

# **Äidinmaidon totaali IgA ja HPV16 spesifinen IgA**

## **Vaikutus lapsen HPV infekioon**

Pro gradu -tutkielma

Turun yliopisto

Bioteknologian laitos

Molekyylibiotieteet, Biokemia

Kesäkuu 2024

Josefiina Mäkinen

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä

TURUN YLIOPISTO

Bioteknologian laitos

Molekyylibiologiikka, Biokemia

JOSEFIINA MÄKINEN: Äidinmaidon totaali IgA ja HPV16 spesifinen IgA - Vaikutus lapsen HPV infektiin

Pro gradu -tutkielma, 63 s.

Kesäkuu 2024

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä

---

Ihmisen papilloomavirukset (human papilloma virus, HPV) ovat yleisiä limakalvo- ja ihoinfektioita aiheuttavia DNA-virusia. HPV infektiio on usein oireeton ja paranee spontaanisti, mutta joissain tapauksissa infektiio voi kroonistua. Kroonistuneella suuren riskin HPV-infektiolla, esimerkiksi HPV16, on vahva yhteys erilaisten syöpien, kuten kohdunkaulan syövän syntyyn. HPV16 tartunta saadaan usein sukupuoliteitse, mutta HPV-virusilla on myös muita tartuntareittejä ja esimerkiksi lapsi voi saada tartunnan äidiltään synnytyksen yhteydessä. Niin aikuisilla kuin lapsilla HPV-virus voi infektoida sekä genitaalialueen- että suun limakalvoja.

Lapsen immuunijärjestelmä kehittyy täysin toimivaksi vasta syntymän jälkeen ja äidinmaidon sisältämät vasta-aineet antavat lapselle suojaa erilaisia infektiota vastaan, minkä lisäksi ne vaikuttavat merkittävästi lapsen immuunijärjestelmän kehitykseen ja säätelyyn. Äidinmaidon koostumus on vahvasti yksilöriippuvaista. Tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää, erittyykö HPV16 vasta-aineita äidinmaitoon ja onko niillä yhteyttä lapsen HPV-infektion syntyyn ja kehitykseen varhaislapsuuden aikana.

Tutkimus aloitettiin optimoimalla aikaisemmin syljelle käytetty ELISA-määritys (eng. enzyme-linked immunosorbent assay) äidinmaidolle sopivaksi maitonäytteiden totaali IgA pitoisuuksien määrittämistä varten. Tämän jälkeen pystyimme ja optimoimme äidinmaidolle sopivan HPV16 spesifisen ELISA-määrityksen. Analysoidut äidinmaitonäytteet sisälsivät keskimäärin IgA vasta-aineita 460 µg/ml (vaihteluväli 100,90-1137 µg/ml). Maitonäytteiden HPV16 vasta-ainetasot määritettiin mittaamalla näytteistä absorbanssit (492 nm), minkä jälkeen HPV16 vasta-ainetasoja verrattiin äidiltä ja lapselta kerättyihin perustietoihin ja HPV-statukseen.

Äidin tupakoinnilla huomattiin olevan yhteys suurempaan HPV16 vasta-aineiden eritykseen äidinmaitoon, mutta tupakointi ei vaikuttanut maidon totaali IgA määrään. Äidinmaidon HPV16 vasta-ainetasoille ei löydetty tilastollisesti merkitsevää yhteyttä lapsen HPV-infektion kehityksen kanssa.

Työssä analysoidut äidinmaitonäytteet (n=101) ovat osa TY:n Hammaslääketieteen laitoksen ja TYKS:n Naistentautien yhteistä HPV-infektion luonnollista taudinkulkua selvittävää pitkittäistutkimusta.

**Avainsanat:** ELISA, HPV16, IgA, papilloomavirus, totaali IgA, äidinmaito

# Sisällys

Lyhenteet	4
1 Kirjallisuuskatsaus	5
1.1 Vasta-aineet	5
1.1.1 Immunoglobuliinit	5
1.1.2 IgM, IgE, IgD vasta-aineluokat	5
1.1.3 IgG ja IgA vasta-aineluokat	6
1.2 Äidinmaito	6
1.2.1 Koostumus	6
1.2.2 Vasta-aineet	9
1.2.3 Vasta-aineiden merkitys lapselle	10
1.3 Ihmisen papilloomavirus	11
1.3.1 HPV-virukset	11
1.3.2 HPV16	13
1.3.3 Lapsen infektio	14
1.3.4 Tartuntareitit perheessä	15
1.4 ELISA-määritys	16
1.5 Työn tavoitteet	17
2 Materiaalit ja menetelmät	18
2.1 Äidinmaitonäytteiden valmistus määrityksiä varten	18
2.2 Totaali IgA vasta-ainemäärityksen optimoiminen	18
2.2.1 Kuoppalevyjen valmistus	19
2.2.2 Ensimmäinen määritys, maitonäytteiden laimentaminen	19
2.2.3 Toinen määritys, inkubaatio-olosuhteiden optimointi	20
2.2.4 Kolmas määritys, laimennosten optimointi ja näytteiden säilyvyyden testaus	20
2.3 Totaali IgA vasta-ainemääritykset	20
2.4 HPV16 spesifisen vasta-ainemäärityksen optimointi	21
2.4.1 96-kuoppalevyn päällystys antigeenillä ja maitonäytteiden laimentaminen	21
2.4.2 Blokkaustrupurien vertailu ja näytteiden inkubointiaika	22
2.4.3 Pesujen optimointi ja näytteiden sakkaamisen estäminen	22
2.4.4 Äidinmaitonäytteiden tausta	22

2.4.5	Blokkauspuskurin vaikutus näytteiden vasteisiin eri päällystyspitoisuuksilla	23
2.4.6	HPV16L1 rekombinanttiproteiinien vertailu kuoppalevyn päällystyksessä	23
2.4.7	HPV16L1 rekombinanttiproteiinin toimivuuden varmistaminen eri päällystyspitoisuuksilla	23
2.5	HPV16 spesifinen vasta-ainemääritys	24
2.5.1	96-kuoppalevyn valmistaminen	24
2.5.2	HPV16 spesifinen vasta-ainemääritys äidinmaidosta	25
2.6	Tilastolliset analyysit	25
3	Tulokset	26
3.1	Totaali IgA vasta-ainemäärityksen optimoiminen	26
3.1.1	Ensimmäinen määrittäminen, maitonäytteiden laimentaminen	26
3.1.2	Toinen määrittäminen, inkubaatio-olosuhteiden optimointi	26
3.1.3	Kolmas määrittäminen, laimennosten optimointi ja näytteiden säilyvyyden testaus	27
3.2	Totaali IgA vasta-ainemääritykset	29
3.3	HPV16 spesifisen vasta-ainemäärityksen optimointi	30
3.3.1	96-kuoppalevyn päällystys antigeenillä ja maitonäytteiden laimentaminen	30
3.3.2	Blokkauspuskuri ja näytteiden inkubointiaika	32
3.3.3	Pesujen optimointi näytteiden sakkaamisen estämiseksi	33
3.3.4	Äidinmaitonäytteiden tausta	34
3.3.5	Blokkauspuskurin vaikutus näytteiden vasteisiin eri päällystyspitoisuuksilla	35
3.3.6	HPV16L1 rekombinanttiproteiinien vertailu kuoppalevyn päällystyksessä	35
3.3.7	HPV16L1 rekombinanttiproteiinin toimivuuden varmistaminen eri päällystyspitoisuuksilla	36
3.4	HPV16 spesifinen vasta-ainemääritys	37
3.5	Tilastolliset analyysit	38
3.5.1	Äidin elintapojen, atopian ja HPV statuksen vaikutus äidinmaidon totaali IgA ja HPV16 vasta-aineisiin kaksi kuukautta lapsen syntymästä	38
3.5.2	Äidinmaidon HPV16 vasta-aineiden vaikutus lapsen HPV infekioon	44

4	Tulosten tarkastelu	48
4.1	Totaali IgA vasta-ainemäärityksen optimointi	48
4.2	Totaali IgA vasta-aineet äidinmaidossa	49
4.3	HPV16 spesifisen vasta-ainemäärityksen optimointi	49
4.4	HPV16 spesifiset vasta-aineet äidinmaidossa	51
4.5	Äidinmaidon HPV16 vasta-aineiden merkitys lapselle	52
5	Päätelmät	53
6	Lähteet	54

## Lyhenteet

BSA	<b>B</b> ovine <b>s</b> erum <b>a</b> lbumin
ELISA	engl. <b>e</b> nzyme-linked immunosorbent <b>a</b> ssay
HPV	Ihmisen papilloomavirus (engl. <b>h</b> uman <b>p</b> apilloma <b>v</b> irus)
IgA	Immunoglobuliini <b>A</b>
IgD	Immunoglobuliini <b>G</b>
IgE	Immunoglobuliini <b>E</b>
IgG	Immunoglobuliini <b>G</b>
IgM	Immunoglobuliini <b>M</b>
PBS	engl. <b>P</b> hosphate <b>b</b> uffered <b>s</b> aline
PBST	engl. <b>P</b> hosphate <b>b</b> uffered <b>s</b> aline, johon on lisättyä Tween20:tä
sIgA	<b>S</b> ekretorinen <b>IgA</b>

# 1 Kirjallisuuskatsaus

## 1.1 Vasta-aineet

### 1.1.1 Immunoglobuliinit

Immunoglobuliinit ovat vasta-aineina toimivia, plasmasolujen tuottamia glykoproteiineja, joiden rakenne koostuu kahdesta raskasketjusta ja kahdesta kevytketjusta. Immunoglobuliinin raskasketjun rakenteen perusteella immunoglobuliinit jaetaan viiteen ryhmään; immunoglobuliini A (IgA), immunoglobuliini D (IgD), immunoglobuliini E (IgE), immunoglobuliini G (IgG) ja immunoglobuliini M (IgM). Immunoglobuliineja valmistavat plasmasolut erikoistuvat B-soluista tietyn immunogeenin eli vasta-ainemuodostusta suoraan stimuloivan antigeenin, esimerkiksi bakteerin tai viruksen pintaproteiinin, vaikutuksesta vasta-aineita tuottaviksi soluiksi. Plasmasolut ovat osa humoraalista eli vasta-ainevälitteistä immunitettä ja niiden tuottamat immunoglobuliinit kattavat noin 20 % plasman proteiineista (Justiz Vaillant ja muut 2024.)

Immunoglobuliinien häntäosassa on kahden raskasketjun muodostama Fc-alue, jolla on sitoutumiskohtia erilaisille solureseptoreille. Fc-alueet vuorovaikuttavat ja aktivoivat immuunipuolustuksen soluja ja varmistavat, että jokainen vasta-aine aikaansaa sopivan immuunivasteen tiettyä antigeeniä kohtaan. Immunoglobuliinin kärkiosassa on kaksi identtistä Fab-aluetta, jotka sisältävät antigeenejä sitovat alueet (Justiz Vaillant ja muut 2024.) Kaikilla immunoglobuliineilla on yksi tai useampia toimintatapoja. Immunoglobuliinit kykenevät komplementtijärjestelmän aktivointiin, mikrobien opsonointiin, estämään mikrobeja kiinnittymästä limakalvojen pinnalle sekä neutraloimaan myrkköjä ja viruksia.

### 1.1.2 IgM, IgE ja IgD vasta-aineluokat

IgM vasta-aineet ovat rakenteeltaan pentameereja, jotka osallistuvat sekä patogeenien neutraloimiseen ja hävittämiseen, että tulehdusvasteen aikaansaamiseen aktivoimalla komplementtijärjestelmän klassisen reaktiotien. IgM luokan vasta-aineita tuotetaan ensisijaisesti primaarivasteena antigeenejä vastaan (Sathe ja Cusick 2024). IgE luokan vasta-aineet ovat monomeereja, jotka suojaavat elimistöä erilaisilta parasiiteilta. IgE vasta-aineiden Fc-alueen reseptorit vuorovaikuttavat muun muassa syöttösolujen ja basofiilien kanssa, minkä vuoksi IgE vasta-aineet ovat vastuussa myös välittömästä yliherkkyyden eli allergiareaktiosta, lisääntyneestä sytokiinien tuotannosta ja antigeenien



esittelystä (Godwin ja muut 2024). IgD luokan vasta-aineet toimivat myöskin monomeereina, mutta niiden tarkkaa roolia immuunipuolustuksessa ei vielä tiedetä (Justiz Vaillant ja muut 2024).

### **1.1.3 IgG ja IgA vasta-aineluokat**

IgG vasta-aineet ovat monomeereja, joilla on kaksi identtistä kiinnittymiskohtaa antigeenille. IgG vasta-aineita tuotetaan ensisijaisesti sekundaarivasteena patogeenejä vastaan ja ne kykenevät aktivoimaan komplementtijärjestelmän klassisen reaktiotien. IgG vasta-aineet voidaan jakaa neljään alaluokkaan; IgG1, IgG2, IgG3 ja IgG4. IgG on ainoa vasta-aineluokka, joka kykenee läpäisemään istukan, minkä vuoksi IgG vasta-aineita löytyy eniten vastasyntyneen elimistöstä ja verenkierrosta (Justiz Vaillant ja muut 2024.)

IgA luokan vasta-aineita esiintyy kahdessa eri molekyyliarakenteessa. Seerumissa IgA vasta-aineet esiintyvät monomeereina, mutta ne eritetään dimeereinä. Eritettävä IgA eli sekretorinen IgA (sIgA) suurin vasta-aineluokka, jota eritetään sylkeen, kyynelnesteeseen, äidinmaitoon, suolistoon, ruoansulatuskanavaan ja hengitysteihin. sIgA vasta-aineita löytyy limakalvoilta ja ne suojaavat ruoansulatuskanavan, hengitysteiden ja genitaalialueen epiteelisoluja patogeeneiltä. IgA vasta-aineet aktivoivat komplementtijärjestelmän vaihtoehoisen reaktiotien (Justiz Vaillant ja muut 2024.) IgA vasta-aineet kiinnittyvät antigeeneihin ja estävät niiden etenemisen limakalvojen alaiseen kudokseen ja verenkiertoon (Patel ja Jialal 2024).

## **1.2 Äidinmaito**

### **1.2.1 Koostumus**

Äidinmaidon koostumus, sen sisältämät ravintoaineet ja muut komponentit muuttavat pitoisuuksiaan maidossa imetysjakson aikana. Maidon koostumus vaihtelee päivittäin, mutta myös päivän aikana lapsen ruokailujen välillä, minkä lisäksi maidon koostumus on vahvasti yksilöriippuviasta sekä populaatiosidonnaista. Maidon koostumuksen jatkuvat suuret ja pienet muutokset pyrkivät takaamaan lapsen terveyden ja selviytymisen (Ballard ja Morrow 2013). Maidon koostumukseen vaikuttavat äidin perimä ja muut yksilölliset tekijät, kuten esimerkiksi ruokavalio sekä ympäristö. Maito sisältää vaihtelevia määriä ravintoaineita, kuten erilaisia sokereita, immuunitekiäjiä, kasvutekiäjiä, soluja ja prebiootteja.

Maidon tuotanto käynnistyy rintarauhasissa synnytyksen aikaan istukan irtoamisen ja kohdusta poistumisen myötä. Äidin verenkierron hormonitasapaino muuttuu, mikä johtaa rintarauhasen supistumiseen ja maidon eritykseen. Korkeat estrogeeni- ja progesteronipitoisuudet estävät rintamaidon erityksen alkamisen, mutta istukan irtoaminen johtaa näiden hormonien vähenemiseen äidin verenkierrossa (Tapanainen ja muut 2019.) Muutamana ensimmäisenä synnytyksen jälkeisenä päivänä erittyvä maito on kolostrumia eli ternimaitoa. Ternimaito sisältää paljon erilaisia proteiineja ja immuunitekijöitä, kuten esimerkiksi immunoglobuliineja, laktoferriinejä, sytokiineja ja leukosyyttejä sekä jonkin verran laktoosia, glukoosia ja muita metaboliitteja (Ballard ja Morrow 2013; Rio-Aige ja muut 2021). Ternimaidon vähäinen sokeripitoisuus viittaa siihen, että sen ensisijainen tarkoitus ei ole ravitsemuksellinen vaan immunologinen. Syntymän aikana ja sen jälkeen lapsi altistuu suurelle määrälle ympäristön mikrobeja. Koska lapsella ei vielä tässä vaiheessa ole omaa toimivaa immuunipuolustusta eikä lapsen suolistossa omaa vakiintunutta mikrobistoa, äidinmaidon sisältämät immuunitekijät ja bakteerit auttavat päälystämään lapsen limakalvot ja suoliston seinämät estäen muiden, mahdollisesti haitallisten mikrobien kiinnittymisen (Lyons ja muut 2020).

Äidinmaidon koostumus muuttuu ternimaidosta lähemmäs varsinaista, lopullista muotoaan laktogeneesin eli äidinmaidon tuotannon toisessa vaiheessa, joka käynnistyy lapsen muutaman ensimmäisen elinpäivän jälkeen. Muutoksen tarkempi ajankohta on yksilöriippuvainen, mutta tyypillisesti se tapahtuu 30-40 tuntia synnytyksen jälkeen (Hurst 2007). Jos laktogeneesin toinen vaihe ei ole käynnistynyt 72 tunnin kuluttua synnytyksestä, siitä puhutaan viivästyneenä laktogeneesinä. Viivästynyt laktogeneesi ei ole sama asia kuin epäonnistunut laktogeneesi ja viivästyneessä laktogeneesissä äidillä on kyky saavuttaa täydellinen rintamaidon erittyminen (X. Yu ja muut 2019). Laktogeneesin myöhästymistä voi tapahtua kenellä tahansa, joko sisäisten tai ulkoisten tekijöiden vaikutuksesta, mutta useimmiten se on yhteydessä lapsen ennenaikaiseen syntymään tai äidin ylipainoon.

Laktogeneesin toisessa vaiheessa maidon sisältämien vasta-aineiden ja muiden immuunitekijöiden määrä vähenee selvästi ja lapsen kasvua edesauttavien ravintoaineiden määrä puolestaan kasvaa. Kun lapsen syntymästä on kulunut muutama viikko, maidon koostumus kehittyy lopulliseen muotoonsa. Tässä vaiheessa maidon tarkoitus on ensisijaisesti edesauttaa lapsen kasvua, minkä vuoksi sen koostumus on muutaman viikon kuluttua lapsen syntymästä paljon ravitsevampaa kuin heti synnytyksen jälkeen. Lapsen kasvun edistämiseksi maito sisältää monia tärkeitä

ravintoaineita, kuten erilaisia sokereita ja rasvoja, hormoneja, kasvutekijöitä ja erilaisia entsyymejä (Lyons ja muut 2020; Sundekilde ja muut 2016). Lapsen ensimmäisen elinkuukauden aikana äidinmaidon koostumus muuttuu suuresti, mutta saavutettuaan lopullisen muotonsa, se säilyy suhteellisen samanlaisena lopun imetysajan.

Äidinmaidon sisältämät ravintoaineet ovat peräisin kolmesta eri lähteestä. Osa maidon ravintoaineista syntetisoidaan äidin rinnan soluissa, osa on peräisin äidin syömästä ravinnosta ja osa äidin kehon ravintovarastoista (Ballard ja Morrow 2013). Äidinmaidon koostumus on yleisesti ottaen hyvin konservoitua, mutta äidin ruokavaliolla on myös tärkeä vaikutus joidenkin vitamiinien ja rasvahappojen erityksessä.

Lipidit ovat äidinmaidossa suurin yksittäinen energianlähde lapselle. 40-55 % maidon sisältämästä energiasta on peräisin lipideistä, jotka erittyvät maitoon 98 % triglyserideinä (Koletzko ja muut 2001). Äidinmaito sisältää myös monia proteiineja, joilla on erilaisia tehtäviä. Osa proteiineista toimii lapsen ravintona, osalla on antimikrobisia ja immuunivastetta muuttavia toimintoja ja osa lisää ja edesauttaa muiden ravintoaineiden imeytymistä (Lönnerdal 2004; Molinari ja muut 2012).

Maidon sisältämistä hiilihydraateista laktoosin pitoisuus on selvästi suurempi suhteessa moniin muihin nisäkäslajeihin. Tämä on yhteydessä ihmisaivojen suurempaan energiankulutukseen (Andreas ja muut 2015). Äidinmaidon hiilihydraateista suuri osa on olikosakkarideja, mutta niiden tehtävä on toimia lapsen suoliston mikrobiflooran ravinnon lähteenä, eikä lapsi itse kykene hyödyntämään niitä ravintona (Coppa ja muut 1993). Rintaruokituilla lapsilla suoliston mikrobiflooran on huomattu olevan vakaampi ja koostuvan pienemmästä määrästä erilaisia mikrobeja, kuin korvikeruokituilla lapsilla. Vaikka rintaruokituilla lapsilla mikrobien kirjo ei ole yhtä laaja, heillä on silti yli kaksi kertaa enemmän bakteerisoluja suolistossa (Bezirtzoglou ja muut 2011).

Pitkäkestoinen imettämien vähentää lapsen riskiä suolistoinfektioille sekä atooppiselle ihottumalle ensimmäisen elinvuoden aikana. Lapsen rintaruokinta vähentää lapsen allergioiden esiintyvyyttä, pienentää riskiä sairastua erilaisiin kroonisiin sairauksiin lapsuusiässä sekä antaa suojan erilaisia infektioita vastaan maidon sisältämien vasta-aineiden kautta (Tapanainen ja muut 2019.)

### 1.2.2 Vasta-aineet

Lapsi altistuu suurelle määrälle erilaisia mikrobeja synnytyksen aikana ja heti sen jälkeen. Kohdussa lapsi on suojassa kaikilta ympäristön mikrobeilta ja antigeeneiltä ja lapsen immuunijärjestelmä kehittykin täysin toimivaksi vasta ensimmäisen elinvuoden aikana. Ennen kuin lapsen oma immuunipuolustus on kehittynyt riittävästi suojataksaan lasta infektioilta, äidin vasta-aineet pyrkivät suojaamaan lasta erilaisilta patogeeneilta. Äidin vasta-aineilla on myös suuri vaikutus lapsen oman immuunijärjestelmän kehityksessä ja säätelyssä.

Äidin vasta-aineita välittyy lapselle sekä istukan että myöhemmin maidon välityksellä. Istukan kautta lapsi saa pääasiassa IgG vasta-aineluokan vasta-aineita, jotka kulkeutuvat suoraan lapsen verenkiertoon (Palmeira ja muut 2012; Simister 2003). Istukan kautta välittyneet vasta-aineet katoavat lapsen ensimmäisen elinvuoden aikana, johtuen IgG vasta-aineiden keskimääräisestä 21:n päivän eliniästä (Mankariou ja muut 1988). Äidinmaidon vasta-aineet eivät kulkeudu lapsen verenkiertoon, mikä on nähtävissä lapsen verenkierron ja äidinmaidon erilaisissa vasta-ainekoostumuksissa. Äidinmaidon vasta-aineiden vaikutus ja tehtävät keskittyvät lapsen limakalvojen immuunipuolustukseen. Maidon vasta-aineet pyrkivät täyttämään lapsen suun ja suoliston limakalvojen pinnat, muodostaen ensimmäisen suojan erilaisia patogeenejä vastaan (Ateyo ja Alter 2021).

Äidinmaito sisältää useita eri immunoglobuliineja, mutta sIgA on suurin äidinmaidossa ilmenevä vasta-aineryhmä. sIgA on vallitseva immunoglobuliinityyppi kudosten limakalvoilla (Lakner ja Brock 1977). sIgA vasta-aineet syntetisoidaan suoraan limakalvoilla ja niiden rakenteesta löytyy ylimääräinen polypeptidiketju, mikä erottaa ne seerumin IgA vasta-aineista. Tämä ylimääräinen rakenne auttaa sIgA vasta-aineita neutraloimaan patogeenejä ennen kuin ne tulevat suoraan kontaktiin epiteelisolujen kanssa, minkä lisäksi rakenne lisää vasta-aineen stabiilisuutta ja estää liiallista tulehdusta ja kudoksen vaurioitumista (Brandtzaeg 2010, 2013; Cerutti ja Rescigno 2008). Limakalvojen sIgA vasta-aineiden uskotaan olevan suurelta osin ei-spesifisiä, eli ne reagoivat ja kiinnittyvät laajaan ryhmään erilaisia mikrobeja (Bunker ja muut 2017).

Äidinmaitoon erittyvät IgA vasta-aineet tuotetaan maitorauhasissa, johon kerääntyy plasmasoluja eripuolilta äidin elimistöä (Halsey ja muut 1983). Äidin suoliston ja hengitystien B-soluja vaeltaa maitorauhasiin, missä B-solujen kemokiinireseptori-10 kiinnittyy maitorauhasten pinnalla esiintyviin kemokiiniligandi-28:aan (Wilson ja Butcher 2004). Äidinmaito sisältää myös vähän sekretorisia IgM, IgM ja IgG vasta-aineita.

Näiden vasta-aineiden tuotto tapahtuu vastaavalla tavalla kuin IgA vasta-aineiden tuotto eli maitorauhaseen kerääntyy valikoitunut joukko IgM ja IgG vasta-aineita tuottavia plasmasoluja. Maitorauhasissa tuotetut vasta-aineet kuljetetaan äidinmaitoon polymeerisen immunoglobuliini reseptorin avulla (Larson ja muut 1980; Matson ja muut 2010.) Kaikkia maitoon erittyviä vasta-aineita ei kuitenkaan tuoteta maitorauhasissa, vaan niitä kuljetetaan myös äidin verenkierrosta (Rio-Aige ja muut 2021).

### **1.2.3 Vasta-aineiden merkitys lapselle**

Lapsen elimistön sIgA tuotanto alkaa vasta useita kuukausia syntymän jälkeen ja saavuttaa aikuisille tavanomaisen tuotantotason vasta lapsen lähestyessä kolmen vuoden ikää (Rognum ja muut 1992; South ja muut 1967). Tämän vuoksi äidinmaito on lapselle ainoa sIgA vasta-aineiden lähden syntymän jälkeisinä kuukausina. IgA vasta-aineluokan vasta-aineet ovat ensisijaisesti mukana limakalvojen immuunipuolustuksessa ja enenevässä määrin tutkimustulokset puoltavat yhteyttä äidinmaidon vasta-aineiden ja äidin suun, suoliston sekä hengitysteiden välillä. Äidinmaito välittää lapsen limakalvoille vasta-aineita niitä mikrobeja vastaan, joita löytyy äidin välittömästä läheisyydestä ja siten ovat myös todennäköisimpiä aiheuttamaan infektoita lapselle (Atyeo ja Alter 2021). sIgA vasta-aineet suojaavat lapsen limakalvoja patogeeneiltä monilla eri mekanismeilla. sIgA vasta-aineet estävät patogeenejä kiinnittymästä epiteelisolujen pintaan, minkä lisäksi ne myös neutraloivat toksiineja ja erilaisia virulenssitekijöitä (Hanson ja Korotkova 2002). Koska sIgA vasta-aineet ovat suhteellisen kestäviä proteolyysiä, eli proteiinien pilkkoutumista vastaan, ne kykenevät suojaamaan lasta erilaisilta patogeeneiltä suun lisäksi myös ruoansulatuskanavassa.

Äidinmaidon vasta-aineet suojaavat lasta erilaisilta infektoilta, mutta niillä on myös tärkeä rooli lapsen suoliston mikrobikannan kehityksessä (Rogier ja muut 2014). Maidon vasta-aineet estävät lapsen kehittyvää immuunipuolustusta synnyttämästä immuunireaktiota suoliston normaalia mikrobikantaa vastaan ja siten edesauttaa suotuisan mikrobiflooran muodostumisessa suolistoon. Äidinmaidon vasta-aineita pidetään myös tärkeinä erilaisten allergioiden kehittymisen estämisessä. Samalla kun äidinmaidon sIgA vasta-aineet pyrkivät estämään immuunivasteen syntymistä suoliston normaaliflooraa vastaan, maidon muut vasta-aineet pyrkivät kiinnittymään erilaisiin allergeeneihin. Kiinnittyminen ensisijaisesti estää allergeenien pääsyn limakalvon

epiteelisolujen läpi verenkiertoon, mikä auttaa rajoittamaan allergeenien aiheuttamaa immuunivastetta ja tulehdusta (Athey ja Alter 2021).

IgA vasta-aineiden arvellaan ensisijaisesti yrittävän vähentää ja rajoittaa antigeenien kulkeutumista epiteelisolujen läpi. Sen sijaan äidinmaidon IgG vasta-aineet auttavat allergeenien kuljetuksessa epiteelisolujen läpi IgG-allergeenikomplekseina. Nämä kompleksit auttavat allergeenien esittelyssä immuunipuolustukselle. Säädellyn antigeenien kuljetuksen ja esittelyn tarkoitus on estää immuunipuolustuksen ylikuormittuminen sen kehitysvaiheessa ja yliherkkyyksien syntymisen (Mosconi ja muut 2010.) IgA-luokan vasta-aineita on äidinmaidossa huomattavasti enemmän kuin IgG-luokan. IgA ja IgG vasta-aineet ohjailevat immuunipuolustuksen kehittymistä ehkäisemällä liian suurta antigeenialtistusta, mutta samalla varmistamalla, että lapsen immuunipuolustus pääsee riittävästi kosketuksiin erilaisten antigeenien kanssa.

Tällä hetkellä on olemassa useita tutkimustuloksia, joiden mukaan istukan kautta kulkeutuneet äidin vasta-aineet voivat rajoittaa imeväisikäisen lapsen rokotevastetta kiinnittymällä rokotteen sisältämiin antigeeneihin ja neutraloimalla immuunivasteen synnyn (Jones ja muut 2014; Osterhaus ja muut 1998; Tang ja muut 2019). Äidin vasta-aineet suojaavat lasta erilaisilta infektioilta, mutta sekä istukan että äidinmaidon kautta siirtyvät vasta-aineet voivat myös estää lapsen oman immuunivasteen syntyä (Athey ja Alter 2021; Yang ja muut 2019). Tämä on hyvä huomioida imeväisikäisten lasten rokotesuunnitelmissa. Aiheesta tarvitaan kuitenkin vielä lisää tutkimusta, ennen kuin äidin vasta-aineiden vaikutuksesta rokotevasteisiin vastasyntyneillä tiedetään tarpeeksi.

## **1.3 Ihmisen papilloomavirus**

### **1.3.1 HPV-virukset**

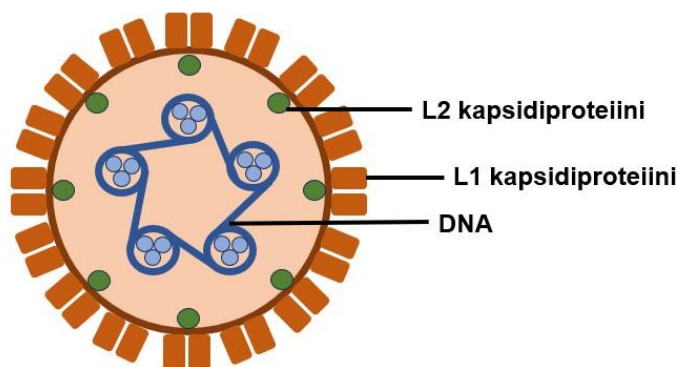
Ihmisen papilloomavirukset (engl. **human papilloma virus**, HPV) ovat yleisiä limakalvo- ja ihoinfektioita aiheuttavia DNA-virusia (kuva 1). Erilaisia HPV-virusia tunnetaan satoja erilaista, mutta noin 40 HPV-tyyppiä infektoi genitaalialueen limakalvoja. Arviolta noin 80 % ihmisistä saa jossakin elämänsä vaiheessa HPV-tartunnan (Giuliano ja muut 2015; Koskimaa ja muut 2012). HPV-virukset voidaan jakaa suuren ja pienen riskin HPV-tyyppeihin niihin liittyvän syöpäriskin mukaan. HPV-infektioiden yleisin oire on syylien muodostuminen, mutta suurin osa infektioista on oireettomia ja ne paranevat spontaanisti. Joissakin tapauksissa HPV-infektio voi myös kroonistua. Kroonistuneella

suuren riskin HPV-infektiolla, esimerkiksi HPV16:sta, on vahva yhteys erilaisten syöpien, kuten kohdunkaulansyövän syntyyn. Suuren riskin HPV-infektiot aiheuttavat melkein 100 % kaikista kohdunkaulansyöpätapauksista, minkä lisäksi ne ovat osallisina 25-100 % muissa genitaalialueen syövässä, kuten peräaukon, peniksen ja emättimen syövässä sekä noin 40-70 % pään- ja kaulanalueensyövässä (de Martel ja muut 2020; Sabatini ja Chiocca 2020).

Limakalvoja infektioivat, erityisesti genitaalialueen infektoivia aiheuttavat HPV-virukset, tarttuvat useimmiten sukupuoliteitse, mutta viruksella on myös olemassa muita tartuntareittejä. Esimerkiksi lapsi voi saada tartunnan vertikaalisesti suoraan äidiltään synnytyksen yhteydessä. Tartunta voi myös tapahtua myöhemmin lapsen varhaislapsuuden aikana useiden eri reittien kautta (Syrjänen ja muut 2010). Niin aikuisilla kuin lapsillakin limakalvoja infektioivat HPV-virukset kykenevät infektoimaan sekä genitaalialueen että suun limakalvoja.

Kaikki papilloomavirukset ovat vaipattomia, kaksijuosteisia DNA-viruksia, joiden genomi on kooltaan noin 8 000 bp ja sisältää noin kahdeksan avointa lukukehystä (engl. **open reading frame**, ORF). HPV-viruksen genomi koodaa proteiineja E1-7 (engl. **Early protein**), jotka osallistuvat viruksen replikaatioon ja vaikuttavat suuren riskin HPV-viruksilla niiden karsinogeenisyyteen. Suuren riskin HPV-viruksien E6 ja E7 proteiinit ovat onkogeenisia proteiineja, jotka edesauttavat kasvainten ja syövän syntyä lisäämällä isäntäsolun p53 ja pRb proteiinien hajottamista. Nämä kaksi proteiinia ovat välttämättömiä solusyklin ja -jakautumisen säätelyssä (Munger ja muut 2004; Roman ja Munger 2013.) Lisäksi E6 ja E7 heikentävät isäntäsolun genomien stabiilisuutta (Bester ja muut 2011; Kadaja ja muut 2009; Spriggs ja Laimins 2017).

HPV-viruksien kapsidi koostuu kahdesta rakenneproteiinista, L1 (engl. **Late protein 1**, 55 kDa) ja L2 (engl. **Late protein 2**, 70 kDa) (Humans 2007) (kuva 1). L1 proteiini on HPV-virusten genomissa konservoiduin geeni, minkä vuoksi sitä käytetään eri HPV-tyyppien tunnistamiseen ja erotteluun. L1 proteiini kattaa noin 80 % kapsidin rakenteesta ja se järjestäytyy spontaanisti ilman ulkopuolista apua HPV-viruksen luonnollista ulkorakennetta muistuttavaksi rakenteeksi. Tämä HPV-viruksen kapsidin rakenne on välttämätön viruksen kiinnittymisessä ja tunkeutumisessa isäntäsoluun (Buck ja muut 2013). Kapsidin rakenne on myös hyvin immunogeeninen, minkä vuoksi se soveltuu hyvin käytettäväksi HPV-rokotteissa immuunivasteen aikaansaamiseksi joko yksin tai yhdessä L2 proteiinin kanssa (Kirnbauer ja muut 1992).



Kuva 1: HPV-viruksen rakenne. HPV-virukset ovat vaipattomia DNA-virusia, joiden kapsidi koostuu L1 ja L2 kapsidiproteiineista.

### 1.3.2 HPV16

HPV16-viruksen genomi on kooltaan noin 7 900 bp ja se sisältää kahdeksan eri proteiinia koodaavaa geeniä; L1, L2, E1, E2, E4, E5, E6 ja E7 (Cornet ja muut 2012; Smith ja muut 2011; Yu ja muut 2022). E6 ja E7 ovat pääasialliset syövän syntyä edistävät proteiinit ja niiden ilmeneminen on suurta kasvaimissa (Cornet ja muut 2012).

HPV16 ja 18 ovat suuren riskin HPV-virusia, jotka aiheuttavat noin 70 % kaikista kohdunkaulansyöpätapauksista (Muñoz ja muut 2003). Näistä kahdesta HPV16 on tämänhetkisen tiedon mukaan HPV-virusista eniten syöpää aiheuttava. Se on yleisin kohdunkaulansyöpään liitetty HPV-tyyppi, mutta sen on todettu olevan läsnä myös pään-, kaulan- ja genitaalialueen syövässä.

Kaikki tällä hetkellä kehitetyt ja käytössä olevat HPV-rokotteet kohdistuvat HPV16:ta vastaan. HPV-rokotteet sisältävät vaihtelevasti myös muita HPV-tyyppejä. Suomessa kansalliseen rokotusohjelmaan kuuluu HPV-rokote, joka kohdistuu HPV-tyyppeihin 16 ja 18 (Tiitinen 2022). Rokotusohjelmassa HPV-rokote ohjeistetaan annettavaksi 10-12 vuotiaille lapsille parhaan rokotevasteen saamiseksi. Rokotteen tarkoitus on ennaltaehkäistä syövän ja sen esiasteiden kehittymistä. Koska suuren riskin HPV-virukset 16 ja 18 ovat suurimmaksi osaksi sukupuolivälitteisesti infektioivia virusia, rokotukset on suunnattu aloitettavaksi ennen sukupuolielämän aloittamista ja mahdollista HPV altistusta. Rokotteen antama suoja on sitä parempi, mitä nuorempana rokotteeseen saa. Rokotteelle ei ole yläikärajaa ja sen voi antaa, vaikka henkilö olisi jo aloittanut sukupuolielämän. Rokotteen hyöty kuitenkin heikkenee huomattavasti, mitä vanhempana sen ottaa. Yli 30-vuotiaille rokotteesta ei useinkaan ole enää suurta hyötyä, sillä suurin osa HPV-infektioista sairastetaan 20-30 vuoden iässä.



### 1.3.3 Lapsen infektio

HPV-infektioiden esiintyvyys lapsilla on melko yleisiä. HPV voi liikkua perheen sisäisesti, minkä lisäksi lapsen ensimmäinen kosketus viruksen kanssa tapahtuu usein lapsen syntymän aikana. Vastasyntyneen HPV-infektion etenemisestä tai sen kroonistumiseen liittyvistä mekanismeista ei vielä ole tarkkaa tietoa. Lapsilla HPV-infektio on kuitenkin yleisintä ja erilaisten HPV-tyyppien esiintyvyys laajinta heti syntymän jälkeen lapsen suun limakalvoilla (Syrjänen ja muut 2021). Lapsen syntymätavalla ei ole todettu olevan vaikutusta lapsen suun HPV-statukseen tai infektion kehitykseen varhaislapsuuden aikana. Suurin osa lasten HPV-infektioista katoaa kuuden ensimmäisen elinvuoden aikana.

HPV16 on yksi yleisimmistä lapsen suun HPV-tyypeistä. Muita usein ilmeneviä HPV-tyyppejä ovat HPV6, -18, -31 ja -33 (Castellsagué ja muut 2009; Syrjänen ja muut 2021). Koska äiti on todennäköisin HPV-infektion tartuttaja lapselle, äidin rokottaminen yleisimpiä HPV-tyyppejä vastaan voi osoittautua tärkeäksi tekijäksi, kun pyritään ehkäisemään kroonisen HPV-infektion kehittymistä varhaislapsuudessa. Äidin vasta-aineet voivat suojata vastasyntyntä tai pientä lasta HPV-infektioilta ja niiden kroonistumiselta (Syrjänen ja muut 2021). Lapsi saa IgG-luokan vasta-aineita HPV6, -11, -16, -18 ja -45 tyyppejä vastaan äidiltään vertikaalisesti istukan kautta. Äidin ja vastasyntyneen lapsen IgG HPV-vasta-aineiden vastaavuudet seerumeissa on todettu hyvin samanlaisiksi lapsen kuuden ensimmäisen elinkuukauden aikana, mutta 80 % näistä vasta-aineista katoaa lapsen seerumista ensimmäisen elinvuoden aikana (Syrjänen ja muut 2022; Zahreddine ja muut 2020.)

Tähänastisten tutkimusten perusteella, äidin HPV-infektion tarttuminen lapselle raskauden tai synnytyksen aikana on mahdollista, mutta melko harvinaista äidin HPV-positiivisuudesta huolimatta. Tämän lisäksi suurin osa vastasyntyneiden HPV-infektioista katoaa ensimmäisen kuuden elinkuukauden aikana (Khayargoli ja muut 2023). Äidin HPV-statuksella on havaittu kuitenkin olevan yhteys lapsen infektioiden todennäköisyyteen. HPV-positiivisten äitien lapsilla on noin 33 % suurempi todennäköisyys olla HPV-positiivisia kuin lapsilla, joiden äiti on HPV-negatiivinen. Tämä todennäköisyyden on todettu olevan vielä korkeampi, noin 45 %, kun tarkastellaan vain suuren riskin HPV-infektioita (Merckx ja muut 2013.)

Aikaisemmissa tutkimuksissa on todettu lapsen serokonversion, eli lapsen omien vasta-aineiden syntymisen HPV:n L1 proteiinille olevan mahdollista jo varhaislapsuudessa ennen kuin lapsi saavuttaa kolmen vuoden iän (af Geijersstam ja

muut 1999; Manns ja muut 1999; Marais ja muut 2007; Stina Syrjänen ja muut 2022). Lapsen serokonversio merkitsee varhaista altistumista HPV:lle ja immuunivasteen syntyä. Serokonversiota on todettu tapahtuvan HPV-tyypeille 6, 11, 16 ja 18 lapsilla, jotka ovat syntyneet serologisesti HPV-negatiivisille äideille (Syrjänen ja muut 2022).

#### **1.3.4 Tartuntareitit perheessä**

Vaikka HPV:n on yleisesti ajateltu olevan seksuaalisesti leviävä virus, useat tutkimukset ovat jo jonkin aikaa puoltaneet myös muita tartuntatapoja ja reittejä. Lapsilla melko yleisesti esiintyvät HPV-infektiot tukevat näitä vähemmän tutkittuja tartuntareittejä. Lapselle yleisimpänä HPV-infektion tartuntatapana pidetään vertikaalista tartuntaa. Lapsi on syntymän aikana kosketuksissa äidin genitaalialueen mikrobien kanssa ja tämä on todennäköisin ja yleisin HPV-infektion lähde vastasyntyneille lapsille. Lapsi voi kuitenkin saada HPV-infektion myös myöhemmin varhaislapsuuden aikana horisontaalisena tartuntana joko vanhemmilta tai muilta häntä hoitavilta ihmisiltä, joiden kanssa lapsi on läheisessä tai jatkuvassa kontaktissa. Horisontaalisen eli hengitysilman, ruuan tai fyysisen kontaktin kautta saadun virustartunnan lisäksi HPV voi tarttua saman henkilön yhdestä ruumiinosasta toiseen tai epäsuorasti jonkin kosketuspinnan kautta (Syrjänen ja Puranen 2000).

HPV:n DNA:ta on löydetty siemennesteestä ja siittiöistä, mikä viittaa mahdolliseen HPV-viruksen tartuntareittiin infektoituneiden munasolujen tai siittiöiden kautta (Laprise ja muut 2014). Aikaisempien tutkimusten pohjalta tiedetään myös, että istukka ei ole steriili ympäristö. Istukasta on löydetty HPV-viruksen lisäksi monia muitakin viruksia sekä erilaisia bakteereja. Nämä tulokset lisäävät äidiltä vertikaalisesti saadun infektion mahdollisuutta (Aagaard ja muut 2014; Rombaldi ja muut 2009.)

Lapsen ja äidin HPV-tyyppien vastaavuus on noin 57-69 %. Lapsen HPV-infektiot voivat siis olla peräisin muualtakin kuin äidiltä (Syrjänen ja Puranen 2000). Äidin pitkittyneen suuren riskin HPV-infektion genitaalialueella on huomattu olevan riskitekijä lapsen suun HPV-infektioille, kun taas äidin suun suuren riskin HPV-infektio on riskitekijä lapsen genitaalialueen HPV-infektioille kuuden kuukauden päästä lapsen syntymästä. Lapsen suuren riskin HPV-infektion kroonistumiselle kuuden kuukauden ikä on merkittävä aikapiste, jossa infektio yleensä joko häviää tai jää pysyväksi (Rintala ja muut 2005.)

Erilaisten virusten erittymistä äidinmaitoon on havaittu tutkimuksissa aikaisemmin ja myös HPV-viruksen erittymistä tapahtuu noin 2,5-28,8 % äideistä (Sarkola ja muut

2008). Vaikka HPV-viruksen tiedetään infektoivan lapsen suun limakalvoja, viruksen läsnäololle maidossa ei ole löydetty yhteyttä lapsen suun HPV-statusen kanssa (Louvanto ja muut 2017; Tuominen ja muut 2018). Äidinmaidon HPV-status ei myöskään näytä korreloivan äidin suu- tai genitaalialueen HPV-statusen kanssa (Sarkola ja muut 2008).

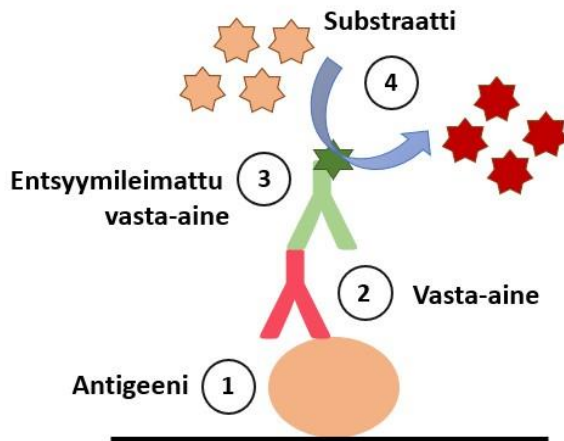
## 1.4 ELISA-määritys

ELISA-määritys on immunologinen menetelmä, joka pohjautuu antigeenin ja vasta-aineen keskinäisiin vuorovaikutuksiin. ELISA-määrityksestä on olemassa useita eri variaatioita, mutta tässä työssä keskitymme ainoastaan kerros-ELISA (engl. sandwich ELISA) menetelmään. Menetelmässä pyritään värvaihtoreaktion kautta selvittämään antigeenin tai sitä vastaavan vasta-aineen pitoisuus biologisessa nesteessä. Kerros-ELISA-määrityksissä toista reaktioon osallistuvista komponenteista käytetään kiinteän faasin, esimerkiksi kuoppalevyn kuopan päällystämässä (kuva 2). Jos tutkittavasta näytteestä halutaan määrittää tietyn vasta-aineen pitoisuus, kiinteä faasi päällystetään vasta-ainetta vastaavalla antigeenillä. Vasta-aineen sisältämää näytettä lisätään kiinteän faasin päälle ja vasta-aineiden annetaan kiinnittyä kiinteää faasia päällystäviin antigeeneihin, minkä jälkeen ylimääräiset vasta-aineet ja näytteen sisältämät muut komponentit pestään pois. Tämän jälkeen kiinteän faasin päälle lisätään tutkittavalle vasta-aineelle spesifistä entsyymileimattua vasta-ainetta, joka kiinnittyy näytteen sisältämiin vasta-aineisiin muodostaen kerroskompleksin (kuva 2). Ylimääräiset entsyymileimatut vasta-aineet pestään pois, minkä jälkeen kiinteän faasin päälle lisätään vielä entsyymileimatun vasta-aineen entsyymin substraattia. Entsyymi aikaansaa substraatin värvaihtoreaktion, jonka intensiteetin avulla alkuperäisen näytteen vasta-ainepitoisuus voidaan määrittää (Alhajj ja muut 2024.)

Vasta-aineet ovat erittäin spesifejä kiinnittymään niitä vastaaviin antigeeneihin. Tämän vuoksi vasta-ainemääritykset ovat tarkkoja selvittämään myös matalan konsentraation molekyylien pitoisuuksia näytteistä. Toisin sanoen, kun meillä on antigeeni, jonka tiedämme olevan spesifinen tietylle aineelle, voimme tunnistaa sitä vastaavan vasta-aineen tyypin ja määrän ja kun meillä on vasta-aine, voimme selvittää sitä vastaavan antigeenin ja sen määrän käyttäen ELISA-menetelmää (Aydin 2015.)

ELISA-määrityksen etuja ovat sen yksinkertainen toimintaperiaate, korkea tarkkuus ja herkkyys, näytteiden vähäisen esikäsittelyn tarve sekä käyttäjäturvalliset, ympäristöystävälliset ja matalakustanteiset reagenssit. Menetelmän huonoja puolia

puolestaan ovat kalliit vasta-aineet, joko tilattuina tai itse valmistettuina solukasvatuksilla, väärin positiivisten tai negatiivisten tulosten suuri mahdollisuus epätäydellisen kiinteän faasin päällystykseen tai blokkauksen vuoksi sekä vasta-aineen epästabiiliisuus (Sakamoto ja muut 2018.)



Kuva 2: Kerros-ELISA-määrityksen toimintaperiaate. 1. Kiinteä faasi päällystetään ennalta määrätetyllä pitoisuudella antigeeniä. 2. Tutkittavan näytteen sisältämät vasta-aineet kiinnittyvät niitä vastaaviin antigeeneihin. 3. Entsyymileimattu vasta-aine kiinnittyy tutkittaviin vasta-aineisiin. 4. Entsyymi aikaansaa substraatin värienvaihtoreaktion.

## 1.5 Työn tavoitteet

Tämä tutkimus on osa Turun Yliopiston ja TYKS:n HUPA-seurantatutkimusta, jossa on seurattu HPV-infektion taudinkulkua, tartuntaa ja immuniteettiä 329 perheessä vuodesta 1998 lähtien. Lapsia tutkimuksessa on ollut mukana 331 ja heitä seurattiin vastasyntyneestä 6-vuotiaaksi.

Tässä tutkimuksessa analysoimme 101 äidin äidinmaitonäytteitä. Näytteet oli kerätty kaksi kuukautta lapsen syntymän jälkeen. Työn tavoitteet olivat:

- 1) Totaali IgA ELISA määrityksen olosuhteiden optimointi äidinmaidolle sopivaksi.
- 2) Spesifisen ELISA määrityksen pystytys ja optimointi äidinmaidon HPV16 vasta-aineille.
- 3) Maidon sisältämien vasta-aineiden vaikutuksen selvittäminen lapsen HPV-infektion kehitykseen lapsen kuuden ensimmäisen elinvuoden aikana.

## 2 Materiaalit ja menetelmät

### 2.1 Äidinmaitonäytteiden valmistus määrittäjänsä varten

Työssä analysoidut äidinmaitonäytteet ovat osa TY:n Hammaslääketieteen laitoksen ja TYKS:n Naistentautien yhteistä HPV-infektion luonnollista taudinkulkua selvittävää pitkittäistutkimusta. Tutkimussuunnitelmalle on myönnetty TYKS:n eettisen toimikunnan hyväksyntä (#3/1998) myöhemmillä muutoksilla (#2/2006 ja 45/180/2010). Tutkimukseen osallistuneilta vanhemmilta on kerätty kirjalliset suostumukset tutkimukseen osallistumisesta.

Analysoidut maitonäytteet (n=101) oli kerätty 2 kk lapsen syntymän jälkeen. Näytteitä säilytettiin - 70 °C pakastimessa. Ennen vasta-ainemäärittäjänsä näytteistä poistettiin rasva sentrifugoimalla näytteitä 3 000 g x 15 min, + 4°C. Sentrifugoinnin jälkeen supernatantti otettiin talteen pinnalle muodostuneen rasvakerroksen alta käyttäen neulaa ja ruiskua. Putken pohjalle muodostunut pieni pelletti jätettiin putkeen. Sentrifugointi toistettiin ja supernatantti pipetoitiin uuteen putkeen rasvakerroksen alta. Näytteet säilöttiin - 70 °C pakastimeen.

### 2.2 Totaali IgA vasta-ainemäärittäjänsä optimoiminen

Pohjana äidinmaidon totaali IgA määrittäjänsä käytettiin TY:n Hammaslääketieteen laitoksella aikaisemmin syljelle käytettyä totaali IgA ELISA-määrittäjänsä (engl. enzyme-linked immunosorbent assay)(Lehtonen ja muut 1984), joka perustuu kerros-ELISA menetelmään. Määrittäjänsä lähdettiin optimoimaan äidinmaidolle sopivaksi tutustumalla kirjallisuuteen ja aikaisempiin tutkimuksiin äidinmaidon totaali IgA:n määrästä ja vasta-ainemäärittäjänsä (Czosnykowska-Łukacka ja muut 2020; Demers-Mathieu ja muut 2019; Rio-Aige ja muut 2021; Valcarce ja muut 2021).

Optimoinnit suoritettiin käyttämällä kolmen äidin 2 kk maitonäytteitä. Määrittäjänsä suoritettiin jokaiselle näytteelle kolmena rinnakkaisena määrittäjänsä.

Määrittäjänsä käytettiin TY:n Hammaslääketieteen laitoksen ohjeen mukaista standardisuoraa. Standardilaimennokset valmistettiin seitsemänä eri laimennoksena välillä 4,54-68,1 ng/ml käyttäen Human Serum Protein Calibrator –reagenssia (Dako 0908). Sekä standardit, että näytteet laimennettiin BSA-liuokseen (Bovine serum albumin, 1 %, Sigma A-4503; PBS, pH 7.4). Määrittäjänsä taustana kuoppiin pipetoitiin pelkkää BSA-liuosta.

### 2.2.1 Kuoppalevyjen valmistus

Totaali IgA määrittämiä varten valmistettiin 96-kuoppalevyjä päällystämällä ne 1:1000 Rabbit antihuman IgA:lla (Polyclonal Rabbit Anti-Human IgA, Dako Denmark A/S, REF A0092) laimennettuna natriumkarbonaattipuskuriin (0,05 M, pH 9.2). Levyjä inkuboitettiin yön yli + 4°C. Levyt pestiin 3 x PBST-liuoksella (engl. Phosphate buffered saline, pH 7.4, johon oli lisätty 0,05 % Tween20). Kuoppiin lisättiin BSA-liuosta, minkä jälkeen levyjä inkuboitettiin tunti + 37°C lämpökaapissa. Inkubaation jälkeen levyjä säilytettiin + 4°C.

### 2.2.2 Ensimmäinen määrittäminen, maitonäytteiden laimentaminen

Aiempaan kirjallisuuteen pohjaten (Akhter ja muut 2020; Czosnykowska-Lukacka ja muut 2020; Ongprasert ja muut 2020; Rio-Aige ja muut 2021; Weaver ja muut 1998) äidinmaitonäytteistä valmistettiin määrittämiä varten kolme eri laimennosta: 1:10 000, 1:50 000 ja 1:100 000.

Kuoppalevy pestiin 3 x PBST-liuoksella. Kuoppiin lisättiin kontrolli, standardit ja laimennetut näytteet, minkä jälkeen levyä inkuboitettiin kaksi tuntia huoneenlämmössä. Kuopat pestiin kuten aikaisemmin, minkä jälkeen niihin lisättiin peroksidaasikonjugaattia (Anti-IgA, Polyclonal Rabbit Anti-Human IgA/HRP, REF P0216) 1:5000 laimennoksena PBS-liuoksessa. Levyä inkuboitettiin tunti huoneenlämmössä. Levy pestiin kuten aikaisemmin. Kuoppiin lisättiin phenylendiamiinia (0,4 mg/ml, Sigma-Aldrich, O-Phenylenediamine dihydrochloride) laimennettuna fosfaatti-sitraattipuskuriin (0,1 M, pH 5.0), johon oli lisätty H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,002 %). Levyä inkuboitettiin 15 min huoneenlämmössä. Reaktio keskeytettiin lisäämällä kaivoihin HCl-liuosta (2,0 M).

Näytteiden absorbanssit mitattiin 495 nm käyttäen Multiskan (Thermo Scientific) laitetta.

Standardilaimennosten absorbansseista valmistettiin standardisuora käyttämällä Multiskan-laitteen ohjelmaa ja 4PL-yhtälöä (Four-Parameter Logistic curve fit). Näytteiden totaali IgA pitoisuudet määritettiin käyttäen standardisuoran yhtälöä.

### **2.2.3 Toinen määrittely, inkubaatio-olosuhteiden optimointi**

Määrittelyä varten näytteistä valmistettiin kolme eri laimennosta: 1:5 000, 1:10 000 ja 1:20 000. Näytteet valmistettiin kolmea levyä varten, joista jokaisella käytettiin erilaista inkubaatioaika ja -lämpötila yhdistelmää näytelaimennosten lisäyksen jälkeisessä inkubaatiossa.

1. levyn määrittely suoritettiin kokonaan samalla tavalla kuin kohdassa 2.2.2 eli levyä inkuboitettiin huoneenlämmössä kaksi tuntia. 2. levy vietiin inkuboitumaan + 37 °C lämpökaappiin kahdeksi tunniksi. 3. levyä inkuboitettiin yön yli + 4 °C.

Määrittelyt suoritettiin loppuun samalla tavalla kuin kohdassa 2.2.2.

### **2.2.4 Kolmas määrittely, laimennosten optimointi ja näytteiden säilyvyyden testaus**

Määrittelyä varten näytteistä valmistettiin 1:15 000 ja 1:30 000 laimennokset. Tässä tutkimuksessa valmistettujen äidinmaitonäytteiden lisäksi laimennokset valmistettiin myös näytteistä, joista oli jo aikaisemmissa tutkimuksissa poistettu rasva. Maitonäytteiden supernatantteja oli käytetty maidon DNA määrittelyissä ja niitä oli säilytetty määrittelyjen jälkeen - 70 °C pakastimessa.

Määrittely suoritettiin samalla tavalla kuin kohdassa 2.2.2.

## **2.3 Totaali IgA vasta-ainemäärittelyt**

Äidinmaitonäytteiden totaali IgA vasta-ainemäärien selvittämiseksi näytteistä valmistettiin 1:15 000 ja 1:30 000 laimennokset BSA-liuokseen kolmena rinnakkaisena. Määrittelyt suoritettiin TY:n Hammaslääketieteen laitoksen syljelle käytetyn totaali IgA ELISA-määrittelyohjeen mukaisesti (2.2.2 ensimmäinen määrittely).

## 2.4 HPV16 spesifisen vasta-ainemäärityksen optimointi

### 2.4.1 96-kuoppalevyn päällystys antigeenillä ja maitonäytteiden laimentaminen

Määrittystä lähdettiin pystyttämään tutustumalla kirjallisuuteen ja aikaisempiin tutkimuksiin (Juncker ja muut 2021; Labayo ja muut 2020; Lechosa-Muñiz ja muut 2021; Longueira ja muut 2022; Studentsov ja muut 2002; van Keulen ja muut 2021). Optimointivaiheeseen valittiin äidinmaitonäytteitä sekä HPV16-negatiivisilta, että HPV16-positiivisilta luovuttajilta. Valinnat tehtiin maidon HPV16 DNA:n ja seerumin HPV-statuksen mukaan.

96-kuoppalevyjen päällystys optimointi aloitettiin päällystämällä kaksi 96-kuoppalevyä kolmella eri antigeenipitoisuudella: 0,25; 0,5 ja 1,0 µg/ml (taulukko 1). Antigeeninä käytettiin HPV16L1 proteiinia (MBS144115, Recombinant Human Papillomavirus 16, MyBioSource) ja laimennokset valmistettiin PBS-liuokseen (pH 7.4). Osa levyn kupista jätettiin päällystämättä. Levyt vietiin inkuboitumaan yön yli + 4 °C kylmähuoneeseen.

Levyt pestiin 5 x PBST-liuoksella (pH 7.4). Kuopissa jäljellä ollut vapaa kiinnittymispinta peitettiin, eli blokattiin, lisäämällä kuoppiin maito (5 %, rasvaton maitojauhe, Valio) /PBS (pH 7.4) -puskuria. Levyjä inkuboitiin tunti huoneenlämmössä. Levyt pestiin kuten edellä, minkä jälkeen toisen levyn kuoppiin lisättiin kolmen näytteen laimennokset valmistettuna PBS-liuokseen kolmena eri laimennoksena: laimentamaton; 1:3 ja 1:9. Taustan mittaamiseksi kuoppiin pipetoitiin BSA-liuosta näytteen sijaan. Toinen levy toimii päällystyskontrollina ja sen kuoppiin lisättiin HPV16 L1 vasta-ainetta (CAMVIR-1, sc-47699, mouse monoclonal IgG<sub>2a</sub>, Santa Cruz Biotechnology) laimennettuna PBS-liuokseen 1:2000 kahtena rinnakkaisena. Molempia levyjä inkuboitiin huoneenlämmössä kaksi tuntia.

Levyt pestiin kuten edellä, minkä jälkeen näytekuppiin lisättiin anti-IgA reagenssia (Rabbit anti-Human IgA, Dako P0216) laimennettuna 1:3000 PBS-liuokseen. Kontrollilevyn kuoppiin lisättiin anti-mouse sekundäärivasta-ainetta (Jackson's lab, anti-mouse secondary antibody) 1:2000 laimennoksena laimennettuna PBS-liuokseen. Levyjä inkuboitiin tunti huoneenlämmössä.

Levyt pestiin kuten edellä. Levyjen kuoppiin lisättiin phenylendiamiinia (0,4 mg/ml) fosfaatti-sitraattipuskurissa (0,1 M, pH 5.0), johon oli lisättyä H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,002 %). Näytelevyä inkuboitiin 15 minuuttia ja kontrollilevyä 10 minuuttia huoneenlämmössä.



Reaktio pysäytettiin lisäämällä kuoppiin HCl-liuosta (2,0 M). Näytteiden absorbanssit mitattiin 495 nm käyttäen Multiskan-laitetta.

#### **2.4.2 Blokkaustrupkurien vertailu ja näytteiden inkubointiaika**

Kaksi kuoppalevyä päällystettiin samalla tavalla kuin kohdassa 2.4.1. Määritystä jatkettiin kohdan 2.4.1 mukaisesti, lukuun ottamatta kuoppien blokkausta, mikä suoritettiin toisella levyllä käyttäen maito/PBS-puskuria ja toisella BSA (3 %)/PBS (pH 7.4) –puskuria (taulukko 1). Viidestä äidinmaitonäytteestä valmistettiin molemmille levyille laimentamaton ja 1:3 laimennokset määritystä varten. Edellisestä määrityksestä poiketen, näytteitä inkuboitettiin kuopissa yön yli + 4 °C. Määritys suoritettiin loppuun samalla tavalla kuin kohdassa 2.4.1, mutta phenylendiamiinin lisäyksen jälkeen värin annettiin kehittyä 30 minuuttia ennen reaktion pysäyttämistä.

#### **2.4.3 Pesujen optimointi ja näytteiden sakkaamisen estäminen**

Kuoppalevy valmistettiin kohdan 2.4.1 mukaisesti käyttäen antigeenipitoisuuksia 0,5 ja 1,0 µg/ml. Kuopat blokattiin käyttämällä BSA/PBS-puskuria. Määritystä jatkettiin kohdan 2.4.1 mukaan, mutta näytteistä valmistettiin laimentamaton ja 1:3 laimennokset ja näytteitä inkuboitettiin yön yli + 4 °C. Näytteiden yön yli inkubaation jälkeisessä pesuvaiheessa levy vietiin ravistelijaan kahdeksi minuutiksi pesujen välillä (taulukko 1) ja phenylendiamiinin lisäyksen jälkeen värin annettiin kehittyä 30 minuuttia ennen reaktion pysäyttämistä.

#### **2.4.4 Äidinmaitonäytteiden tausta**

Tätä määritystä varten kuoppalevyä ei päällystetty antigeenillä, vaan määritys aloitettiin pesemällä levy 5 x PBST-liuoksella (pH 7.4). Puolet levyn kuopista blokattiin käyttämällä BSA/PBS (pH 6.8) -puskuria ja loput käyttämällä BSA/PBST (pH 6.8) –puskuria (taulukko 1). Levyä inkuboitettiin tunti huoneenlämmössä, minkä jälkeen levy pestiin 5 x PBST-liuoksella (pH 6.8). Kaikki pesut suoritettiin tällä liuoksella tästä eteenpäin.

Äidinmaitonäytteistä valmistettiin 1:2 laimennokset kahtena rinnakkaisena. Laimennokset valmistettiin molempiin blokkaustrupkureihin. Levy vietiin inkuboitumaan yön yli + 4 °C. Levy pestiin kuten edellä, mutta pesujen välissä levy vietiin kahdeksi

minuutiksi ravistelijaan. Näytekuoppiin lisättiin anti-IgA reagenssia laimennettuna blokkaukspuskureihin 1:3000 laimennoksena. Levyä inkuboitii tunti huoneenlämmössä. Levy pestiin kuten edellä ilman ravisteluja. Kuoppiin lisättiin phenylendiamiinia fosfaattisitraattipuskurissa, johon oli lisättyä H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Levyä inkuboitii huoneenlämmössä 30 minuuttia, minkä jälkeen reaktio pysäytettiin lisäämällä kuoppiin HCl-liuosta. Näytteiden absorbanssit mitattiin 492 nm käyttäen Multiskan-laitetta.

#### **2.4.5 Blokkaukspukurin vaikutus näytteiden vasteisiin eri pöällystypitoisuuksilla**

Kuoppalevy pöällystettiin antigeenipitoisuuksilla 0,5 ja 1,0. Määritys suoritettiin kohdan 2.4.4 mukaisesti. Kuoppien blokkauksessa käytettiin BSA/PBST (pH 6.8) -puskuria. Näytteet lisättiin kuoppiin laimentamattomina ja 1:3 laimennoksina. Yhdestä maitonäytteestä valmistettiin ylimääräiset laimennokset, joiden näytekuoppiin ei lisätty anti-IgA reagenssia vaan pelkästään blokkaukspuskuria.

#### **2.4.6 HPV16L1 rekombinanttiproteiinien vertailu kuoppalevyn pöällystyksessä**

Kuoppalevy pöällystyksessä antigeeninä käytettiin kahta eri HPV16L1 rekombinanttiproteiinia. Toinen rekombinanttiproteiini oli edellisissä määrityksissä käytetty MyBioSource antigeeni ja toinen Recombinant HPV16 L1 protein (ab119880, Abcam). Antigeeneistä käytettiin 1,0 µg/ml pitoisuutta kuoppalevyn pöällystämisesssä ja laimennokset valmistettiin PBS-liuokseen (pH 7.4). Levyn kuopista osa jätettiin pöällystämättä ja näihin kuoppiin lisättiin pelkästään PBS-liuosta.

Määritys suoritettiin loppuun samalla tavalla kuin kohdassa 2.4.4, mutta blokkaukspukurina käytettiin BSA/PBST-puskuria.

#### **2.4.7 HPV16L1 rekombinanttiproteiinin toimivuuden varmistaminen eri pöällystypitoisuuksilla**

Määritys suoritettiin kohdan 2.4.4 mukaisesti, mutta kuoppalevy pöällystettiin Abcam Recombinant HPV16 L1 proteiinilla. Kuopat pöällystettiin 0,5 ja 1,0 µg/ml antigeenipitoisuuksilla laimennettuna PBS-liuokseen (pH 7.4). Levyn kuopista osa jätettiin pöällystämättä. Blokkaukspukurina käytettiin BSA/PBST-puskuria.

Taulukko 1: HPV16 spesifisen ELISA-määrityksen optimoinnin vaiheet. Optimointivaiheen määrityksissä käytetyt reagenssit ja inkubaatio-olosuhteet.

Määritys	Antigeeni		Blokkaus- puskuri	Laimennos- puskuri	Näyte- laimennokset	Sitoutumisaika ja -lämpötila	Pesu- puskuri
	HPV16L1 tyyppi	Konsentraatio (µg/ml)					
2.4.1	Denaturoitu	0,25 0,5 1,0	5 % maito / PBS, pH 7.4	PBS, pH 7.4	1:1 1:3 1:9	2 h RT	PBST, pH 7.4
2.4.2	Denaturoitu	0,25 0,5 1,0	5 % maito / PBS, pH 7.4; 3 % BSA / PBS, pH 7.4	PBS, pH 7.4	1:1 1:3	2 h RT	PBST, pH 7.4
2.4.3	Denaturoitu	0,5 1,0	3 % BSA / PBS, pH 7.4	PBS, pH 7.4	1:1 1:3	o/n + 4 °C *	PBST, pH 7.4 + 2 min ravistelu
2.4.4	-	-	3 % BSA / PBS, pH 6.8; 3 % BSA / PBST, pH 6.8	Blokkaus- puskuri	1:2	o/n + 4 °C *	PBST, pH 6.8 + 2 min ravistelu
2.4.5	Denaturoitu	0,5 1,0	3 % BSA / PBST, pH 6.8	Blokkaus- puskuri	1:1 1:3	o/n + 4 °C *	PBST, pH 6.8 + 2 min ravistelu
2.4.6	Denaturoitu Natiivi	1,0	3 % BSA / PBST, pH 6.8	Blokkaus- puskuri	1:2	o/n + 4 °C *	PBST, pH 6.8 + 2 min ravistelu
2.4.7	Natiivi	0,5 1,0	3 % BSA / PBST, pH 6.8	Blokkaus- puskuri	1:2	o/n + 4 °C *	PBST, pH 6.8 + 2 min ravistelu

## 2.5 HPV16 spesifinen vasta-ainemääritys

### 2.5.1 96-kuoppalevyn valmistaminen

Kuoppalevyn päällystyksessä antigeeninä käytettiin HPV16L1 rekombinanttiproteiinia (Abcam, ab119880). Kuoppiin lisättiin antigeeniä 1,0 µg/ml laimennettuna PBS-liuokseen (pH 7.4). Antigeenin lisäyksen jälkeen, levyä inkuboitii yön yli + 4 °C. Levy pestiin 5 x PBST-liuoksella (pH 7.4). Levyn kuopat blokattiin lisäämällä kuoppiin BSA/PBST (pH 6.8) -puskuria. Levyä inkuboitii tunti huoneenlämmössä.

Näytteiden taustojen mittaamista varten valmistetun toisen kuoppalevyn kuoppia ei päällystetty antigeenillä.

## 2.5.2 HPV16 spesifinen vasta-ainemääritys äidinmaidosta

HPV16L1 rekombinanttiproteiinilla päällystetty 96-kuoppalevy pestiin 5 x PBST-liuoksella (pH 6.8). Äidinmaitonäytteistä valmistettiin 1:2 laimennokset kahtena rinnakkaisena blokkauksuskuriin. Näytteiden lisäyksen jälkeen levyä inkuboitiin yön yli + 4 °C.

Levy pestiin kuten edellä, mutta pesujen välillä levy vietiin ravistelijaan kahdeksi minuutiksi. Kuoppiin lisättiin anti-IgA reagenssia 1:3000 laimennoksena valmistettuna blokkauksuskuriin. Levyä inkuboitiin tunti huoneenlämmössä. Levy pestiin kuten edellä, ilman ravistelua. Levyn kuoppiin lisättiin phenylendiamiinia (0,4 mg/ml) fosfaattisitraattipuskurissa (0,1 M, pH 5.0), johon oli lisättyä H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,002 %). Levyä inkuboitiin huoneenlämmössä 30 minuuttia. Reaktio pysäytettiin lisäämällä kuoppiin HCl-liuosta (2,0 M). Näytteiden absorbanssit mitattiin 495 nm käyttäen Multiskan-laitetta.

Näytteistä, jotka sisälsivät huomattavasti enemmän vasta-aineita ja joiden tausta oli yli 1,0, valmistettiin suuremmat laimennokset (1:5; 1:10; 1:20; 1:40 ja 1:80) ja näytteiden absorbanssit määritettiin uudelleen.

## 2.6 Tilastolliset analyysit

Tilastolliset analyysit suoritettiin käyttämällä IBM SPSS Statistics -ohjelman versiota 28. Vertailtavien muuttujien välillä tilastollisesti merkitsevyyden raja-arvona käytettiin p-arvoa < 0,05.

Mann-Whitney U-testiä käytettiin kahden riippumattoman otosryhmän keskiarvojen välisen eron merkitsevyyden määrittämiseen, kun otokset eivät olleet normaalisti jakautuneita

Kruskal-Wallis testiä eli yksisuuntaista varianssianalyysiä käytettiin kolmen tai useamman riippumattoman otosryhmän keskiarvojen välisten erojen merkitsevyyksien määrittämiseen, kun otokset eivät olleet normaalisti jakautuneita.

Jonckheere-Terpstra testiä käytettiin kolmen tai useamman riippumattoman otosryhmän mediaanien välisten erojen merkitsevyyksien määrittämiseen, kun otosryhmät voitiin järjestää luonnolliseen suurusjärjestykseen.

Spearmanin korrelaatiokerrointa käytettiin kahden muuttujan välisen korrelaation mittaamiseen, kun muuttujat eivät olleet normaalisti jakautuneita.

## **3 Tulokset**

### **3.1 Totaali IgA vasta-ainemäärityksen optimoiminen**

#### **3.1.1 Ensimmäinen määrittäminen, maitonäytteiden laimentaminen**

Rinnakkaisten näytteiden absorbanseista laskettiin keskiarvot, joita verrattiin määrittämissä valmistettuun standardisuoraan (4,54-68,1 ng/ml). Standardisuoran absorbanssit olivat väliltä 0,158-0,819 mitattuna 492 nm. Valmistettu suora ei ollut ensimmäisessä määrittämissä täysin lineaarinen. Näytteiden absorbanseja, standardisuoran yhtälöä ja näytteiden laimennoskertoimia käytettiin alkuperäisten näytteiden totaali IgA pitoisuuksien laskemiseen (taulukko 3).

1:100 000 laimennoksilla mitatut absorbanssit olivat liian matalia kaikilla kolmella näytteellä (taulukko 2). Näytteiden 1 ja 2 absorbanssit jäivät kokonaan standardisuoran alapuolelle ja näytteen 3 absorbanssi sijoittui aivan suoran alkupäähän. Näillä laimennoksilla ei siis pystytty määrittämään alkuperäisten näytteiden IgA määriä luotettavasti (taulukko 3).

1:50 000 laimennoksilla absorbanssit osuivat suoran alkupäähän ja näytteille onnistuttiin määrittämään IgA pitoisuudet. Tämä laimennos ei kuitenkaan ollut ideaalinen tulevia määrittämiä varten, sillä vasta-aineiden pitoisuudet äidinmaidossa ovat hyvin yksilölliset. Mikäli lopuissa maitonäytteissä olisi suurta hajontaa vasta-aineiden määrissä, jotkin näytteet voisivat jäädä suoran lineaarisen osan ulkopuolelle.

1:10 000 laimennoksilla absorbanssit osuivat kaikilla näytteillä suoran keskivaiheille. Määrittämissä optimointia jatkettiin tällä laimennoksella.

#### **3.1.2 Toinen määrittäminen, inkubaatio-olosuhteiden optimointi**

1. levyn näytteiden absorbanssit määritettiin käyttämällä samaa ohjetta kuin ensimmäisessä määrittämissä. 2. levyn näytteitä inkuboitin + 37 °C lämpökaapissa näytteiden lisäyksen jälkeen. Standardisuoran absorbanssit olivat 1. levyllä välillä 0,182-0,777 ja 2. levyllä 0,103-0,780. Lämpötilanmuutos ei suuresti vaikuttanut standardien absorbanseihin, mutta sillä oli selkeä vaikutus näytteistä saataviin vasteisiin (taulukko 2). 2. levyn näytteiden vasta-ainepitoisuudet jäivät huomattavasti pienemmiksi kuin 1. levyn. Lämpötilaero aiheutti 100–200 µg/ml eron 1. ja 2. levyn näytteiden tuloksissa (taulukko 3).

3. levyn näytteitä inkuboitiin yön yli + 4 °C ja tämä nosti sekä standardien (0,195-0,918), että näytteiden antamaa vastetta (taulukko 2). Määrityksen herkkyys ei kuitenkaan parantunut merkittävästi 1. levyyn nähden (taulukko 3), minkä vuoksi määrityksiä päätettiin jatkaa 1. levyn ohjeella eli näytteitä tullaan inkuboimaan kaksi tuntia huoneenlämmössä.

1:5 000 laimennos ei ollut riittävä, jotta se tulisi toimimaan lopullisessa määrityksessä. Kahden optimoinnissa käytetyn näytteen absorbanssit osuivat standardisuoran keskivaiheelle tai sen loppupäähän. Yksi näyte näyttää kuitenkin sisältävän 200–300 µg/ml enemmän IgA vasta-aineita ja tällä laimennoksella se ei enää osunut suoralle.

1:10 000 laimennoksella kaikkien näytteiden absorbanssit osuivat standardisuoralle, mutta 1:20 000 laimennoksella näytteet saatiin paremmin kohdennettua suoran keskivaiheelle.

Tässä määrityksessä valmistetut standardisuorat olivat lineaarisia, toisin kuin ensimmäisessä määrityksessä. Suoran yhtälöä käytettiin maitonäytteiden totaali IgA pitoisuuksien laskemiseen ja koska näissä kahdessa ensimmäisessä määrityksessä suoran yhtälöt olivat erilaiset, tämä johti selkeisiin eroihin totaali IgA pitoisuuksissa (taulukko 3). Ero on huomattavissa molemmissa määrityksissä käytetyn 1:10 000 laimennoksen totaali IgA tuloksissa. Huoneenlämmössä inkuboitujen levyjen ELISA-määritykset suoritettiin samalla tavalla molemmissa määrityksissä.

### **3.1.3 Kolmas määrittys, laimennosten optimointi ja näytteiden säilyvyyden testaus**

Olosuhteiden testausta jatkettiin 1:15 000 ja 1:30 000 laimennoksilla ja määrittys suoritettiin ensimmäisen määrityksen ohjeen mukaisesti. Tässä tutkimuksessa käytettyjä äidinmaitonäytteitä on jo aikaisemmin käytetty tutkimuksissa, minkä vuoksi osasta maitonäytteistä oli saatavilla jo aikaisemmin eristettyjä supernatanteja, joita oli säilytetty - 70 °C pakastimessa. Näistä supernatanteista valmistettiin rinnakkaiset laimennokset määrittystä varten, jotta voitiin selvittää, vaikuttaako maidon rasva vasta-aineiden säilymiseen tai niiden käyttäytymiseen määrityksissä pitkän pakastuksen jälkeen.

1:15 000 ja 1:30 000 laimennoksilla näytteiden absorbanssit osuivat hyvin standardisuoralle (0,140-0,770; taulukko 2) minkä johdosta lopun aineiston totaali IgA vasta-ainemääritykset päätettiin suorittaa käyttäen näitä kahta laimennosta.

Vanhojen ja uusien supernatanttien välillä ei ollut merkittävän suuria eroja absorbansseissa, mutta kahdessa vanhassa supernatantissa oli havaittavissa maitorasvan jäämiä ennen laimennoksien valmistamista. Maitorasvan esiintyminen näytteissä on kuitenkin mahdollinen määrittämisen tuloksia häiritsevä tekijä, mikä voisi vaikuttaa tuloksiin.

Taulukko 2: ELISA määrittämisen olosuhteiden optimointi: totaali IgA absorbanssit. Taulukossa on ilmoitettu kolmen rinnakkaisen näytteen keskiarvo.

	Inkubaatio-olosuhteet	Huoneenlämpö 2 h			Lämpökaappi +37°C, 2 h			Kylmähuone +4°C, o/n		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
	<b>Näyte</b>									
	<b>Laimennos</b>	<b>Absorbanssi (492 nm)</b>								
<b>Ensimmäinen määrittäminen</b>	1:10 000	0,425	0,534	0,451						
	1: 50 000	0,163	0,197	0,181						
	1:100 000	0,138	0,149	0,172						
<b>Tausta</b>	BSA	0,090								
<b>Standardisuora</b>		0,158-0,819								
<b>Toinen määrittäminen</b>	1:5 000	0,619	0,996	0,759	0,513	0,944	0,649	0,855	1,167	0,992
	1:10 000	0,393	0,665	0,492	0,297	0,596	0,357	0,566	0,917	0,709
	1:20 000	0,257	0,407	0,300	0,193	0,318	0,243	0,361	0,594	0,416
<b>Tausta</b>	BSA	0,122			0,070			0,089		
<b>Standardisuora</b>		0,182-0,777			0,103-0,780			0,195-0,918		
<b>Kolmas määrittäminen</b>	1:15 000	0,320	0,444	0,341						
	1:30 000	0,207	0,283	0,218						
<b>Tausta</b>	BSA	0,066								
<b>Standardisuora</b>		0,140-0,770								

Taulukko 3: ELISA määrittämisen olosuhteiden optimointi: totaali IgA pitoisuudet. Taulukossa on ilmoitettu kolmen rinnakkaisen näytteen keskiarvo.

	Inkubaatio-olosuhteet	Huoneenlämpö 2 h			Lämpökaappi + 37°C, 2 h			Kylmähuone + 4 °C, o/n		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
	<b>Näyte</b>									
	<b>Laimennos</b>	<b>Totaali IgA (µg/ml)</b>								
<b>Ensimmäinen määrittäminen</b>	1:10 000	218	326	241						
	1: 50 000	238	327	284						
	1:100 000	-	-	816						
<b>Toinen määrittäminen</b>	1:5 000	270	-	331	217	-	286	290	-	-
	1:10 000	311	587	413	209	518	272	252	664	394
	1:20 000	330	650	424	189	462	301	226	553	288
<b>Kolmas määrittäminen</b>	1:15 000	345	537	378						
	1:30 000	338	574	373						

### 3.2 Totaali IgA vasta-ainemääritykset

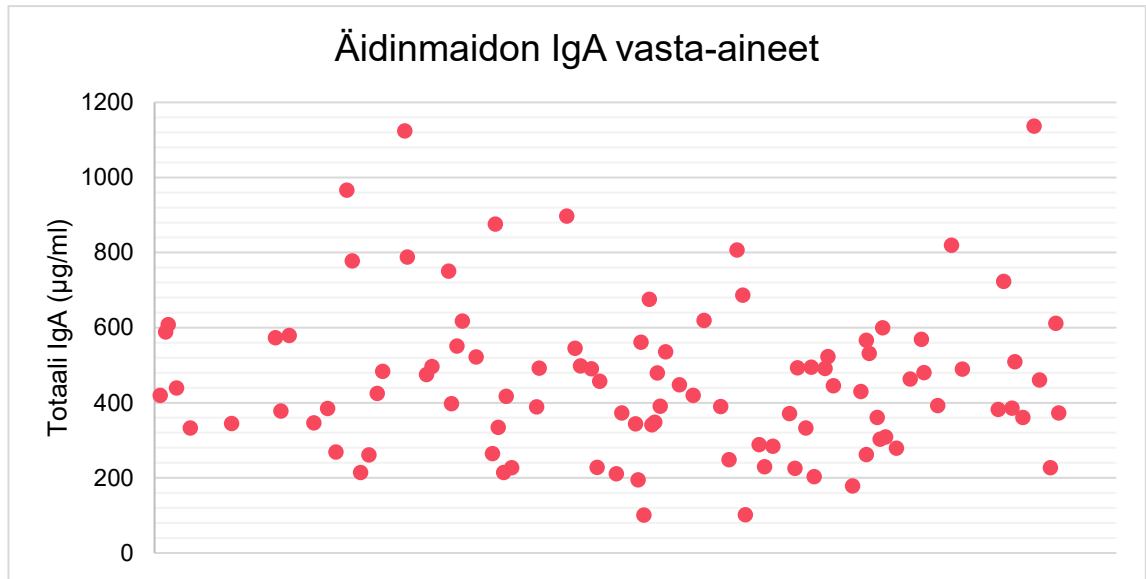
Äidinmaitonäytteiden totaali IgA vasta-ainepitoisuudet määritettiin käyttäen TY:n Hammaslääketieteen laitoksen syljen totaali IgA ELISA-määrityksen ohjetta. Olosuhteiden testaamisessa saatujen tulosten perusteella tulimme siihen tulokseen, että alun perin syljelle suunniteltu ELISA-määritys toimi parhaiten sellaisenaan myös maitonäytteiden IgA vasta-ainepitoisuuksien määrittämisessä.

Maitonäytteistä valmistettiin 1:15 000 ja 1:30 000 laimennokset. Maidon vasta-aineet ovat vahvasti yksilöriippuvaisia, minkä vuoksi niiden pitoisuuksissa saattaa esiintyä suurtakin vaihtelua eri henkilöiden välillä. Käyttämällä kahta eri laimennosta vasta-ainemäärityksissä, pyrimme varmistamaan, että edes toinen laimennoksista osuisi jokaisen määrityksen yhteydessä valmistetulle standardisuoralle.

Muutamien äidinmaitonäytteiden IgA pitoisuudet olivat huomattavasti korkeammat ja näistä näytteistä jouduttiin valmistamaan suuremmat laimennokset totaali IgA pitoisuuksien määrittämiseksi. Jos rinnakkaisten näytteiden absorbanssien erot olivat >20 %, määritys toistettiin samoilla laimennoksilla.

Tutkittujen äidinmaitonäytteiden keskimääräinen IgA pitoisuus oli 687 µg/ml ja vaihteluväli oli 100,90-13190 µg/ml. Tutkituissa äidinmaitonäytteissä oli kuitenkin kaksi tapausta, jotka sisälsivät huomattavasti enemmän IgA vasta-aineita, kuin muut. Näiden kahden poikkeavan maitonäytteen totaali IgA pitoisuudet olivat 10 850 ja 13 190 µg/ml. Ilman näitä kahta poikkeavaa näytettä, aineiston laskettu keskiarvo totaali IgA vasta-aineille oli 460 µg/ml (kuva 3) ja vaihteluväli 100,90-1137 µg/ml. Koska nämä kaksi muista poikkeavaa maitonäytettä aiheuttivat suuren eron laskettujen keskiarvojen ja vaihteluväliden välille, ne päätettiin jättää pois keskiarvosta ja tulevista analyyseista. Näitä kahta näytettä tullaan tarkastelemaan erillisinä itsenäisinä tapauksia.





Kuva 3: Äidinmaidonäytteiden totaali IgA pitoisuudet µg/ml (n=99). Kuvaajasta puuttuu kahden näytteen totaali IgA pitoisuudet. Nämä maidonäytteet sisälsivät huomattavasti enemmän (>10 000 µg/ml) IgA vasta-aineita kuin muut, minkä vuoksi ne on jätetty pois keskiarvosta ja kuvaajasta.

### 3.3 HPV16 spesifisen vasta-ainemäärityksen optimointi

#### 3.3.1 96-kuoppalevyn päällystys antigeenillä ja maidonäytteiden laimentaminen

HPV16 spesifisen ELISA määrityksen testaaminen päällystämällä kuoppalevy neljällä eri HPV16 L1 proteiinipitoisuudella. Määritystä varten valmistettiin kaksi kuoppalevyä, joista toiseen lisättiin näytteet ja toiseen L1 proteiinille spesifistä vasta-ainetta. L1 vasta-aineella seurattiin päällystys onnistumista tarkkailemalla antigeenin eli HPV16 L1 proteiinin tarttumista kuoppiin.

Kontrollilevyllä, johon oli näytteiden sijaan lisätty L1 vasta-ainetta, absorbanssit olivat suoraan verrannollisia päällystyspitoisuuden kanssa (taulukko 4). Tämä tulos varmisti sen, että päällystämässä käytetty HPV16 L1 rekombinanttiproteiini todella tarttuu kuopan pohjaan ja soveltuu käytettäväksi tässä määrityksessä.

Taulukko 4: MyBioSource HPV16L1 proteiinin käytön toimivuuden testaaminen kuoppalevyn kuoppien päällystyksessä eri antigeenipitoisuuksilla.

Antigeenin päällystyspitoisuus (µg/ml)	0	0,25	0,5	1,0
Absorbanssi (492 nm)	0,041	0,454	0,766	1,246

Menetelmän ja päällystyksen optimoinnissa pyrittiin käyttämään sekä HPV-positiivisia että -negatiivisia maitonäytteitä. Ensimmäiseen määryykseen valittiin näytteet maidon sisältämän HPV16 DNA:n tai äidin seerumin HPV-statuksen mukaan samassa kahden kuukauden aikapisteessä. Näytteet pyrittiin valitsemaan niin, että sekä maidon, että seerumin HPV-statukset olivat molemmat joko positiiviset tai negatiiviset. Tiedot näytteiden HPV-statuksista saatiin aikaisemmista tutkimustuloksista. Optimoinnissa haluttiin käyttää näytteitä, jotka sisältäisivät sekä paljon että vähän HPV16 vasta-aineita.

Määryyksessä käytetyt maitonäytteet antoivat toisistaan selkeästi eroavat tulokset, mutta mitatuilla absorbansseilla ei näyttänyt olevan selkeää eroa eri päällystypitoisuuksien välillä (taulukko 5). Jokaisen näytteen ja kaikkien kolmen laimennoksen kohdalla, päällystämättömät kuopat antoivat yhtä voimakkaan vasteen kuin antigeenillä päällystetyt kuopat. Päällystämättömät kuopat antoivat selkeästi suuremman vasteen kuin taustan mittaamiseen tarkoitettujen kuopat, joihin oli näytteiden sijaan lisätty pelkästään BSA-liuosta.

1:9 laimennoksella valmistetut näytteet antoivat liian matalia vasteita, minkä vuoksi optimointia päätettiin jatkaa käyttäen vain laimentamatonta ja 1:3 laimennosta.

*Taulukko 5: Ensimmäisen optimointivaiheen absorbanssit HPV16 vasta-aineelle. Antigeenin eri pitoisuuksien soveltuminen kuoppalevyn päällystyksen ja näytteiden eri laimennoksien testaus.*

Antigeenin päällystypitoisuus (µg/ml)		0	0,25	0,5	1,0
Näyte 1	laimentamaton	0,569	0,571	0,602	0,576
	1:3	0,227	0,232	0,243	0,210
	1:9	0,117	0,117	0,117	0,113
Näyte 2	laimentamaton	0,098	0,097	0,102	0,112
	1:3	0,058	0,061	0,060	0,065
	1:9	0,051	0,047	0,056	0,057
Näyte 3	laimentamaton	0,064	0,069	0,084	0,111
	1:3	0,070	0,078	0,085	0,096
	1:9	0,055	0,062	0,060	0,069
Tausta	BSA	0,037	0,039	0,037	0,041

### 3.3.2 Blokkaustrupskuri ja näytteiden inkubointiaika

Menetelmän optimointia jatkettiin testaamalla kahta eri blokkaustrupusta sekä vaihtamalla näytteiden inkubaatioaika kahdesta tunnista huoneenlämmössä, yön yli + 4 °C inkubaatioon. Näillä muutoksilla pyrittiin laskemaan näytteiden aiheuttamaa hyvin korkeaa taustaa ja nostamaan näytteiden antamaa signaalia.

Käyttämällä kahta blokkaustrupusta, maito ja BSA pohjaista, saatiin osan näytteiden tuloksiin selkeitä eroavaisuuksia (taulukko 6). Noin puolessa näytteistä maito ja BSA blokkaustrupien välillä ei ollut merkittäviä eroja, mutta lopuilla näytteillä oli havaittavissa selkeitä eroja näytteiden antamisissa taustoissa sekä eri päällystyspitoisuuksien välillä. Maidolla blokkaustrupien näytteet antoivat keskimäärin suuremman vasteen kuin BSA:lla blokkaustrupien. Kuitenkin maidolla blokkaustrupien päällystämättömät kuopat antoivat lähes yhtä korkeat vasteet kuin antigeenillä päällystetyt. BSA:lla blokkaustrupien näytteet antoivat maitoblokkaustrupeseen verrattuna matalampia vasteita, mutta signaalien ja taustojen välinen ero jäi joissakin näytteissä selvästi suuremmaksi. Näytteiden korkeat taustat viittaisivat siihen, että jokin näytteissä saattaa saostua kuoppien pohjalle ja aiheuttaa taustan nousua. Koska BSA-blokkaustrupella taustat saatiin laskemaan hieman ja signaalien ja taustojen väliset erot olivat suuremmat suhteessa maitoblokkaustrupeseen, päätimme jatkaa menetelmän optimointia käyttäen 3 % BSA/PBS-puskuria levyjen valmistuksessa.

Inkubaatioajan pidentäminen auttoi nostamaan näytteiden antamaa vastetta, minkä vuoksi optimointia jatkettiin näytteiden yön yli inkuboinnilla. Levyn 0,25 µg/ml päällystys jätettiin pois tulevista määrityksistä matalan vasteen vuoksi.

Taulukko 6: Toisen optimointivaiheen absorbanssit HPV16 vasta-aineelle. Määrityksessä vertailtiin 5 % maito/PBS, pH 7.4 ja 3 % BSA/PBS, pH 7.4 blokkaukskurin vaikutusta näytteiden vasteisiin.

Antigeenin pällystyspitoisuus ( $\mu\text{g/ml}$ )			0	0,25	0,5	1,0
BSA	Näyte 2	laimentamaton	0,067	0,070	0,083	0,100
		1:3	0,069	0,072	0,079	0,088
Maito		laimentamaton	0,218	0,218	0,226	0,241
		1:3	0,092	0,095	0,134	0,098
BSA	Näyte 3	laimentamaton	0,151	0,146	0,139	0,182
		1:3	0,277	0,234	0,236	0,287
Maito		laimentamaton	0,116	0,137	0,149	0,179
		1:3	0,150	0,167	0,160	0,221
BSA	Näyte 4	laimentamaton	0,039	0,094	0,145	0,137
		1:3	0,149	0,142	0,163	0,181
Maito		laimentamaton	0,038	0,649	0,682	0,332
		1:3	0,315	0,280	0,287	0,314
BSA	Näyte 5	laimentamaton	0,228	0,287	0,267	0,571
		1:3	0,332	0,397	0,336	0,558
Maito		laimentamaton	0,242	0,317	0,341	0,556
		1:3	0,255	0,280	0,317	0,397
BSA	Näyte 6	laimentamaton	0,087	0,109	0,156	0,194
		1:3	0,087	0,108	0,130	0,153
Maito		laimentamaton	0,079	0,112	0,139	0,195
		1:3	0,071	0,084	0,107	0,121
BSA	Tausta	BSA	0,038	0,044	0,050	0,042
Maito		BSA	0,040	0,038	0,039	0,039

### 3.3.3 Pesujen optimointi näytteiden sakkaamisen estämiseksi

Näytteiden aiheuttama suuri tausta saattaa johtua maitonäytteiden saostumisesta kuoppien pohjaan. Saostumista ei kuitenkaan ole ollut silminnähden havaittavissa maitonäytteiden supernatanteissa tai näytekaivoissa näytteen lisäyksen jälkeen. ELISA menetelmän optimoinnin seuraavassa vaiheessa lisäsimme kahden minuutin ravistelun näytteiden inkubaation jälkeiseen pesuvaiheeseen. Levyn ravistelu pesujen välissä auttoi osalla näytteistä laskemaan taustaa antigeenillä pällystettyjen kuoppien vasteita matalammalle tasolle (taulukko 7). Näiden näytteiden taustat jäivät silti huomattavasti korkeammiksi kuin nollanäytteenä toimineen BSA-liuoksen.

Taulukko 7: Kolmannen optimointivaiheen absorbanssit HPV16 vasta-aineelle. Näytteiden inkubaation jälkeiseen pesuvaiheeseen lisättiin kahden minuutin ravistelu korkean taustan laskemiseksi.

Antigeenin päällystyspitoisuus (µg/ml)		0	0,5	1,0
Näyte 5	laimentamaton	0,277	0,313	0,446
	1:3	0,298	0,526	0,513
Näyte 7	laimentamaton	0,163	0,206	0,287
	1:3	0,287	0,289	0,299
Näyte 8	laimentamaton	0,361	0,566	0,317
	1:3	0,673	0,702	0,891
Tausta	BSA	0,043	0,039	0,039

### 3.3.4 Äidinmaitonäytteiden tausta

Seuraavassa määrittämissä pyrimme keskittymään ainoastaan äidinmaitonäytteiden aiheuttamaan taustaan, joka osoittautui suurimmaksi ongelmaksi tähänastisissa määrittämissä. Tässä määrittämissä käytimme päällystämätöntä 96-kuoppalevyä. Päätimme laskea pesuissa ja blokkauksessa käytettävän PBS-liuoksen pH:ta (Studentsov ja muut 2002) ja vertasimme kahta eri blokkaukspuskuria suhteessa näytteiden aiheuttamaan taustaan.

Blokkaukspuskurin pH:ta muuttamalla saimme näytteiden taustat laskemaan selvästi edellisiin määrittämiin verrattuna (taulukko 7 ja 8) ja lisäämällä puskuuriin Tween20:tä, näytteiden taustat laskivat lähes samalle tasolle nollanäytteiden kanssa (taulukko 8). Määrittämiä jatkettiin käyttämällä pH 6.8 PBS-liuosta pohjana pesuissa ja blokkauksessa. Lisäksi blokkaukspuskurissa päätettiin käyttää Tween20:tä.

Taulukko 8: Neljännen optimointivaiheen absorbanssit. Työssä vertailtiin kahden eri blokkaukspuskurin vaikutusta näytteiden aiheuttamiin taustoihin.

Blokkaukspuskuri	Näyte 7	Näyte 8	Tausta
PBS pH 6.8	0,153	0,124	0,038
PBS pH 6.8, jossa Tween20	0,038	0,058	0,038

### 3.3.5 Blokkaustrupskurin vaikutus näytteiden vasteisiin eri päällystyspitoisuuksilla

Seuraavassa määrittäksessä tarkastimme, että happamampi PBS-liuos ei vaikuta negatiivisesti maitonäytteiden antamiin vasteisiin. Happamamman PBS-liuoksen vaikutusta levyn päällystyksessä käytettävään antigeneeniin ei lähdetty erikseen selvittämään, minkä vuoksi määrittäksissä jatkettiin pH 7.4 PBS-liuoksen käyttöä ennen blokkausta olevissa laimennoksissa ja pesuissa.

Näytteiden taustat pysyivät lähellä nollanäytteen antamaa vastetta ja eri päällystyspitoisuuksien välillä oli kaikilla näytteillä huomattavissa signaalien kasvua samassa suhteessa päällystyspitoisuuden kasvuun (taulukko 9). Pelkän maitonäytteen aiheuttaman taustan selvittämiseksi yhdestä näytteestä valmistettiin ylimääräiset laimennokset, joihin ei lisätty anti-IgA reagenssia. Suurin osa näytteiden aiheuttamasta taustasta näyttäisi olevan peräisin maitonäytteestä eikä esimerkiksi myöhemmin kuoppiin lisättävästä anti-IgA reagenssista. Pelkän maitonäytteen antama vaste oli lähes sama kuin nollanäytteenä toimineen BSA:n, kun taas anti-IgA-maitonäytteen vaste oli tässä määrittäksessä hieman korkeampi. Edellisessä määrittäksessä (taulukko 8) saman näytteen tausta jäi kuitenkin samalle tasolle kuin ilman anti-IgA reagenssia mitattu tausta tässä määrittäksessä.

*Taulukko 9: Viidennen optimointivaiheen absorbanssit HPV16 vasta-aineelle. Näytteiden antamat vasteet kasvoivat samassa suhteessa antigenin päällystyspitoisuuteen nähden myös happamampaa PBS-liuosta käytettäessä.*

Antigeneenin päällystyspitoisuus (µg/ml)		0	0,5	1,0
Näyte 7	laimentamaton	0,188	0,265	0,325
	1:3	0,052	0,078	0,096
Näyte 7 ilman anti-IgA reagenssia	laimentamaton	0,038		
	1:3	0,037		
Näyte 8	laimentamaton	0,073	0,227	0,327
	1:3	0,043	0,084	0,105
Tausta	BSA	0,039	0,039	0,038

### 3.3.6 HPV16L1 rekombinanttiproteiinien vertailu kuoppalevyn päällystyksessä

Menetelmän pystyttämiseksi kuoppalevyjen päällystämiseen oli käytettävissä kahden eri valmistajan HPV16 L1 rekombinanttiproteiinia. Määrittäksen optimointi suoritettiin käyttämällä alussa valittua MyBioSource HPV16L1 rekombinanttiproteiinia, mutta päätimme testata molemmat saatavilla olevat antigenit rinnakkain ennen varsinaisten määrittäysten aloittamista.

Antigeenin vaihtaminen ei vaikuttanut BSA:n antamaan vasteeseen, mutta näytteiden antamat signaalit nousivat melkein kaksinkertaisiksi Abcamin HPV16L1 rekombinanttiproteiinilla verrattuna aikaisemmin käytettyyn MyBioSource proteiiniin (taulukko 10). Aikaisempien määritysten tulokset olivat yhtenevät nyt saatujen MyBioSourcen päällystysten vastaavien tulosten kanssa (taulukot 9 ja 10).

Näyte 10 oli toinen aikaisemmin totaali IgA mittauksissa mainituista näytteistä, jotka sisälsivät muihin verrattuna huomattavasti enemmän totaali IgA vasta-aineita. IgA vasta-aineiden suuri määrä näytteessä todennäköisesti aiheutti näytteen suuren taustan ja tulevissa, varsinaisissa määrittelyissä, näytettä tarvitsee todennäköisesti laimentaa enemmän taustan laskemiseksi.

Valmistajan mukaan MyBioSource HPV16L1 rekombinanttiproteiini on denaturoidussa muodossa, kun taas Abcamin vastaava antigeeni on natiivimuotoinen. Tämä ero rekombinanttiproteiinien välillä on todennäköisesti syynä antigeenien aiheuttamaan vaste-eroon. Näiden tulosten pohjalta päätimme jatkaa määrittelyä käyttäen Abcam HPV16 L1 rekombinanttiproteiinia.

*Taulukko 10: Kahden eri valmistajan HPV16 L1 rekombinanttiproteiinin käyttö kuoppalevyn päällystämässä.*

Antigeenin päällystyspitoisuus (µg/ml)		0	1,0 (MyBioSource)	1,0 (Abcam)
Näyte 7	1:2	0,082	0,173	0,584
Näyte 9	1:2	0,052	0,128	0,348
Näyte 10	1:2	1,272	1,445	1,921
Tausta	BSA	0,037	0,041	0,037

### 3.3.7 HPV16L1 rekombinanttiproteiinin toimivuuden varmistaminen eri päällystyspitoisuuksilla

Määrittelyssä kuoppalevyn päällystämässä käytettiin ainoastaan Abcam HPV16L1 rekombinanttiproteiinia. Tällä viimeisellä määrittelyllä pyrimme varmistamaan antigeenin toimivuuden useammalla eri päällystyspitoisuudella.

Näytteiden taustat vastasivat hyvin BSA:n aiheuttamaa taustaa kaikilla päällystyspitoisuuksilla, minkä lisäksi näytteiden vasteet kasvoivat melko lineaarisesti päällystyspitoisuuden mukaan (taulukko 11).

Taulukko 11: Abcam HPV16 L1 rekombinanttiproteiinin toimivuuden todentaminen eri päällystyspitoisuuksilla.

Antigeenin päällystyspitoisuus (µg/ml)		0	0,5	1,0
Näyte 5	1:2	0,057	0,301	0,511
Näyte 9	1:2	0,044	0,216	0,384
Näyte 11	1:2	0,048	0,985	1,632
Tausta	BSA	0,037	0,038	0,038

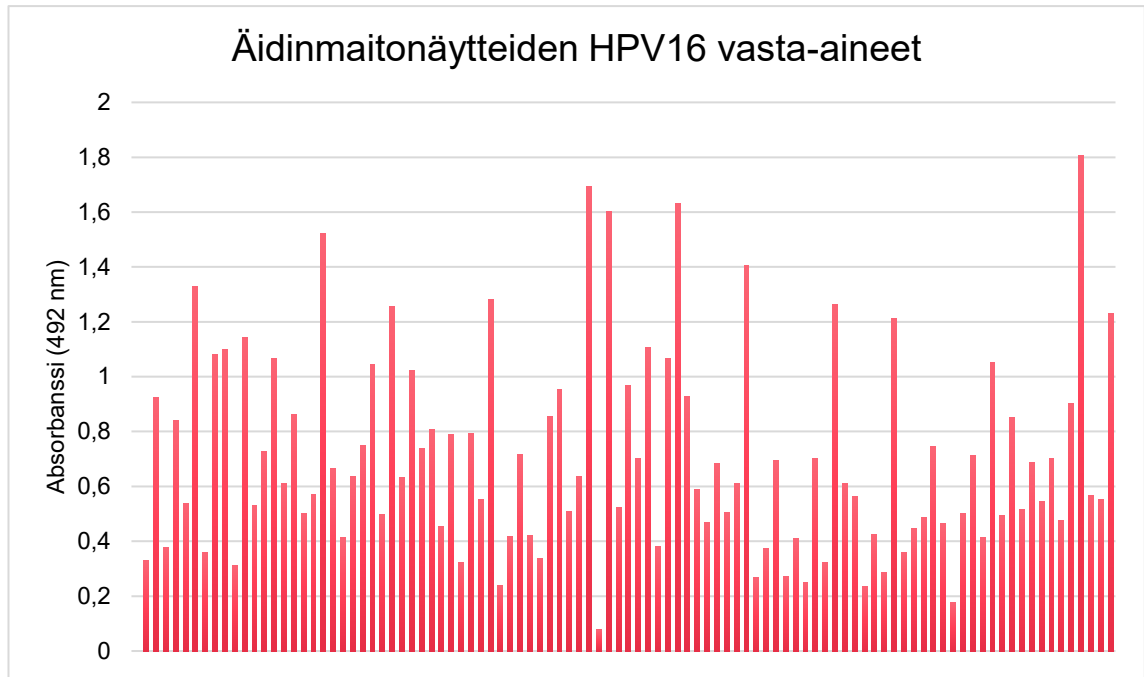
### 3.4 HPV16 spesifinen vasta-ainemääritys

Äidinmaitonäytteiden HPV16 vasta-ainepitoisuudet määritettiin käyttämällä tätä tutkimusta varten pystytettyä ja optimoitua ELISA-määritystä. Kaikki tutkimukseen osallistuneet äidit olivat rokottamattomia kaikkia HPV-virustyyppettä vastaan.

Näytteistä valmistettiin 1:2 laimennokset ELISA-määritystä varten, mutta kahden maitonäytteen absorbanssien määrittämiseksi tarvittiin 1:40 laimennokset. Nämä kaksi äidinmaitonäytettä olivat samat, joiden totaali IgA pitoisuudet olivat huomattavasti muita korkeammat. HPV16 vasta-ainemäärityksellä mitatuista absorbansseista vähennettiin näytteiden tausta, minkä jälkeen mitatut absorbanssit muutettiin laimentamattomaan muotoon näytteen laimennoskerroimen mukaisesti. Määritettyjen HPV16 vasta-aineiden määrä suhteessa maitonäytteen totaali IgA määrään laskettiin seuraavan kaavan avulla: [(laskettu, laimentamattoman maitonäytteen HPV16 vasta-ainetaso / maitonäytteen totaali IgA) x 1000].

Alkuperäisten äidinmaitonäytteiden HPV16 vasta-aineiden absorbanssien keskiarvo koko aineistolla (n=101) oli 1,273 ja vaihteluväli 0,078-37,840. Ilman kahta poikkeavaa näytettä aineiston (n=99) absorbanssien keskiarvo oli 0,707 ja vaihteluväli 0,078-1,806 (kuva 4).





Kuva 4: Äidinmaitonäytteiden (n=99) sisältämien HPV16 vasta-aineiden määrät ilmoitettuna absorbanseina (492 nm). Keskiarvo 0,707; vaihteluväli 0,078-1,806. HPV16 vasta-aineille ei ollut negatiivista kontrollia. Kaikista näytteistä löytyi vasta-aineita. Kaksi näytettä jätetty pois kuvaajasta, sillä molemmat näytteet antoivat huomattavasti suuremmat vasteet, minkä vuoksi absorbanssien määrittämisessä tarvittiin paljon suuremmat näytelaimennokset.

### 3.5 Tilastolliset analyysit

#### 3.5.1 Äidin elintapojen, atopian ja HPV statuksen vaikutus äidinmaidon totaali IgA ja HPV16 vasta-aineisiin kaksi kuukautta lapsen syntymästä

Äidinmaidon sisältämien totaali IgA vasta-ainepitoisuuksien ja HPV16 vasta-ainetasojen välinen Spearmanin korrelaatiokerroin oli 0,250 eli muuttujien välillä on havaittavissa samansuuntaista korrelaatiota. Korrelaatiokertoimen p-arvo oli 0,013, mikä tarkoittaa sitä, että tulos on tilastollisesti merkitsevä ja sovellettavissa aineistoa suurempaan populaatioon.

Äidin atopian ja elintapojen vaikutusta äidinmaitoon erittyvien IgA vasta-aineiden määriin selvitettiin käyttämällä äideiltä kerättyjä perustietoja ja vertaamalla niitä tässä tutkimuksessa mitattuihin totaali IgA pitoisuuksiin (taulukko 12). Suoritettujen analyysien pohjalta näyttää siltä, että äidin atopialla, tupakoinnilla tai alkoholin käytöllä, ei ole yhteyttä äidinmaitoon erittyvien totaali IgA vasta-ainemäärien kanssa.

Taulukko 12: Äidin atopian ja elintapojen vaikutus maidon totaali IgA vasta-aineiden määrään. Tilastollinen merkitsevyys, kun p-arvo < 0,05. (n=99)

IgA vasta-aineet äidinmaidossa								
Totaali IgA (µg/ml)		Keskiarvo	Keski-hajonta	Mediaani	Vaihteluväli	N	p-arvo	Testi
<b>Totaali IgA</b>		458,0	200,7	430,5	100,9-1137	99		
<b>Atopia</b>	ei ole	459,3	205,3	422,4	100,9-1137	76	0,489	Mann-Whitney
	on	393,6	172,1	419,8	102,1-619,7	13		
<b>Tupakka</b>	tupakoimaton	429,6	190,9	418,6	100,9-1124	52	0,262	Mann-Whitney
	tupakoi	480,7	207,2	453,0	102,1-1137	40		
	1-10 savuketta/pv	491,9	227,5	441,2	102,1-1137	28	0,338	Jonckheere-Terpstra
	11-20 savuketta/pv	467,7	155,7	475,6	265,2-820	11		
	>20 savuketta/pv	309,6	-	309,6	-	1		
<b>Alkoholi</b>	ei käytä	380,3	132,6	417,3	203,4-573,8	7	0,322	Mann-Whitney
	käyttää	458,9	203,5	442,7	100,9-1137	84		
	1 annos 2-3 kertaa vko	476,4	193,9	457,4	178,8-807,5	13	0,922	Jonckheere-Terpstra
	1 annos 1 kerta vko	455,2	202,4	485,7	102,1-1137	24		
	1 annos 1 kk	455,9	210,6	424,9	100,9-1124	47		

Äidin atopiaa ja elintapoja sekä ikää verrattiin myös tässä tutkimuksessa määritettyihin HPV16 vasta-ainetasoihin (taulukko 13). Äidin ikä, atopia tai alkoholin käyttö eivät näytä olevan yhteydessä äidinmaitoon erittyvien HPV16 vasta-aineiden määrään tilastollisesti merkitsevästi. Äidin tupakoiminen kuitenkin näyttäisi olevan yhteydessä HPV16 vasta-aineiden suurempaan pitoisuuteen maidossa. Tupakoivien ja tupakoimattomien äitien keskimääräisissä HPV16 vasta-aineissa on tilastollisesti merkitsevä ero. Kun tarkastelemme tarkemmin äitien tupakointia ja päivässä poltettujen savukkeiden määriä, huomaamme, että äideillä, jotka polttavat 11-20 savuketta päivässä on keskimäärin enemmän HPV16 vasta-aineita maidossa, kuin äideillä, jotka polttavat 1-10 savuketta päivässä. Ero 1-10 savuketta polttavien ja 11-20 savuketta polttavien äitien HPV16 vasta-aineissa on tilastollisesti merkitsevä. Näiden tulosten pohjalta tupakoinnilla näyttäisi olevan yhteys HPV16 vasta-aineiden määrään äidinmaidossa, mutta kuitenkin tupakoinnilla ei havaittu vastaavaa yhteyttä IgA vasta-aineiden kokonaismäärään (taulukko 12).

Taulukko 13: Äidin iän, atopian ja elintapojen vaikutus maidon HPV16 vasta-aineiden määrään. Tilastollinen merkitsevyys, kun p-arvo < 0,05. (n=99)

HPV16 vasta-aineiden määrät äidinmaidossa								
Absorbanssi (492 nm)		Keskiarvo	Keski-hajonta	Mediaani	Vaihteluväli	N	p-arvo	Testi
<b>HPV16</b>		0,707	0,365	0,611	0,078-1,806	99		
<b>Ikäryhmä</b>	15-19	1,015	0,249	0,996	0,739-1,331	4	0,563	Jonckheere-Terpstra
	20-24	0,608	0,320	0,610	0,179-1,257	29		
	25-29	0,739	0,392	0,591	0,078-1,806	57		
	30-34	0,726	0,297	0,694	0,381-1,263	7		
	35-39	0,557	0,330	0,557	0,324-0,79	2		
	kaikki	0,707	0,365	0,611	0,078-1,806	99		
<b>Atopia</b>	ei ole	0,668	0,335	0,569	0,078-1,604	76	0,212	Mann-Whitney
	on	0,854	0,467	0,745	0,324-1,695	13		
<b>Tupakka</b>	tupakoimaton	0,632	0,355	0,540	0,078-1,631	52	0,039	Mann-Whitney
	tupakoi	0,765	0,347	0,726	0,237-1,695	40		
	1-10 savuketta/pv	0,732	0,326	0,690	0,237-1,406	28	0,033	Jonckheere-Terpstra
	11-20 savuketta/pv	0,850	0,415	0,925	0,361-1,695	11		
	>20 savuketta/pv	0,745	-	0,745	-	1		
<b>Alkoholi</b>	ei käytä	0,552	0,382	0,358	0,323-1,331	7	0,108	Mann-Whitney
	käyttää	0,705	0,354	0,611	0,078-1,695	84		
	1 annos 2-3 kertaa vko	0,671	0,356	0,571	0,237-1,604	13	0,159	Jonckheere-Terpstra
	1 annos 1 kerta vko	0,669	0,277	0,545	0,288-1,406	24		
	1 annos 1 kk	0,733	0,391	0,635	0,078-1,695	47		

Kahta muusta aineistosta poikkeavaa äidinmaidonäytettä, jotka sisälsivät muita enemmän IgA ja HPV16 vasta-aineita tarkasteltiin erillisinä tapauksia (taulukko 14). Äiti, jonka maidossa oli eniten sekä IgA että HPV16 vasta-aineita (näyte 12), oli ilmoittanut olevansa atoopikko ja tupakoimaton. Toinen äiti (näyte 10) oli ilmoittanut tupakoivansa noin 11-20 savuketta päivässä. Molemmat äidit olivat ilmoittaneet pöly- tai heinäallergiasta.

Taulukko 14: Erillisinä tapauksina tarkasteltujen äitien perustietoja. Näiden äitien totaali IgA- ja HPV16-tasot olivat selvästi muita suuremmat.

	Totaali IgA (µg/ml)	HPV16 (492 nm)	Atopia	Tupakka	Allergia
<b>Näyte 10</b>	10 850	20,760	ei	kyllä	kyllä
<b>Näyte 12</b>	13 190	37,840	kyllä	ei	kyllä

Koko aineistossa noin puolet äideistä olivat ilmoittaneet jonkin allergian, mutta perehtymättä tarkemmin allergioiden tyyppeihin, allergioiden ei voitu todeta olevan yhteydessä totaali IgA tai HPV16 vasta-aineiden määriin.

Vertasimme äidin aikaisempien synnytysten määrää ja lapsen synnytystapaa HPV16 vasta-ainemääriin (taulukko 15). Saatujen tulosten mukaan synnytystavalla tai aiempien synnytysten määrällä ei ole yhteyttä HPV16 vasta-ainetasoihin äidinmaidossa kahden kuukauden jälkeen lapsen syntymästä.

*Taulukko 15: Aikaisempien synnytysten määrän ja synnytystavan vaikutus äidinmaidon HPV16 vasta-aineisiin. p-arvo määritetty käyttämällä Mann-Whitney testiä. Tilastollinen merkitsevyys, kun p-arvo < 0,05. (n=99)*

Absorbanssi (492 nm)		Keskiarvo	Keskihajonta	Mediaani	Vaihteluväli	N	p-arvo
<b>HPV16</b>		0,707	0,365	0,611	0,078-1,806	99	
<b>Monesko lapsi</b>	ensimmäinen	0,719	0,370	0,635	0,078-1,806	53	0,525
	ei ensimmäinen	0,693	0,364	0,559	0,249-1,695	46	
<b>Synnytystapa</b>	alatiesynnytys	0,711	0,362	0,611	0,078-1,695	73	0,793
	elektiivinen sektio	0,694	0,383	0,603	0,179-1,806	26	

Lapsen syntymän aikaan äidin serologian, genitaalialueen, suun ja maidon sekä istukan ja napasolujen HPV-statusia verrattiin kahden kuukauden maitonäytteiden sisältämiin HPV16 vasta-ainemääriin (taulukko 16). Lapsen syntymän aikaisilla HPV-statusilla eri puolilla äidin kehoa ei ole yhteyttä äidinmaidon HPV16 vasta-ainekoostumukseen kahden kuukauden päästä lapsen syntymästä.

Taulukko 16: Äidin HPV status ennen lapsen syntymää tai heti syntymän jälkeen eri puolilla kehoa ja sen vaikutus äidinmaitoon erittyvän HPV16 vasta-aineen määrään kahden kuukauden kuluttua synnytyksestä. p-arvo määritetty käyttämällä Mann-Whitney testiä. Tilastollinen merkitsevyys, kun p-arvo < 0,05. (n=99)

Absorbanssi (492 nm)		Keskiarvo	Keskihajonta	Mediaani	Vaihteluväli	N	p-arvo
Istukka HPV-status	HPV+	0,736	0,236	0,706	0,379-1,024	6	0,411
	HPV-	0,684	0,359	0,579	0,078-1,695	86	
Istukka HPV-tyyppi	HPV6	0,817	0,212	0,817	0,667-0,967	2	
	HPV16	0,562	0,259	0,562	0,379-0,745	2	
Napasolut HPV-status	HPV+	0,721	0,321	0,84	0,358-0,967	3	0,772
	HPV-	0,701	0,37	0,621	0,078-1,806	86	
Napasolut HPV-tyyppi	HPV6	0,903	0,089	0,903	0,840-967	2	
	HPV16	0,358	-	0,358	-	1	
Serologia HPV-status	seroposiivinen	0,712	0,356	0,631	0,078-1,604	35	0,669
	seronegatiivinen	0,704	0,373	0,61	0,179-1,806	64	
Pre Genitaali HPV-status	HPV+	0,794	0,339	0,716	0,237-1,604	15	0,194
	HPV-	0,691	0,37	0,581	0,078-1,806	84	
Pre Genitaali HPV-tyyppi	HPV16	0,809	0,341	0,694	0,454-1,604	11	0,242
	HPV- tai muu	0,694	0,368	0,6	0,078-1,806	88	
Pre Suu HPV-status	HPV+	0,638	0,348	0,5	0,078-1,263	17	0,401
	HPV-	0,726	0,369	0,631	0,179-1,806	81	
Pre Suu HPV-tyyppi	HPV16	0,684	0,353	0,716	0,078-1,263	13	0,987
	HPV- tai muu	0,715	0,369	0,611	0,179-1,806	85	
Maito HPV-status	HPV+	0,671	0,423	0,578	0,078-1,406	10	0,759
	HPV-	0,695	0,341	0,621	0,179-1,695	84	
Maito HPV-tyyppi	HPV-	0,695	0,341	0,621	0,179-1,695	84	
	6	0,487	0,361	0,459	0,078-0,954	4	
	16	0,793	0,447	0,638	0,249-1,406	6	

Kaksi kuukautta lapsen syntymän jälkeen selvitettyjen äidin genitaalialueen, suun ja maidon HPV-statusten yhteyttä äidinmaitoon erittyvien HPV16 vasta-aineiden määrään selvitettiin vertaamalla HPV-statusta määritettyihin äidinmaidon HPV16 vasta-ainetasoihin samassa aikapisteessä (taulukko 17). Äidin aktiivisella HPV-infektioilla ei ole tilastollisesti merkitsevää vaikutusta maitoon erittyvien HPV16 vasta-aineiden määrään. Äidin genitaalialueen HPV-statusten välinen ero HPV16 vasta-aineiden määrissä on lähellä tilastollisesti merkitsevää, mutta ei kuitenkaan alita vaadittua p-arvon 0,05 rajaa. Äideillä, jotka olivat genitaalialueella HPV-positiivisia kahden kuukauden aikapisteessä, oli keskimäärin enemmän HPV16 vasta-aineita maidossa kuin HPV-negatiivisilla. Sen sijaan päinvastainen on havaittavissa suun HPV-infektion kanssa. Äideillä, joiden suun HPV-status oli positiivinen, oli keskimäärin vähemmän

HPV16 vasta-aineita maidossa kuin HPV-negatiivisilla. HPV16 vasta-aineiden vaihteluväli on kuitenkin pienempi genitaalialueella ja suussa positiivisella HPV-statusella verrattuna negatiiviseen.

*Taulukko 17: Äidin HPV-status kaksi kuukautta lapsen syntymän jälkeen eri puolilla kehoa ja sen vaikutus maitoon erittyvien HPV16 vasta-aineiden määrään samassa aikapisteessä. p-arvo määritetty käyttämällä Mann-Whitney testiä. Tilastollinen merkitsevyys, kun p-arvo < 0,05. (n=99)*

Absorbanssi (492 nm)		Keskiarvo	Keskihajonta	Mediaani	Vaihteluväli	N	p-arvo
Genitaali HPV-status	HPV+	0,899	0,422	0,716	0,379-1,604	13	0,068
	HPV-	0,676	0,351	0,591	0,078-1,806	85	
Genitaali HPV-tyyppi	HPV16	0,780	0,501	0,468	0,379-1,521	5	0,994
	HPV- tai muu	0,701	0,362	0,611	0,078-1,806	93	
Suu HPV-status	HPV+	0,596	0,261	0,533	0,240-1,230	20	0,209
	HPV-	0,734	0,389	0,635	0,078-1,806	77	
Suu HPV-tyyppi	HPV16	0,594	0,290	0,511	0,240-1,230	16	0,189
	HPV-	0,734	0,389	0,635	0,078-1,806	77	
Maito HPV-status	HPV+	0,605	0,297	0,552	0,078-1,331	19	0,267
	HPV-	0,727	0,377	0,633	0,179-1,806	78	

Erillisinä tapauksina tarkasteltujen äitien HPV-statuset olivat pääasiassa negatiiviset lapsen syntymän aikaan (taulukko 18). Näytteen 12 luovuttaja oli serologialtaan HPV-positiivinen ja molempien äitien suut olivat HPV-positiiviset lapsen syntymän aikaan. Kummankin äidin suun HPV-status säilyi positiivisena vielä kaksi kuukautta lapsen syntymän jälkeen. Emme kuitenkaan tiedä, onko sama infektio kestänyt kaksi kuukautta, vai onko suuhun ilmennyt uusia infektiota. Näytteen 12 antaneella äidillä lapsen syntymän aikainen negatiivinen genitaalialueen HPV-status oli kahden kuukauden aikapisteessä muuttunut positiiviseksi. Äitien maidoista ei löytynyt HPV-viruksen DNA:ta kummassakaan aikapisteessä.

*Taulukko 18: Erillisinä tapauksina tarkasteltujen äitien HPV-status eri puolilla kehoa lapsen syntymän aikaan ja kaksi kuukautta syntymästä. Näiden äitien totaali IgA- ja HPV16-tasot olivat paljon muita näytteitä suuremmat.*

	HPV16 (492 nm)	Istukka	Napa-solut	Serologia Baseline	Maito Baseline	Genitaali Baseline	Suu Baseline	Maito 2 kk	Genitaali 2 kk	Suu 2 kk
Näyte 10	20,760	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Näyte 12	37,840	-	-	+	-	-	+	-	+	+

### 3.5.2 Äidinmaidon HPV16 vasta-aineiden vaikutus lapsen HPV infektiin

Äidinmaitoon erittyvien HPV16 vasta-aineiden mahdollista yhteyttä lapsen HPV-infektioon ja sen kehitykseen selvitettiin tässä tutkimuksessa vertaamalla lapsen seerumin HPV-status äidinmaidon HPV16 vasta-ainemääriin (taulukko 19). HPV16 vasta-aineiden määrä äidinmaidossa kahden kuukauden kuluttua lapsen syntymästä ei tämän tutkimuksen tuloksien mukaan ole yhteydessä lapsen serologian HPV-statusiin missään vaiheessa lapsen ensimmäisten kolmen elinvuoden aikana. Äidinmaidon HPV16 vasta-aineilla ei myöskään ole tilastollisesti merkitsevää yhteyttä lapsen HPV16 serokonversioon, eli omien vasta-aineiden tuotantoon, eikä lapsen serologiseen HPV-statusiin ja konversion lopulliseen tilaan kolmen vuoden ikään mennessä.

Lapsilta kerätyistä verinäytteistä oli aikaisemmissa määritetty HPV16 L1 vasta-aineiden pitoisuudet, joita verrattiin tässä tutkimuksessa määritettyihin äidinmaidon HPV16 vasta-ainetasoihin. Korrelaatio äidinmaidon ja lapsen seerumin HPV16 vasta-aineiden välillä oli samansuuntaista kaikissa aikapisteissä 1-36 kk välillä. Samansuuntainen korrelaatio oli voimakkainta 1 kk kohdalla ja tämä oli myös ainoa aikapiste, jossa korrelaatio äidinmaidon ja lapsen serologian HPV16 vasta-ainetasoissa on tilastollisesti merkitsevää. Muissa aikapisteissä korrelaatiota ei voida yleistää aineistoa suurempaan populaatioon.

HPV16-positiivisten lasten määrä oli suurinta kuukauden (17 %, 11/65) ja kahden kuukauden (16 %, 11/70) aikapisteissä. Tämän jälkeen HPV-positiivisten tapausten määrä vaihteli 2-9 % välillä.

Taulukko 19: 2kk äidinmaidon yhteys ja vaikutus lapsen serologian HPV-statukseen. Tilastollinen merkitsevyys, kun p-arvo < 0,05. (n=99)

Lapsen serologia		Keskiarvo	Keskijajonta	Mediaani	Vaihteluväli	N	p-arvo	Korrelaatio-kerroin	Testi
Äidinmaidon HPV16 vasta-aineet, 2 kk (492 nm)		0,706	0,367	0,611	0,078-1,806	99			
Serokonversio, HPV16L1	on	0,707	0,282	0,620	0,338-1,068	8	0,574		Kruskal-Wallis
	ei	0,725	0,388	0,635	0,078-1,806	79			
	negatiivinen konversio	0,576	0,247	0,589	0,240-1,082	10			
Serologinen lopputulos, HPV16L1	aina HPV16-	0,709	0,378	0,635	0,078-1,806	70	0,506		Kruskal-Wallis
	serokonversio	0,672	0,246	0,620	0,338-1,068	8			
	persistoi positiivisena	0,465	0,217	0,467	0,240-0,688	4			
	serologinen vaimentuminen	0,793	0,407	0,601	0,379-1,604	12			
HPV16L1, 1 kk	HPV16+	0,629	0,233	0,611	0,240-1,082	11	0,746	0,257	Mann-Whitney, Spearman
	HPV16-	0,657	0,379	0,552	0,078-1,806	54	0,038		
HPV16L1, 2 kk	HPV16+	0,751	0,469	0,611	0,240-1,604	11	0,897	0,099	Mann-Whitney, Spearman
	HPV16-	0,684	0,362	0,571	0,078-1,806	59	0,415		
HPV16L1, 6 kk	HPV16+	0,680	0,098	0,680	0,611-0,749	2	0,692	0,096	Mann-Whitney, Spearman
	HPV16-	0,716	0,383	0,601	0,078-1,806	82	0,385		
HPV16L1, 12 kk	HPV16+	0,792	0,215	0,792	0,540-1,068	5	0,345	0,116	Mann-Whitney, Spearman
	HPV16-	0,721	0,376	0,635	0,078-1,806	79	0,293		
HPV16L1, 24 kk	HPV16+	0,597	0,233	0,522	0,338-1,068	7	0,334	0,111	Mann-Whitney, Spearman
	HPV16-	0,755	0,389	0,689	0,078-1,806	70	0,334		
HPV16L1, 36 kk	HPV16+	0,794	0,316	0,804	0,503-1,068	4	0,708	0,047	Mann-Whitney, Spearman
	HPV16-	0,753	0,390	0,694	0,078-1,806	67	0,696		

Lapsen suun HPV-statusta eri aikapisteissä verrattiin kaksi kuukautta lapsen syntymästä kerättyjen maitonäytteiden HPV16 vasta-ainetasoihin (taulukko 20). Äidinmaidon sisältämät HPV16 vasta-ainetasot olivat keskimäärin hyvin samanlaiset sekä HPV-positiivisilla, että HPV-negatiivisilla lapsilla kaikissa aikapisteissä. Tilastollisesti merkitsevää eroa ei ole havaittavissa missään aikapisteessä lapsen kuuden ensimmäisen elinvuoden aikana.



Ensimmäisen kuuden elinkuukauden aikana lapset, joiden suun HPV-status oli positiivinen, saivat keskimäärin enemmän HPV16 vasta-aineita maidosta kahden kuukauden iässä, kuin HPV-negatiiviset. 12 ja 32 kuukauden kohdalla tilanne on kuitenkin päinvastainen eli lapset, jotka ovat yhden ja kahden vuoden iässä HPV-negatiivisia, saivat keskimäärin enemmän HPV16 vasta-aineita maidosta kahden kuukauden iässä kuin HPV-positiiviset. Ero ei kuitenkaan ole tilastollisesti merkitsevää.

HPV-positiivisten lasten määrä säilyy melko tasaisena kuuden vuoden ikään asti. Lasten suun HPV-positiivisuutta esiintyi eniten heti syntymän jälkeen (24 %, 24/99) ja kuukauden päästä (24 %, 23/95) lapsen syntymästä. HPV-positiivisten tapausten määrä säilyi muissa aikapisteissä 5-18 % välillä.

*Taulukko 20: 2kk äidinmaidon yhteys ja vaikutus lapsen suun HPV-statukseen. p-arvot määritettiin käyttämällä Mann-Whitney testiä. Tilastollinen merkitsevyys, kun p-arvo < 0,05. (n=99)*

Lapsen Suu		Keskiarvo	Keskihajonta	Mediaani	Vaihteluväli	N	p-arvo
<b>Äidinmaidon HPV16 vasta-aineet, 2 kk (492 nm)</b>		0,706	0,367	0,611	0,078-1,806	99	
<b>Baseline</b>	HPV+	0,741	0,305	0,702	0,240-1,406	24	0,287
	HPV-	0,696	0,384	0,591	0,078-1,806	75	
<b>Kotiinlähtö</b>	HPV+	0,803	0,366	0,635	0,311-1,631	11	0,215
	HPV-	0,692	0,368	0,610	0,078-1,806	81	
<b>1 kk</b>	HPV+	0,720	0,297	0,701	0,311-1,331	23	0,532
	HPV-	0,695	0,377	0,600	0,078-1,806	72	
<b>2 kk</b>	HPV+	0,836	0,442	0,667	0,358-1,806	15	0,241
	HPV-	0,686	0,344	0,600	0,078-1,631	80	
<b>6 kk</b>	HPV+	0,756	0,420	0,704	0,288-1,631	11	0,838
	HPV-	0,703	0,356	0,611	0,078-1,806	81	
<b>12 kk</b>	HPV+	0,704	0,328	0,623	0,288-1,406	8	0,886
	HPV-	0,725	0,375	0,635	0,078-1,806	85	
<b>24 kk</b>	HPV+	0,705	0,104	0,669	0,631-0,854	4	0,737
	HPV-	0,741	0,390	0,660	0,078-1,806	80	
<b>36 kk</b>	HPV+	0,777	0,392	0,667	0,358-1,695	10	0,737
	HPV-	0,736	0,384	0,667	0,078-1,806	73	
<b>72 kk</b>	HPV+	0,784	0,298	0,702	0,373-1,143	12	0,258
	HPV-	0,711	0,407	0,601	0,078-1,806	54	

Lapsen genitaalialueen HPV-statusta eri aikapisteissä verrattiin kaksi kuukautta lapsen syntymästä kerättyjen maitonäytteiden HPV16 vasta-ainetasoihin (taulukko 21). Tilastollisesti merkitsevää eroa ei ole havaittavissa missään aikapisteessä. Lapsen genitaalialueen HPV-statuksella ei siis voida sanoa olevan yhteyttä lapsen äidinmaidosta saamien HPV16 vasta-aineiden määrien kanssa.

Suurinta hajontaa maidon HPV16 vasta-aineiden keskiarvoissa lapsen genitaalialueen HPV-statuksen suhteen oli havaittavissa kuukauden päästä lapsen syntymästä. Tässä aikapisteessä HPV-positiiviset lapset saivat keskimäärin selvästi enemmän HPV16 vasta-aineita maidosta kuin HPV-negatiiviset lapset. HPV-positiivisten tapausten määrä mitatuissa aikapisteissä vaihteli 6-15 % välillä.

*Taulukko 21: 2kk äidinmaidon yhteys ja vaikutus lapsen genitaalialueen HPV-statukseen. p-arvot määritettiin käyttämällä Mann-Whitney testiä. Tilastollinen merkitsevyys, kun p-arvo < 0,05. (n=99)*

Lapsen genitaalialue		Keskiarvo	Keskihajonta	Mediaani	Vaihteluväli	N	p-arvo
<b>Äidinmaidon HPV16 vasta-aineet, 2 kk (492 nm)</b>		0,706	0,367	0,611	0,078-1,806	99	
<b>Baseline</b>	HPV+	0,721	0,398	0,701	0,078-1,263	11	0,778
	HPV-	0,699	0,366	0,610	0,179-1,806	83	
<b>Kotiinlähtö</b>	HPV+	0,730	0,396	0,694	0,078-1,236	13	0,593
	HPV-	0,672	0,356	0,569	0,179-1,806	76	
<b>1 kk</b>	HPV+	0,980	0,498	1,099	0,358-1,604	5	0,198
	HPV-	0,704	0,361	0,611	0,078-1,806	85	
<b>2 kk</b>	HPV+	0,716	-	0,716	-	1	
	HPV-	0,707	0,343	0,685	0,179-1,280	14	

## 4 Tulosten tarkastelu

### 4.1 Totaali IgA vasta-ainemäärityksen optimointi

Näytteistä valmistettiin ELISA-määrityksen olosuhteiden optimointivaiheessa useita erilaisia laimennoksia. Alkuperäisten näytteiden IgA pitoisuudet laskettiin standardisuoran, näytteistä mitattujen absorbanssien ja laimennoskertoimien avulla. Samasta näytteestä valmistettujen laimennosten lasketut lopulliset IgA pitoisuudet vastasivat määrityskohtaisesti hyvin toisiaan. Optimointivaiheessa standardilaimennosten valmistus ei onnistunut samalla tavalla jokaisessa määrityksessä, minkä vuoksi standardisuorat poikkesivat selvästi toisistaan. Standardisuoran yhtälöitä käytettiin näytteiden IgA pitoisuuksien laskemiseen määrityskohtaisesti. Toisistaan poikkeavien yhtälöiden vuoksi ensimmäisessä ja toisessa määrityksessä 1:10 000 laimennoksien avulla lasketut IgA pitoisuudet eivät vastanneet toisiaan, vaikka näytteet ja määrityksen olosuhteet olivat samat. Standardilaimennoksien valmistukseen kiinnitettiin tarkempaa huomiota ja suoran lineaarinen alue saatiin pysymään vakiona lopuissa määrityksissä. Optimointiin valittujen näytteiden IgA pitoisuudet olivat väliltä 210–330 µg/ml. Tämä tulos vastaa kirjallisuudesta löydettyä suomalaisten naisten äidinmaidon keskimääräistä IgA pitouutta (Rio-Aige ja muut 2021).

Tulosten vertailukelpoisuuden varmistamiseksi päätimme suorittaa varsinaiset määritykset valmistamalla uudet supernatantit kaikista määritettävistä maitonäytteistä. Osasta näytteistä oli saatavilla aikaisemmissa tutkimuksissa käytettyjä maitonäytteiden supernatantteja. Näitä näytteitä oli säilytetty –70 °C pakastimessa rasvan poistamisen jälkeen. Testasimme määritystä muutamalla vanhalla supernatantilla, mutta jo näytteiden sulattamisen yhteydessä huomasimme pieniä maitorasvan jäämiä näytteissä. Vanhoista supernatanteista saadut absorbanssit ja lasketut IgA pitoisuudet vastasivat uusilla supernatanteilla saatuja tuloksia samoilla näytteillä. Koska meillä ei ollut tietoa pitkäaikaisen pakastuksen vaikutuksista HPV16 vasta-aineisiin rasvan poistamisen jälkeen, emme päätyneet käyttämään vanhoja supernatantteja määrityksissä. Tällä tavoin pyrimme varmistamaan, että kaikki näytteet oli valmistettu samalla tavalla ja määritystulosten vertailtavuus säilyi mahdollisimman hyvänä eri näytteiden välillä.

## 4.2 Totaali IgA vasta-aineet äidinmaidossa

Tässä tutkimuksessa määritettyjen totaali IgA vasta-ainepitoisuuksien keskiarvo ilman kahta poikkeavaa näytettä oli 460 µg/ml. Tämä tulos vastaa aikaisempien tutkimusten tuloksia suomalaisten naisten äidinmaidon IgA pitoisuuksista (Rio-Aige ja muut 2021). Aikaisemmat tutkimukset ovat osoittaneet, että äidinmaitoon erittyvien IgA vasta-aineiden määrissä on selkeitä eroja sekä yksilöiden että eri maiden välillä. Suomessa IgA vasta-aineiden määrät äidinmaidossa ovat melko alhaiset verrattuna moneen muuhun maahan (Rio-Aige ja muut 2021.) IgA vasta-aineiden keskimääräinen pitoisuus maidossa on mahdollisesti riippuvainen äidin elinympäristöstä tai perimästä. Tässä tutkimuksessa vertasimme äidin elintavoista tupakointia ja alkoholinkäyttöä mitattuihin totaali IgA määriin, mutta emme pystyneet osoittamaan riippuvuutta näiden tekijöiden välillä. Äidin atopiallaakaan ei ollut tilastollisesti merkitsevää yhteyttä maidon IgA vasta-aineiden määriin, mutta atopiaa sairastavilla äideillä oli silti keskimäärin vähemmän IgA vasta-aineita maidossa.

## 4.3 HPV16 spesifisen vasta-ainemäärityksen optimointi

HPV16 spesifisen määrityksen pystytys ja optimointi aloitettiin selvittämällä, soveltuuko HPV16 L1 rekombinanttiproteiini käytettäväksi antigeeninä kuoppalevyjen päällystämiseen. Kontrollilevy päällystettiin normaalisti antigeenillä ja kuoppiin lisättiin näytteiden sijaan L1 vasta-ainetta. Kontrollilevyltä mitatut absorbanssit kasvoivat samassa suhteessa antigeenin päällystyspitoisuuden kanssa. Päällystyksessä käytetylle antigeenille spesifisen vasta-aineen sitoutuminen päällystettyihin kuoppiin voitiin tulkita tarkoittavan päällystykseen onnistumista. Tulos varmisti HPV16 L1 rekombinanttiproteiinin soveltuvuuden käytettäväksi kuoppalevyjen päällystyksessä antigeeninä.

Optimoinnin edetessä vertasimme keskenään kahta eri HPV16 L1 rekombinanttiproteiinia. Optimoinnit aloitettiin MyBioSource:n HPV16 L1 rekombinanttiproteiinilla, mutta varsinaiset määritykset suoritettiin käyttämällä Abcam:in HPV16 L1 rekombinanttiproteiinia, sillä Abcam:in rekombinanttiproteiinilla näytteiden antamat vasteet nousivat melkein kaksinkertaisiksi. Valmistajan mukaan Abcam:in HPV16L1 rekombinanttiproteiini on natiivimuotoinen, kun taas MyBioSource vastaava antigeeni oli denaturoidussa muodossa. Tämä ero näiden kahden HPV16 L1 rekombinanttiproteiinien välillä on todennäköisesti syynä antigeenien vaste-eroihin.

Tässä työssä meillä ei ollut käytettävissä kontrolleja HPV16 vasta-aineille. Tämän vuoksi yritimme valita optimoinnin alkuvaiheessa maitonäytteitä, jotka olisivat voineet toimia negatiivisina kontrolleina HPV16 vasta-aineelle. Näytteet valittiin aikaisempien tutkimustulosten pohjalta ja valinnassa tarkastelimme maidon sisältämää HPV16 DNA:ta, äidin seerumin, genitaalialueen tai suun HPV-statusta. Vasteet, joita saimme valituista mahdollisista negatiivisista näytteistä, vastasivat kuitenkin muiden, oletettujen positiivisten näytteiden vasteita. Joissain tapauksissa mahdollisen negatiivisen näytteen vasteet ylittivät huomattavasti oletetun positiivisen näytteen vasteet. Äidinmaitonäytteiden joukosta ei lopulta löytynyt yhtään varmennettua negatiivista näytettä ja määritykset suoritettiin lopulta ilman negatiivisia tai positiivisia kontrolleja. Vaikka kaikki tutkimukseen osallistuneet äidit olivat rokottamattomia HPV-viruksia vastaan, HPV-infektioiden yleisyyden vuoksi on täysin mahdollista, että äitien joukossa ei ollut ketään, joka ei jossain elämänsä vaiheessa olisi jo sairastanut HPV16 infektiota (Giuliano ja muut 2015; Koskimaa ja muut 2012).

Menetelmää optimoitaessa suurimmaksi haasteeksi osoittautui maitonäytteiden aiheuttama tausta. Optimoinnin ensimmäisillä määrityskerroilla näytteiden taustat nousivat samalle tasolle antigeenillä päällystetyistä kuopista mitattujen HPV16 vasta-aineiden antamien signaalien kanssa. Kuoppien päällystyspitoisuuksilla ei myöskään näyttänyt olevan merkitystä vasteen voimakkuuteen, mutta koska antigeenin soveltuvuus päällystykseen oli todennettu, keskityimme optimoimaan kuoppien blokkausta, pesuja, inkubaatio-olosuhteita ja -aikoja sekä näytteiden laimennoksia.

Kuoppalevyjen blokkauksessa testattiin maito- ja BSA-pohjaisia puskuriliuoksia. Näistä kahdesta valittiin BSA-pohjainen blokkauspuskuri, sillä näytteiden taustat saatiin laskemaan sillä parhaiten. Kuitenkin näytteiden taustat olivat vielä paljon korkeammat kuin pelkän BSA-liuoksen, minkä vuoksi blokkauspuskurin optimointia jatkettiin vaihtamalla puskurin pohjana toiminut PBS-liuos happamampaan ja lisäämällä siihen vielä Tween20:tä (Studentsov ja muut 2002). Näytteiden inkubaation jälkeiseen pesuun lisättiin vielä levyn ravistelu pesujen välissä. Näiden muutosten avulla näytteiden taustat onnistuttiin laskemaan hyvin lähelle pelkän BSA:n tasoa ja näytteiden HPV16 vasta-ainevasteet kasvoivat samassa suhteessa antigeenin päällystyspitoisuuteen.

Määritystä optimoitaessa emme optimoineet primääri- tai sekundäärivasta-aineiden pitoisuuksia. Määritys saatiin toimivaksi jo edellä mainituilla muutoksilla, mutta mikäli määrityksen optimointia jatketaan tulevaisuudessa, primääri- ja sekundäärivasta-aineiden pitoisuuksien optimoinnilla määritystä voitaisiin vielä parantaa.

#### 4.4 HPV16 spesifiset vasta-aineet äidinmaidossa

Tutkimukseen osallistuneet äidit olivat kaikki rokottamattomia kaikkia HPV-virustyyppettä vastaan. Määrityksessä ei ollut käytössä kontrolleja HPV16 vasta-aineille, minkä vuoksi äidinmaitonäytteiden HPV16 vasta-ainemäärästä pystyttiin määrittämään vain absorbanssit ja vasta-ainetasot suhteessa totaali IgA pitoisuuteen. HPV16 vasta-ainetasot eivät olleet suoraan verrannollisia äidinmaitonäytteiden totaali IgA pitoisuuksiin. Esimerkiksi näytteet, jotka sisälsivät muita enemmän IgA vasta-aineita ja jotka saivat myös huomattavasti suuremmat absorbanssi-arvot HPV16 määrityksestä, sisälsivät totaali IgA määrään suhteutettuna keskimääräistä vähemmän HPV16 vasta-aineita. Kuitenkin korrelaatio äidinmaidon IgA vasta-ainepitoisuuksien ja HPV16 vasta-ainetasojen välillä oli lievästi samansuuntaista ja tilastollisesti merkitsevää.

Äidin ikä, aikaisempien synnytysten lukumäärä, synnytystapa tai äidin kehon HPV-status lapsen syntymän aikaan eivät vaikuttaneet äidinmaidon HPV16 vasta-aineiden erittymiseen kaksi kuukautta lapsen syntymän jälkeen. Myöskään samassa kahden kuukauden aikapisteessä määritetyt äidin HPV-status suussa, genitaalialueella ja maidossa, eivät olleet yhteydessä HPV16 vasta-ainetasoihin. Äidin aktiivisella HPV16-infektiolla ei siis löydetty yhteyttä maitoon erittyvien HPV16 vasta-ainetasojen kanssa. Lapsen voi siis olla mahdollista saada äidinmaidon välityksellä HPV16 vasta-aineita, vaikka äiti olisi sairastanut infekktion hyvissä ajoin ennen lapsen syntymää tai raskautta.

Tämän tutkimuksen tulosten perusteella äidin tupakoiminen oli ainut muuttuja, joka oli yhdistettävissä tilastollisesti merkitsevään eroon maitoon erittyvien HPV16 vasta-aineiden määrissä. Tupakoivilla äideillä HPV16 vasta-aineita erittyi maitoon enemmän, kuin tupakoimattomilla, minkä lisäksi vasta-aineiden määrä kasvoi, mitä useamman savukkeen äiti poltti päivässä. Tupakoinnilla ei kuitenkaan havaittu olevan yhteyttä totaali IgA määriin. HPV16 vasta-aineiden suurempi erittyminen maitoon tupakoivilla äideillä ei siis näytä olevan yhteydessä IgA vasta-aineiden erittymisen määrään.

Plasmasolut, jotka valmistavat äidinmaitoon eritettävät vasta-aineet ovat peräisin eri puolilta äidin kehoa (Halsey ja muut 1983). Suurin osa näistä plasmasoluista on kuitenkin lähtöisin äidin limakalvoilta, kuten suolistosta ja hengitysteistä (Wilson ja Butcher 2004). Koska tupakointi vaikuttaa merkittävästi ihmisen hengitysteihin, on mahdollista, että tupakoivilla äideillä maitorauhaseen kulkeutuvien plasmasolujen lukumäärä tai variaatio poikkeavat tupakoimattomien äitien tilanteesta.

#### **4.5 Äidinmaidon HPV16 vasta-aineiden merkitys lapselle**

Äidinmaidon sisältämien HPV16 vasta-aineiden määrällä ei löydetty olevan yhteyttä lapsen HPV-infektion kehitykseen. Äidinmaidon HPV16 vasta-ainemäärillä ei ollut yhteyttä lapsen genitaalialueen HPV-statukseen kahden ensimmäisen elinkuukauden aikana, lapsen HPV16 serologiaan kolmen ensimmäisen elinvuoden aikana tai lapsen suun HPV-statukseen kuuden ensimmäisen elinvuoden aikana. Maitonäytteiden HPV16 vasta-ainepitoisuus määritettiin ainoastaan maitonäytteistä, jotka oli kerätty kaksi kuukautta lapsen syntymän jälkeen. Kahden kuukauden aikapisteessä lapset, joilla oli positiivinen HPV-status suussa, genitaalialueella tai seerumissa saivat keskimäärin enemmän HPV16 vasta-aineita äidinmaidosta kuin lapset, joilla oli negatiivinen HPV-status. Erot vasta-ainemäärissä eivät kuitenkaan olleet tilastollisesti merkitseviä. Positiivisten HPV-tapauksien määrät laskivat suussa, genitaalialueella ja serologisesti lasten kasvaessa. Eniten HPV-positiivisia tapauksia oli lapsen syntymän ja kahden kuukauden aikapisteen välillä.

## 5 Päätelmät

Tällä hetkellä ei ole olemassa aikaisempia tutkimuksia tai tietoa HPV16 vasta-aineiden siirtymisestä äidiltä lapselle maidon välityksellä. Tämän tutkimuksen tulosten mukaan äidinmaitoon kuitenkin erittyy HPV16 vasta-aineita. HPV16 vasta-aineiden määrä maidossa ei kuitenkaan ole yhteydessä äidin kehon HPV-statukseen tai äidin seerumista löytyvien HPV16 vasta-aineiden määrään. Äidin tupakoiminen on ainoa tässä tutkimuksessa löydetty HPV16 vasta-ainemääriin yhteydessä oleva tekijä. Tupakoivilla äideillä HPV16 vasta-aineiden erityys maitoon oli suurempaan kuin tupakoimattomilla äideillä. Tupakoinnilla ei kuitenkaan huomattu olevan yhteyttä maitoon erittyvien IgA vasta-aineiden kokonaismäärään.

HPV16 vasta-aineiden määrällä äidinmaidossa kaksi kuukautta lapsen syntymän jälkeen ei löydetty olevan yhteydessä lapsen HPV-infektion kehittymiseen lapsen kuuden ensimmäisen elinvuoden aikana. Lasten HPV-positiivisuus on yleisintä heti lapsen syntymän jälkeen. Vasta-aineiden määrä äidinmaidossa on myös korkeimmillaan heti lapsen syntymän jälkeen, minkä vuoksi ternimaidon vasta-ainekoostumuksen vertailu lapsen HPV-infektion kehitykseen olisi mielenkiintoinen seuraava tutkimuskohde.



## 6 Lähteet

- Aagaard, K., Ma, J., Antony, K. M., Ganu, R., Petrosino, J. & Versalovic, J. (2014) The placenta harbors a unique microbiome. *Science Translational Medicine* **6**:237–265.
- af Geijersstam, V., Eklund, C., Wang, Z., Sapp, M., Schiller, J. T., Dillner, J. & Dillner, L. (1999) A survey of seroprevalence of human papillomavirus types 16, 18 and 33 among children. *Int J Cancer* **80**:489–493.
- Akhter, H., Aziz, F., Ullah, F. R., Ahsan, M. & Islam, S. N. (2020) Immunoglobulins content in colostrum, transitional and mature milk of Bangladeshi mothers: Influence of parity and sociodemographic characteristics. *J Mother Child* **24**:8–15.
- Alhajj, M., Zubair, M. & Farhana, A. (2024) Enzyme Linked Immunosorbent Assay. Teoksessa *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Noudettu osoitteesta <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922/>
- Andreas, N. J., Kampmann, B. & Mehring Le-Doare, K. (2015) Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Hum Dev* **91**:629–635.
- Atyeo, C. & Alter, G. (2021) The multifaceted roles of breast milk antibodies. *Cell* **184**:1486–1499.
- Aydin, S. (2015) A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides* **72**:4–15.
- Ballard, O. & Morrow, A. L. (2013) Human milk composition: Nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am* **60**:49–74.
- Bester, A. C., Roniger, M., Oren, Y. S., Im, M. M., Sarni, D., Chaoat, M., ... Kerem, B. (2011) Nucleotide deficiency promotes genomic instability in early stages of cancer development. *Cell* **145**:435–446.

- Bezirtzoglou, E., Tsiotsias, A. & Welling, G. W. (2011) Microbiota profile in feces of breast- and formula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Anaerobe* **17**:478–482.
- Brandtzaeg, P. (2010) The mucosal immune system and its integration with the mammary glands. *J Pediatr* **156**:S8-15.
- Brandtzaeg, P. (2013) Secretory IgA: Designed for Anti-Microbial Defense. *Front Immunol* **4**:222.
- Buck, C. B., Day, P. M. & Trus, B. L. (2013) The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology* **445**:169–174.
- Bunker, J. J., Erickson, S. A., Flynn, T. M., Henry, C., Koval, J. C., Meisel, M., ... Bendelac, A. (2017) Natural polyreactive IgA antibodies coat the intestinal microbiota. *Science* **358**.
- Castellsagué, X., Drudis, T., Cañadas, M. P., Goncé, A., Ros, R., Pérez, J. M., ... Bosch, F. X. (2009) Human Papillomavirus (HPV) infection in pregnant women and mother-to-child transmission of genital HPV genotypes: A prospective study in Spain. *BMC Infect Dis* **9**:74.
- Cerutti, A. & Rescigno, M. (2008) The biology of intestinal immunoglobulin A responses. *Immunity* **28**:740–750.
- Coppa, G. V., Gabrielli, O., Pierani, P., Catassi, C., Carlucci, A. & Giorgi, P. L. (1993) Changes in carbohydrate composition in human milk over 4 months of lactation. *Pediatrics* **91**:637–641.
- Cornet, I., Gheit, T., Franceschi, S., Vignat, J., Burk, R. D., Sylla, B. S., ... Group, the I. H. V. S. (2012) Human Papillomavirus Type 16 Genetic Variants: Phylogeny and Classification Based on E6 and LCR. *Journal of Virology* **86**:6855.
- Czosnykowska-Łukacka, M., Lis-Kuberka, J., Królak-Olejnik, B. & Orczyk-Pawiłowicz, M. (2020) Changes in Human Milk Immunoglobulin Profile During Prolonged Lactation. *Front Pediatr* **8**:428.

- de Martel, C., Georges, D., Bray, F., Ferlay, J. & Clifford, G. M. (2020) Global burden of cancer attributable to infections in 2018: A worldwide incidence analysis. *Lancet Glob Health* **8**:180–190.
- Demers-Mathieu, V., Huston, R. K., Markell, A. M., McCulley, E. A., Martin, R. L., Spooner, M. & Dallas, D. C. (2019) Differences in Maternal Immunoglobulins within Mother's Own Breast Milk and Donor Breast Milk and across Digestion in Preterm Infants. *Nutrients* **11**:920.
- Giuliano, A. R., Nyitray, A. G., Kreimer, A. R., Pierce Campbell, C. M., Goodman, M. T., Sudenga, S. L., ... Franceschi, S. (2015) EUROGIN 2014 roadmap: Differences in human papillomavirus infection natural history, transmission and human papillomavirus-related cancer incidence by gender and anatomic site of infection. *Int J Cancer* **136**:2752–2760.
- Godwin, L., Sinawe, H. & Crane, J. S. (2024) Biochemistry, Immunoglobulin E. Teoksessa *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Noudettu osoitteesta <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541058/>
- Halsey, J. F., Mitchell, C. S. & McKenzie, S. J. (1983) The origins of secretory IgA in milk: A shift during lactation from a serum origin to local synthesis in the mammary gland. *Ann N Y Acad Sci* **409**:452–460.
- Hanson, L. Å. & Korotkova, M. (2002) The role of breastfeeding in prevention of neonatal infection. *Seminars in Neonatology* **7**:275–281.
- Humans, I. W. G. on the E. of C. R. to (2007) Human Papillomavirus (HPV) Infection. Teoksessa *Human Papillomaviruses*. International Agency for Research on Cancer. Noudettu osoitteesta <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK321770/>
- Hurst, N. M. (2007) Recognizing and treating delayed or failed lactogenesis II. *J Midwifery Womens Health* **52**:588–594.

- Jones, C., Pollock, L., Barnett, S. M., Battersby, A. & Kampmann, B. (2014) The relationship between concentration of specific antibody at birth and subsequent response to primary immunization. *Vaccine* **32**:996–1002.
- Juncker, H. G., Mulleners, S. J., van Gils, M. J., de Groot, C. J. M., Pajkrt, D., Korosi, A., ... van Keulen, B. J. (2021) The Levels of SARS-CoV-2 Specific Antibodies in Human Milk Following Vaccination. *J Hum Lact* **37**:477–484.
- Justiz Vaillant, A. A., Jamal, Z., Patel, P. & Ramphul, K. (2024) Immunoglobulin. Teoksessa *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Noudettu osoitteesta <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513460/>
- Kadaja, M., Isok-Paas, H., Laos, T., Ustav, E. & Ustav, M. (2009) Mechanism of genomic instability in cells infected with the high-risk human papillomaviruses. *PLoS Pathogens* **5**:1000397.
- Khayargoli, P., Niyibizi, J., Mayrand, M.-H., Audibert, F., Monnier, P., Brassard, P., ... HERITAGE Study Group (2023) Human Papillomavirus Transmission and Persistence in Pregnant Women and Neonates. *JAMA Pediatr* **177**:684–692.
- Kirnbauer, R., Booy, F., Cheng, N., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. (1992) Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:12180–12184.
- Koletzko, B., Rodriguez-Palmero, M., Demmelmair, H., Fidler, N., Jensen, R. & Sauerwald, T. (2001) Physiological aspects of human milk lipids. *Early Human Development* **65**:S3–S18.
- Koskimaa, H.-M., Waterboer, T., Pawlita, M., Grénman, S., Syrjänen, K. & Syrjänen, S. (2012) Human papillomavirus genotypes present in the oral mucosa of newborns and their concordance with maternal cervical human papillomavirus genotypes. *J Pediatr* **160**:837–843.

- Labayo, H. K. M., Pajuelo, M. J., Tohma, K., Ford-Siltz, L. A., Gilman, R. H., Cabrera, L., ... Saito, M. (2020) Norovirus-specific immunoglobulin A in breast milk for protection against norovirus-associated diarrhea among infants. *EClinicalMedicine* **27**:100561.
- Lakner, V. & Brock, J. (1977) [Secretory immunoglobulin A]. *Allerg Immunol (Leipz)* **23**:147–158.
- Laprise, C., Trottier, H., Monnier, P., Coutlée, F. & Mayrand, M.-H. (2014) Prevalence of human papillomaviruses in semen: A systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction* **29**:640–651.
- Larson, B. L., Heary, H. L. & Devery, J. E. (1980) Immunoglobulin production and transport by the mammary gland. *J Dairy Sci* **63**:665–671.
- Lechosa-Muñiz, C., Paz-Zulueta, M., Mendez-Legaza, J. M., Irure-Ventura, J., Cuesta González, R., Calvo Montes, J., ... Cabero-Pérez, M. J. (2021) Induction of SARS-CoV-2-Specific IgG and IgA in Serum and Milk with Different SARS-CoV-2 Vaccines in Breastfeeding Women: A Cross-Sectional Study in Northern Spain. *Int J Environ Res Public Health* **18**:8831.
- Lehtonen, O. P., Gråhn, E. M., Ståhlberg, T. H. & Laitinen, L. A. (1984) Amount and avidity of salivary and serum antibodies against *Streptococcus mutans* in two groups of human subjects with different dental caries susceptibility. *Infect Immun* **43**:308–313.
- Longueira, Y., Ojeda, D. S., Battistelli, R. B. A., Sanchez, L., Oviedo Rouco, S., Albano, D., ... Gamarnik, A. V. (2022) SARS-CoV-2-Specific IgG and IgA response in maternal blood and breastmilk of vaccinated naïve and convalescent lactating participants. *Front Immunol* **13**:909995.
- Louvanto, K., Sarkola, M., Rintala, M., Syrjänen, K., Grenman, S. & Syrjänen, S. (2017) Breast Milk Is a Potential Vehicle for Human Papillomavirus Transmission to Oral Mucosa of the Spouse. *Pediatr Infect Dis J* **36**:627–630.
- Lyons, K. E., Ryan, C. A., Dempsey, E. M., Ross, R. P. & Stanton, C. (2020) Breast Milk, a Source of Beneficial Microbes and Associated Benefits for Infant Health. *Nutrients* **12**.

- Lönnerdal, B. (2004) Human milk proteins: Key components for the biological activity of human milk. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **554**:11–25.
- Mankarious, S., Lee, M., Fischer, S., Pyun, K. H., Ochs, H. D., Oxelius, V. A. & Wedgwood, R. J. (1988) The half-lives of IgG subclasses and specific antibodies in patients with primary immunodeficiency who are receiving intravenously administered immunoglobulin. *J Lab Clin Med* **112**:634–640.
- Manns, A., Strickler, H. D., Wikktor, S. Z., Pate, E. J., Gray, R. & Waters, D. (1999) Low incidence of human papillomavirus type 16 antibody seroconversion in young children. *the Pediatric Infectious Disease Journal* **18**:833–835.
- Marais, D. J., Sampson, C. C., Urban, M. I., Sitas, F. & Wiliamson, A.-L. (2007) The seroprevalence of IgG antibodies to human papillomavirus (HPV) types HPV-16, HPV-18, and HPV-11 capsid-antigens in mothers and their children. *J Med Virol* **79**:1370–1374.
- Matson, A. P., Thrall, R. S., Rafti, E., Lingenheld, E. G. & Puddington, L. (2010) IgG transmitted from allergic mothers decreases allergic sensitization in breastfed offspring. *Clin Mol Allergy* **8**:9.
- Merckx, M., Liesbeth, W.-V. W., Arbyn, M., Meys, J., Weyers, S., Temmerman, M. & Vanden Broeck, D. (2013) Transmission of carcinogenic human papillomavirus types from mother to child: A meta-analysis of published studies. *European Journal of Cancer Prevention* **22**:277.
- Molinari, C. E., Casadio, Y. S., Hartmann, B. T., Livk, A., Bringans, S., Arthur, P. G. & Hartmann, P. E. (2012) Proteome mapping of human skim milk proteins in term and preterm milk. *Journal of Proteome Research* **11**:1696–1714.
- Mosconi, E., Rekima, A., Seitz-Polski, B., Kanda, A., Fleury, S., Tissandie, E., ... Verhasselt, V. (2010) Breast milk immune complexes are potent inducers of oral tolerance in neonates and prevent asthma development. *Mucosal Immunology* **3**:461–474.

- Muñoz, N., Bosch, F. X., de Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K. V., ... Meijer, C. J. L. (2003) Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* **348**:518–527.
- Münger, K., Baldwin, A., Edwards, K. M., Hayakawa, H., Nguyen, C. L., Owens, M., ... Huh, K. (2004) Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* **78**:11451–11460.
- Ongprasert, K., Ruangsuriya, J., Malasao, R., Sapbamrer, R., Suppansan, P., Ayood, P., ... Siviroj, P. (2020) Macronutrient, immunoglobulin a and total antioxidant capacity profiles of human milk from 1 to 24 months: A cross-sectional study in Thailand. *Int Breastfeed J* **15**:90.
- Osterhaus, A., Van Amerongen, G. & Van Binnendijk, R. (1998) Vaccine strategies to overcome maternal antibody mediated inhibition of measles vaccine. *Vaccine* **16**:1479–1481.
- Palmeira, P., Quinello, C., Silveira-Lessa, A. L., Zago, C. A. & Carneiro-Sampaio, M. (2012) IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. *Clin Dev Immunol* **2012**:985646.
- Patel, A. & Jialal, I. (2024) Biochemistry, Immunoglobulin A. Teoksessa *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Noudettu osoitteesta <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551516/>
- Rintala, M., Grenman, S., Puranen, M., Isolauri, E., Ekblad, U., Kero, P. & Syrjänen, S. (2005) Transmission of high-risk human papillomavirus (HPV) between parents and infant: A prospective study of HPV in families in Finland. *Journal of Clinical Microbiology* **43**.
- Rio-Aige, K., Azagra-Boronat, I., Castell, M., Selma-Royo, M., Collado, M. C., Rodríguez-Lagunas, M. J. & Pérez-Cano, F. J. (2021) The Breast Milk Immunoglobulinome. *Nutrients* **13**:1810.
- Rogier, E. W., Frantz, A. L., Bruno, M. E. C., Wedlund, L., Cohen, D. A., Stromberg, A. J. & Kaetzel, C. S. (2014) Secretory antibodies in breast milk promote long-term intestinal

- homeostasis by regulating the gut microbiota and host gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**:3074–3079.
- Rognum, T. O., Thrane, S., Stoltenberg, L., Vege, A. & Brandtzaeg, P. (1992) Development of intestinal mucosal immunity in fetal life and the first postnatal months. *Pediatr Res* **32**:145–149.
- Roman, A. & Munger, K. (2013) The papillomavirus E7 proteins. *Virology* **445**:138–168.
- Rombaldi, R. L., Serafini, E. P., Mandelli, J., Zimmermann, E. & Losquiavo, K. P. (2009) Perinatal transmission of human papillomavirus DNA. *Virology Journal* **6**:83.
- Sabatini, M. E. & Chiocca, S. (2020) Human papillomavirus as a driver of head and neck cancers. *British Journal of Cancer* **122**:306–314.
- Sakamoto, S., Putalun, W., Vimolmangkang, S., Phoolcharoen, W., Shoyama, Y., Tanaka, H. & Morimoto, S. (2018) Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *J Nat Med* **72**:32–42.
- Sarkola, M., Rintala, M., Grénman, S. & Syrjänen, S. (2008) Human papillomavirus DNA detected in breast milk. *Pediatr Infect Dis J* **27**:557–558.
- Sathe, A. & Cusick, J. K. (2024) Biochemistry, Immunoglobulin M. Teoksessa *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Noudettu osoitteesta <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555995/>
- Simister, N. E. (2003) Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine* **21**:3365–3369.
- Smith, B., Chen, Z., Reimers, L., van Doorslaer, K., Schiffman, M., Desalle, R., ... Burk, R. D. (2011) Sequence imputation of HPV16 genomes for genetic association studies. *PLoS One* **6**:e21375.
- South, M. A., Warwick, W. J., Wolheim, F. A. & Good, R. A. (1967) The IgA system. 3. IgA levels in the serum and saliva of pediatric patients—Evidence for a local immunological system. *J Pediatr* **71**:645–653.



- Spriggs, C. C. & Laimins, L. A. (2017) Human Papillomavirus and the DNA Damage Response: Exploiting Host Repair Pathways for Viral Replication. *Viruses* **9**:232.
- Studentsov, Y. Y., Schiffman, M., Strickler, H. D., Ho, G. Y. F., Pang, Y.-Y. S., Schiller, J., ... Burk, R. D. (2002) Enhanced enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to virus-like particles of human papillomavirus. *J Clin Microbiol* **40**:1755–1760.
- Sundekilde, U. K., Downey, E., O'Mahony, J. A., O'Shea, C.-A., Ryan, C. A., Kelly, A. L. & Bertram, H. C. (2016) The Effect of Gestational and Lactational Age on the Human Milk Metabolome. *Nutrients* **8**:304.
- Syrjänen, S. & Puranen, M. (2000) Human papillomavirus infections in children: The potential role of maternal transmission. *Crit Rev Oral Biol Med* **11**:259–274.
- Syrjänen, Stina (2010) Current concepts on human papillomavirus infections in children. *APMIS* **118**:494–509.
- Syrjänen, Stina, Rintala, M., Sarkola, M., Willberg, J., Rautava, J., Koskimaa, H., ... Louvanto, K. (2021) Oral Human Papillomavirus Infection in Children during the First 6 Years of Life, Finland. *Emerg Infect Dis* **27**:759–766.
- Syrjänen, Stina, Waterboer, T., Rintala, M., Pawlita, M., Syrjänen, K., Luovanto, K. & Grenman, S. (2022) Maternal HPV-antibodies and seroconversion to HPV in children during the first 3 years of life. *Scientific Reports* **12**:2227.
- Tang, R., Chu, K., Hu, Y., Chen, L., Zhang, M., Liu, S., ... Gao, Q. (2019) Effect of maternal antibody on the infant immune response to inactivated poliovirus vaccines made from Sabin strains. *Human Vaccines and Immunotherapeutics* **15**:1160–1166.
- Tapanainen, J., Heikinheimo, O. & Mäkikallio, K. (2019) *Naistentaudit ja synnytykset*. (6 edition). Duodecim.
- Tiitinen, A. (2022, syyskuuta 5) HPV-rokote. <https://www.terveyskirjasto.fi/dlk00940> (Luettu 23.5.2024)

- Tuominen, H., Rautava, S., Collado, M. C., Syrjänen, S. & Rautava, J. (2018) HPV infection and bacterial microbiota in breast milk and infant oral mucosa. *PLoS One* **13**:e0207016.
- Valcarce, V., Stafford, L. S., Neu, J., Cacho, N., Parker, L., Mueller, M., ... Larkin, J. (2021) Detection of SARS-CoV-2-Specific IgA in the Human Milk of COVID-19 Vaccinated Lactating Health Care Workers. *Breastfeed Med* **16**:1004–1009.
- van Keulen, B. J., Romijn, M., Bondt, A., Dingess, K. A., Kontopodi, E., van der Straten, K., ... van Goudoever, J. B. (2021) Human Milk from Previously COVID-19-Infected Mothers: The Effect of Pasteurization on Specific Antibodies and Neutralization Capacity. *Nutrients* **13**:1645.
- Weaver, L. T., Arthur, H. M., Bunn, J. E. & Thomas, J. E. (1998) Human milk IgA concentrations during the first year of lactation. *Arch Dis Child* **78**:235–239.
- Wilson, E. & Butcher, E. C. (2004) CCL28 controls immunoglobulin (Ig)A plasma cell accumulation in the lactating mammary gland and IgA antibody transfer to the neonate. *J Exp Med* **200**:805–809.
- Yang, H., Luo, G., Zeng, Y., Li, Y., Yu, S., Zhao, B., ... Xia, N. (2019) The distinct impact of maternal antibodies on the immunogenicity of live and recombinant rotavirus vaccines. *Vaccine* **37**:4061–4067.
- Yu, L., Majerciak, V. & Zheng, Z.-M. (2022) HPV16 and HPV18 Genome Structure, Expression, and Post-Transcriptional Regulation. *International Journal of Molecular Sciences* **23**.
- Yu, X., Li, J., Lin, X. & Luan, D. (2019) Association between Delayed Lactogenesis II and Early Milk Volume among Mothers of Preterm Infants. *Asian Nurs Res (Korean Soc Nurs Sci)* **13**:93–98.
- Zahreddine, M., Mayrand, M.-H., Therrien, C., Trevisan, A., Dagenais, C., Monnier, P., ... Trottier, H. (2020) Antibodies to human papillomavirus types 6, 11, 16 and 18: Vertical transmission and clearance in children up to two years of age. *EClinicalMedicine* **21**:100334.