474-9.
91. Strotmeyer ES, Yang Z, LaPorte RE, Chang YF, Steenkiste AR, Pietropaolo M, et al. Infant diet and type 1 diabetes in China. *Diabetes research and clinical practice*. 2004;65(3):283-92.
92. Sadauskaite-Kuehne V, Ludvigsson J, Padaiga Z, Jasinskiene E, Samuelsson U. Longer breastfeeding is an independent protective factor against development of type 1 diabetes mellitus in childhood. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2004;20(2):150-7.
93. Thorsdottir I, Birgisdottir BE, Johannsdottir IM, Harris DP, Hill J, Steingrimsdottir L, et al. Different beta-casein fractions in Icelandic versus Scandinavian cow's milk may influence diabetogenicity of cow's milk in infancy and explain low incidence of insulin-dependent diabetes mellitus in Iceland. *Pediatrics*. 2000;106(4):719-24.
94. Virtanen SM, Laara E, Hypponen E, Reijonen H, Rasanen L, Aro A, et al. Cow's milk consumption, HLA-DQB1 genotype, and type 1 diabetes: a nested case-control study of siblings of children with diabetes. *Childhood diabetes in Finland study group*. *Diabetes*. 2000;49(6):912-7.
95. Esfarjani F, Azar MR, Gafarpour M. IDDM and early exposure of infant to cow's milk and solid food. *Indian journal of pediatrics*. 2001;68(2):107-10.
96. Elliott RB, Martin JM. Dietary protein: a trigger of insulin-dependent diabetes in the BB rat? *Diabetologia*. 1984;26(4):297-9.
97. Elliott RB, Reddy SN, Bibby NJ, Kida K. Dietary prevention of diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Diabetologia*. 1988;31(1):62-4.
98. Holmberg H, Wahlberg J, Vaarala O, Ludvigsson J. Short duration of breast-feeding as a risk-factor for beta-cell autoantibodies in 5-year-old children from the general population. *The British journal of nutrition*. 2007;97(1):111-6.
99. Kimpimaki T, Erkkola M, Korhonen S, Kupila A, Virtanen SM, Ilonen J, et al. Short-term exclusive breastfeeding predisposes young children with increased genetic risk of Type I diabetes to progressive beta-cell autoimmunity. *Diabetologia*. 2001;44(1):63-9.
100. Kostraba JN, Cruickshanks KJ, Lawler-Heavner J, Jobim LF, Rewers MJ, Gay EC, et al. Early exposure to cow's milk and solid foods in infancy, genetic predisposition, and risk of IDDM. *Diabetes*. 1993;42(2):288-95.
101. Virtanen SM, Rasanen L, Aro A, Lindstrom J, Sippola H, Lounamaa R, et al. Infant feeding in Finnish children less than 7 yr of age with newly diagnosed IDDM. *Childhood Diabetes in Finland Study Group*. *Diabetes care*. 1991;14(5):415-7.
102. Virtanen SM, Rasanen L, Ylonen K, Aro A, Clayton D, Langholz B, et al. Early introduction of dairy products associated with increased risk of IDDM in Finnish children. *The Childhood in Diabetes in Finland Study Group*. *Diabetes*. 1993;42(12):1786-90.
103. Bodington MJ, McNally PG, Burden AC. Cow's milk and type 1 childhood diabetes: no increase in risk. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 1994;11(7):663-5.

104. Wadsworth EJ, Shield JP, Hunt LP, Baum JD. A case-control study of environmental factors associated with diabetes in the under 5s. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 1997;14(5):390-6.
105. Gerstein HC. Cow's milk exposure and type I diabetes mellitus. A critical overview of the clinical literature. *Diabetes care*. 1994;17(1):13-9.
106. Akerblom HK, Krischer J, Virtanen SM, Berseth C, Becker D, Dupre J, et al. The Trial to Reduce IDDM in the Genetically at Risk (TRIGR) study: recruitment, intervention and follow-up. *Diabetologia*. 2011;54(3):627-33.
107. Knip M, Virtanen SM, Becker D, Dupre J, Krischer JP, Akerblom HK. Early feeding and risk of type 1 diabetes: experiences from the Trial to Reduce Insulin-dependent diabetes mellitus in the Genetically at Risk (TRIGR). *The American journal of clinical nutrition*. 2011;94(6 Suppl):1814s-20s.
108. Aranda P, Sanchez L, Perez MD, Ena JM, Calvo M. Insulin in bovine colostrum and milk: evolution throughout lactation and binding to caseins. *Journal of dairy science*. 1991;74(12):4320-5.
109. Vaarala O, Knip M, Paronen J, Hamalainen AM, Muona P, Vaatainen M, et al. Cow's milk formula feeding induces primary immunization to insulin in infants at genetic risk for type 1 diabetes. *Diabetes*. 1999;48(7):1389-94.
110. Dahlquist G, Savilahti E, Landin-Olsson M. An increased level of antibodies to beta-lactoglobulin is a risk determinant for early-onset type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus independent of islet cell antibodies and early introduction of cow's milk. *Diabetologia*. 1992;35(10):980-4.
111. Klemetti P, Savilahti E, Ilonen J, Akerblom HK, Vaarala O. T-cell reactivity to wheat gluten in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Scandinavian journal of immunology*. 1998;47(1):48-53.
112. Saukkonen T, Savilahti E, Vaarala O, Virtala ET, Tuomilehto J, Akerblom HK. Children with newly diagnosed IDDM have increased levels of antibodies to bovine serum albumin but not to ovalbumin. *Childhood Diabetes in Finland Study Group*. *Diabetes care*. 1994;17(9):970-6.
113. Savilahti E, Saukkonen TT, Virtala ET, Tuomilehto J, Akerblom HK. Increased levels of cow's milk and beta-lactoglobulin antibodies in young children with newly diagnosed IDDM. *The Childhood Diabetes in Finland Study Group*. *Diabetes care*. 1993;16(7):984-9.
114. Vaarala O, Klemetti P, Savilahti E, Reijonen H, Ilonen J, Akerblom HK. Cellular immune response to cow's milk beta-lactoglobulin in patients with newly diagnosed IDDM. *Diabetes*. 1996;45(2):178-82.
115. Luopajarvi K, Savilahti E, Virtanen SM, Ilonen J, Knip M, Akerblom HK, et al. Enhanced levels of cow's milk antibodies in infancy in children who develop type 1 diabetes later in childhood. *Pediatric diabetes*. 2008;9(5):434-41.
116. Auricchio R, Paparo F, Maglio M, Franzese A, Lombardi F, Valerio G, et al. In vitro-derived intestinal immune response to gliadin in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2004;53(7):1680-3.
117. Westerholm-Ormio M, Vaarala O, Pihkala P, Ilonen J, Savilahti E. Immunologic activity in the small intestinal mucosa of pediatric patients with type 1 diabetes. *Diabetes*. 2003;52(9):2287-95.
118. Vaarala O, Atkinson MA, Neu J. The "perfect storm" for type 1 diabetes: the complex interplay between intestinal microbiota, gut permeability, and mucosal immunity. *Diabetes*. 2008;57(10):2555-62.
119. Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, Wagendorp AA, Klijn N, Bindels JG, et al. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using

molecular identification and detection methods. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2000;30(1):61-7.

120. Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*. 2006;118(2):511-21.

121. Giongo A, Gano KA, Crabb DB, Mukherjee N, Novelo LL, Casella G, et al. Toward defining the autoimmune microbiome for type 1 diabetes. *The ISME journal*. 2011;5(1):82-91.

122. Visser JT, Bos NA, Van Tol EA, Harthoorn LC, Rosing J. Differential preventive effect of casein hydrolysates on autoimmune diabetes development involves intestinal barrier integrity and gut flora composition. *European Journal of Immunology*. 2009;39:S674.