
DISS. ETH No. 27436

Novel strategies to improve iron intake in African infants:
effects on anemia and vaccine efficacy

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH ZURICH)

presented by

MARY ACHOLA UYOGA

MSc in Epidemiology, Jomo Kenyatta University of Agriculture and Technology, Kenya

born on 26.11.1987

citizen of Kenya

accepted on the recommendation of

Prof. Michael B. Zimmermann, MD, examiner

Prof. Parminder S. Suchdev, MD, co-examiner

Prof. Simon Karanja, co-examiner

Dr. Nicole U. Stoffel, co-examiner

2021

Summary

Background

Iron-deficiency anemia (IDA) affects many infants in sub-Saharan Africa and may result in poor brain and cognitive development and impaired adaptive immunity. In most resource-limited settings, the complementary diet is plant-based with low amounts of bioavailable iron. With rapid growth and increasing physiological demand for iron, fortification of complementary diet with iron-containing micronutrient powders (MNPs) is recommended and efficacious in reducing the risk of IDA. However, absorption is often low resulting in a large amount of unabsorbed iron in the colon, where it is promotes colonization by enteropathogens. Thus, in resource-limited settings, settings with poor hygiene and high burden of infectious diseases, strategies that enhance the amount of absorbed iron are needed.

In adults, absorption from supplements was optimized by alternating the doses, but no data exists for infants. Lactoferrin, an iron-binding protein present in human milk has previously been investigated but findings are equivocal. Co-fortification of complementary food with low-iron MNP and prebiotic fibers is a promising strategy to safely improve infants' iron status. However, what remains unclear is whether the absorption enhancing effect occurs from single- or long-term feeding.

The role of iron in adaptive immunity has recently been demonstrated, but there's limited data on studies done in infants. However, because many African infants are affected by both IDA and vaccine-preventable deaths, increasing iron intake at this age could be highly beneficial.

Research objective

The overall objective of this thesis is to investigate approaches to improve iron intake in sub-Saharan African infants and the effects on anemia and vaccine response. Specifically, in this thesis we aimed to: 1) determine iron bioavailability from new infant cereals consisting of legumes and pulses (**Manuscript 1**); 2) evaluate the effect of dosing regimen on iron absorption from iron-containing MNPs and supplements (**Manuscript 2**); 3) assess iron absorption when given with apolactoferrin or as hololactoferrin (**Manuscript 3**); 4) to investigate iron absorption from a wheat cereal containing ferrous fumarate and ascorbic acid given with and without prebiotics (**Report**); and 5) examine the effect of iron deficiency and supplementation during routine childhood vaccination (**Manuscript 4**).

Original studies

Manuscript 1

The objective of this study was to measure iron bioavailability from ferrous fumarate (Fefum) added to commercial infant cereals containing: 1) refined wheat flour (reference meal); 2) whole grain wheat and lentil flour (WG-lentil); 3) whole grain wheat and chickpea flour (WG-chickpeas); 4) whole grain oat flour (WG-oat); and 5) whole grain oat flour (WG-oat-FeBG) with iron added as ferrous bisglycinate (FeBG).

In a prospective, single-blinded study, 6–14-month-old Malawian children (n=30) consumed 25 g serving of all five cereals; each contained 2.25 mg of stable isotope-labeled iron, and 13.5 mg ascorbic acid (AA). Fractional iron absorption (FIA) was assessed by erythrocyte incorporation of isotopes after 14 days.

Iron absorption from whole grain wheat-based cereals containing lentil (15.8%) and chickpea flour (12.8%) was comparable to refined wheat cereal (12.1%) whereas absorption from FeBG (7.4%) and Fefum (9.2%) consumed in whole grain oat-based cereals were comparable but lower than that from the lentil-based cereal.

Manuscript 2

The objective of this study was to assess the effects of dosing schedules on iron absorption from iron-containing MNPs and oral iron supplements given to Kenyan infants.

In prospective studies in Kenyan infants, we compared iron absorption and plasma hepcidin (Phep) response from: 1) meals fortified with 12-mg iron MNP given in the morning or afternoon (n = 22); 2) the same given on consecutive or alternate days (n = 21); and 3) a 12-mg iron supplement given on alternate days or every third day (n = 24).

Iron absorption from iron containing MNPs from morning (15.9%) and afternoon (16.1%) doses was comparable. Compared to baseline (23.3%), MNPs consumed on consecutive days increased Phep resulting in a significant but modest decrease in absorption at 24 h (20.1%) but not 48 h (20.9%). Compared to baseline (12.7%), absorption from oral iron supplement on alternate (13.8%) or every third day (14.8%) was comparable and did not significantly increase Phep.

Manuscript 3

The objective of this study was to compare iron absorption from 3 maize porridge meals containing: 1) labeled Ferrous sulfate (FeSO_4); 2) labeled FeSO_4 given with bovine apolactoferrin (apo-Lf) and 3) intrinsically labeled bovine hololactoferrin (holo-Lf).

In a cross-over study, Kenyan infants aged 4 months consumed: 1) 1.5 mg of iron as labeled FeSO₄; 2) 1.42 mg of iron labeled FeSO₄ given with 1.41 g apo-Lf; and 3) 1.41 g of holo-Lf carrying 1.5 mg of labeled iron.

The amount of iron absorbed from holo-Lf (5%) was comparable to that absorbed from FeSO₄ (6.3%) and the addition of apo-Lf to a test meal containing FeSO₄ significantly increased (+56%) iron absorption to 9.8%.

Report 1

The primary objective of this study was to determine iron absorption from a new wheat-based instant cereal containing 3.6 mg of iron as Fefum and AA, without and with prebiotic galactooligosaccharides (GOS) and fructooligosaccharides (FOS) at 9:1 ratio. Secondary objectives included the effect of prebiotic dose (7.5 g vs. 3 g) and whether prebiotic mediated difference was due to an acute effect (before intervention), a chronic effect (after intervention), or both.

In 62 Kenyan infants, we determined FIA from 4 labelled meals containing: 1) AA (4:1 ratio relative to iron); 2) 3.6 mg of iron as Fefum without prebiotics (for both groups) or with 7.5 g of prebiotic mixture (group 1) or 3 g of prebiotic mixture (group 2). For the intervention, infants consumed the cereal with the same amount of iron and respective prebiotic dose for 3 weeks.

Compared to the meal without prebiotics pre-intervention, prebiotics significantly improved FIA when added to the cereal before (+16%) and after (+35%) 3 weeks of intervention, independent of the prebiotic dose. Furthermore, adding prebiotics to the cereal after 3 weeks of intervention had the greatest effect on absorption (+53%).

Manuscript 4

In two separate studies, our overall objective was to determine if anemia and/or ID during infancy affects vaccine response.

In a birth cohort study, we followed 573 infants to age 18mo and assessed whether anemia or ID at time of vaccination predicted serum immunoglobulin G (IgG) and seroconversion at 24 weeks and 18 months to three-valent oral polio (OPV), diphtheria, tetanus, whole-cell pertussis, *Haemophilus influenzae* type b (Hib), ten-valent pneumococcal polysaccharide (PnPs) and measles vaccines. Hemoglobin at time of vaccination was the strongest positive predictor of: (A) anti-diphtheria and anti-pertussis-IgG at 24wk and 18mo (B) anti-pertussis filamentous hemagglutinin-IgG at 24wk; and (C) anti-pneumococcus 19 IgG at 18mo. Anemia and serum transferrin receptor at time of vaccination were the strongest predictors of seroconversion against diphtheria and pneumococcus 19 at 18mo.

In a randomized trial follow-up, 155 children received MNPs with 5mg iron daily or MNPs without iron for 4mo starting at age 7.5mo and received Measles vaccine at age 9 and 18mo. We measured anti-measles IgG, seroconversion and avidity at age 11.5 mo and 4.5 y.

From the recruited infants, 127 and 88 were assessed at age 11.5mo and 4.5y, respectively. Compared to infants that did not receive iron, those who received iron at time of vaccination had higher anti-measles-IgG, seroconversion and IgG avidity at 11.5mo.

Conclusion

With this thesis we have provided evidence that in iron-deficient African infants: 1) a complementary cereal containing whole grain, pulses and AA could meet a significant fraction of their daily iron requirements; 2) dose spacing is not a major determinant of iron absorption from MNPs and iron supplements; 3) adding apo-Lf improved iron absorption from FeSO₄ and may be a safe way to provide oral iron supplements and MNPs; 4) long-term prebiotics consumption conditioned the gut thereby improving iron absorption from infant cereals to a greater extent compared to when consumed in a single meal; and 5) anemia and ID at the time of vaccination predicted responses to diphtheria, pertussis and pneumococcal vaccines whereas iron supplementation at the time of vaccination may improve responses to measles vaccine.

Zusammenfassung

Hintergrund

Eisenmangelanämie ist weit verbreitet unter Säuglingen und Kleinkindern in Afrika, welche südlich der Sahara leben und kann die Entwicklung des Gehirns, der kognitiven Fähigkeiten sowie auch der adaptiven Immunität beeinträchtigen. In den meisten Gegenden wo nur beschränkte Ressourcen vorhanden sind, ist die Beikost pflanzlich und enthält nur geringe Mengen an bioverfügbarem Eisen. Angesichts des schnellen Wachstums und des steigenden physiologischen Eisenbedarfs wird die Anreicherung der Beikost mit eisenhaltigen Mikronährstoffpulvern (MNP) empfohlen und ist wirksam, um das Risiko für Eisenmangelanämie zu verringern. Allerdings ist die Absorption des Eisens oft gering, was dazu führt, dass eine große Menge an nicht aufgenommenem Eisen im Dickdarm verbleibt, wo es die Besiedlung von enteropathogenen Bakterien fördert. Daher werden in ressourcenbeschränkten Umgebungen, in Umgebungen mit schlechter Hygiene und hoher Belastung durch Infektionskrankheiten Strategien benötigt, die die Menge des absorbierten Eisens erhöhen.

Bei Erwachsenen wurde die Absorption von Eisensupplementen durch die Einnahme jeden zweiten Tag, anstatt jeden Tag optimiert; für Säuglinge und Kleinkinder liegen jedoch noch keine Daten vor. Das Lactoferrin-Protein, ein eisenbindendes Protein, welches in der menschlichen Milch vorkommt, wurde bereits untersucht, aber die Ergebnisse sind nicht eindeutig. Die Anreicherung von Beikost mit eisenarmen MNP und präbiotischen Fasern ist eine vielversprechende Strategie zur sicheren Verbesserung des Eisenstatus von Säuglingen. Unklar bleibt jedoch, ob der absorptionssteigernde Effekt bei einmaliger oder langfristiger Einnahme auftritt.

Die Rolle von Eisen im adaptiven Immunsystem wurde kürzlich nachgewiesen, aber es gibt nur wenige Daten von Studien, die in Säuglingen und Kleinkindern durchgeführt wurden. Da viele afrikanische Säuglinge und Kleinkinder sowohl von Eisenmangelanämie als auch von Todesfällen betroffen sind, welche durch Impfung vermieden werden könnten, könnte eine Erhöhung der Eisenzufuhr in diesem Alter von großem Nutzen sein.

Forschungsziel

Das Hauptziel dieser Doktorarbeit war die Untersuchung von verschiedenen Ansätzen zur Verbesserung der Eisenzufuhr bei Säuglingen und Kleinkindern in Afrika südlich der Sahara, sowie dessen Auswirkung auf Anämie und Immunantwort nach Impfungen. Konkrete Ziele dieser Arbeit waren folgende: 1) die Bioverfügbarkeit von Eisen aus einer neuen Säuglingsnahrung auf Getreidebasis und Hülsenfrüchten, zu bestimmen (Manuskript 1); 2) die Absorption von Eisen, wenn es mit Apolactoferrin oder als Hololactoferrin verabreicht wird, zu untersuchen (Manuskript 2); 3) den Effekt

des Dosierungsschemas auf die Eisenabsorption von eisenhaltigen MNP und Supplementen zu evaluieren (Manuskript 3); 4) die Eisenabsorption von Säuglingsnahrung auf Getreidebasis, welche Eisenfumarat und Ascorbinsäure enthält und mit und ohne Präbiotika verabreicht wird, zu untersuchen (Bericht); und 5) den Effekt von Eisenmangel und -supplementierung während routinemäßigen Kinderimpfungen zu untersuchen (Manuskript 4).

Original-Studien

Manuskript 1

Ziel dieser Studie war es, die Bioverfügbarkeit von Eisenfumarat (Fefum) zu messen, welches kommerzieller Säuglingsnahrung auf Getreidebasis (Getreidebreie) zugesetzt wurde, die 1) raffiniertes Weizenmehl (Referenz-Mahlzeit), 2) Weizenvollkorn- und Linsenmehl (VK-Linsen), 3) Weizenvollkorn- und Kichererbsenmehl (VK-Kichererbsen), 4) Hafervollkornmehl (VK-Hafer) oder 5) Hafervollkornmehl (VK-Hafer-FeBG) mit Eisen in Form von Eisenbisglycinat (FeBG) enthält.

In einer prospektiven, einfach verblindeten Studie konsumierten 6-14 Monate alte malawische Säuglinge und Kleinkinder (n=30) Portionen à 25 g aller fünf Getreidebreie; jede Portion enthielt 2.25 mg stabiles, isotoopenmarkiertes Eisen und 13.5 mg Ascorbinsäure. Die prozentuale Eisenabsorption wurde durch die Inkorporierung der Isotope in die Erythrozyten nach 14 Tagen bestimmt.

Die Eisenabsorption aus Getreidebreien auf Vollkornweizenbasis, welche Linsen- (15.8%) und Kichererbsenmehl (12.8%) enthielten, war vergleichbar mit Getreidebreien basierend auf raffiniertem Weizen (12.1%), während die Absorption aus FeBG (7.4%) und Fefum (9.2%), die in Getreidebreien auf Vollkornhaferbasis konsumiert wurden, vergleichbar, aber niedriger war als die, welche Linsenmehl enthielten.

Manuskript 2

Ziel dieser Studie war es, die Auswirkungen von Dosierungsschemata auf die Eisenabsorption aus eisenhaltigen MNP und oralen Eisensupplementen, welche kenianischen Säuglingen verabreicht wurden, zu untersuchen.

In prospektiven Studien in kenianischen Säuglingen verglichen wir die Eisenabsorption und die Plasma-Hepcidin (PHep) Antwort von: 1) Mahlzeiten, die mit 12 mg eisenhaltigen MNP angereichert waren und morgens oder nachmittags verabreicht wurden (n = 22); 2) den vorher genannten Mahlzeiten an

aufeinanderfolgenden oder alternierenden Tagen (n = 21); und 3) einem 12-mg-Eisensupplement, welches an alternierenden Tagen oder jeden dritten Tag verabreicht wurde (n = 24).

Die Eisenabsorption aus eisenhaltigen MNP war bei der Gabe morgens (15.9%) und nachmittags (16.1%) vergleichbar. Im Vergleich zur Baseline (23.3%) führten MNP, die an aufeinanderfolgenden Tagen eingenommen wurden, zu einem PHeP Anstieg und zu einer signifikanten, aber geringen Abnahme der Absorption nach 24 h (20.1%), jedoch nicht nach 48 h (20.9%). Verglichen zur Baseline (12.7%) war die Absorption von oralen Eisensupplementen an alternierenden Tagen (13.8%) oder an jedem dritten Tag (14.8%) vergleichbar und führte nicht zu einem signifikanten PHeP Anstieg.

Manuskript 3

Das Ziel dieser Studie war es, die Eisenabsorption von 3 Maisbrei-Mahlzeiten zu vergleichen, welche folgendes enthielten: 1) markiertes Eisensulfat (FeSO_4); 2) markiertes FeSO_4 , verabreicht mit bovinem Apolactoferrin (apo-Lf) und 3) intrinsisch markiertes bovines Hololactoferrin (holo-Lf).

In einer Crossover-Studie erhielten 4 Monate alte kenianische Säuglinge: 1) 1.5 mg Eisen als markiertes FeSO_4 ; 2) 1.42 mg Eisen als markiertes FeSO_4 , verabreicht mit 1.41 g apo-Lf und 3) 1.41 g holo-Lf mit 1.5 mg markiertem Eisen.

Die aus holo-Lf absorbierte Eisenmenge (5%) war vergleichbar mit der absorbierten Menge von FeSO_4 (6.3%) und die Zugabe von apo-Lf zu einer Testmahlzeit mit FeSO_4 erhöhte die Eisenabsorption signifikant (+56 %) auf 9.8%.

Bericht 1

Das primäre Ziel dieser Studie war die Bestimmung der Eisenabsorption aus neu entwickelter Instant-Säuglingsnahrung auf Weizenbasis, welche 3.6 mg Eisen als Fefum und Ascorbinsäure enthält, mit und ohne der Präbiotika Galactooligosaccharide (GOS) und Fructooligosaccharide (FOS) im Verhältnis 9:1. Weitere Ziele der Studie waren, den Effekt der präbiotischen Dosis (7.5 g vs. 3 g) zu erforschen und zu untersuchen, ob die Verbesserung der Eisenabsorption durch die Präbiotika auf einen akuten Effekt (vor der Intervention), einen chronischen Effekt (nach der Intervention) oder einen kumulativen Effekt zurückzuführen war.

Bei 62 kenianischen Säuglingen bestimmten wir die prozentuale Eisenabsorption aus 4 mit Isotopen markierten Mahlzeiten, die folgendes enthielten: 1) Ascorbinsäure (Verhältnis 4:1 relativ zu Eisen); 2) 3.6 mg Eisen als Fefum ohne Präbiotika (für beide Gruppen) oder mit 7.5 g präbiotischer Mischung (Gruppe 1) oder 3 g präbiotischer Mischung (Gruppe 2). Für die Intervention konsumierten die Säuglinge 3 Wochen lang die Getreidebreie mit der gleichen Menge an Eisen und entsprechender Dosis Präbiotika.

Im Vergleich zu der Mahlzeit ohne Präbiotika vor der Intervention verbesserten die Präbiotika die fraktionierte Eisenabsorption signifikant, als sie den Getreidebreien vor (+16%) und nach (+35%) 3 Wochen der Intervention zugesetzt wurden, unabhängig von der Präbiotika-Dosis. Ausserdem hatte die Zugabe von Präbiotika zu den Getreidebreien 3 Wochen nach der Intervention den grössten Effekt auf die Absorption (+53%).

Manuskript 4

In zwei separaten Studien war es unser übergeordnetes Ziel festzustellen, ob Anämie und/oder Eisenmangel während des Säuglings- und Kleinkindalters die Impfantwort beeinflusst.

In einer Geburtskohorten-Studie verfolgten wir 573 Säuglinge bis zum Alter von 18 Monaten und untersuchten, ob Anämie oder Eisenmangel zum Zeitpunkt der Impfung das Serum-Immunglobulin G (IgG) und die Serokonversion nach 24 Wochen und 18 Monaten für die dreiwertigen oralen Polio- (OPV), Diphtherie-, Tetanus-, Ganzzell-Pertussis-, Haemophilus influenzae Typ b (Hib), zehnwertigen Pneumokokken-Polysaccharid- (PnP) und Masern-Impfstoffe vorhersagt. Das Hämoglobin zum Zeitpunkt der Impfung war der stärkste positive Prädiktor für: (A) Anti-Diphtherie- und Anti-Pertussis-IgG nach 24 Wochen und 18 Monaten, (B) Anti-Pertussis filamentöses Hämagglutinin-IgG nach 24 Wochen und (C) Anti-Pneumokokken-19-IgG nach 18 Monaten. Anämie und Serum-Transferrin-Rezeptor zum Zeitpunkt der Impfung waren die stärksten Prädiktoren für die Serokonversion gegen Diphtherie und Pneumokokken 19 nach 18 Monaten.

In einer randomisierten Nachfolgestudie erhielten 155 Kinder ein MNP mit 5 mg Eisen täglich oder ein MNP ohne Eisen für 4 Monate, beginnend im Alter von 7.5 Monaten, und erhielten die Masern Impfung im Alter von 9 und 18 Monaten. Wir bestimmten Anti-Masern-IgG, Serokonversion und Avidität im Alter von 11.5 Monaten und 4.5 Jahren.

Von den rekrutierten Säuglingen und Kleinkindern wurden 127 und 88 im Alter von 11.5 Monaten beziehungsweise 4.5 Jahren, untersucht. Im Vergleich zu Säuglingen und Kleinkindern, die kein Eisen erhielten, hatten diejenigen, die zum Zeitpunkt der Impfung Eisen erhielten, ein höheres Anti-Masern-IgG, eine höhere Serokonversion und IgG-Avidität im Alter von 11.5 Monaten.

Schlussfolgerung

Mit dieser Arbeit haben wir nachgewiesen, dass bei afrikanischen Säuglingen und Kleinkindern mit Eisenmangel: 1) ergänzende Säuglingsnahrung auf Getreidebasis, welche Vollkorn, Hülsenfrüchte und Ascorbinsäure enthalten, einen signifikanten Anteil ihres täglichen Eisenbedarfs decken kann; 2) der Dosierungs-Abstand kein wesentlicher Bestimmungsfaktor für die Eisenabsorption aus MNP und

oralen Eisensupplementen ist; 3) die Zugabe von apo-Lf die Eisenabsorption verbessert und möglicherweise eine sichere Methode darstellt um orale Eisensupplemente und MNP zu verabreichen; 4) der langfristige Konsum von Präbiotika den Darm konditioniert und dadurch die Eisenabsorption aus Säuglingsnahrung auf Getreidebasis in einem größeren Ausmaß verbessert als bei einmaligem Konsum; und 5) Anämie und Eisenmangel zum Zeitpunkt der Impfung die Immunantwort auf die Diphtherie-, Keuchhusten- und Pneumokokken-Impfungen vermindern, während Eisensupplementierung zum Zeitpunkt der Masern-Impfung die Immunantwort verbessert.