

Міністерство освіти і науки України
Національний технічний університет
«Дніпровська політехніка»

Навчально-науковий інститут Природокористування
Кафедра екології та технологій захисту навколишнього
середовища

ПОЯСНЮВАЛЬНА ЗАПИСКА
кваліфікаційної роботи ступеня бакалавра

студента Гаркуші Єлизавети Едуардівни
(ПІБ)

академічної групи 091-20-1 ІІІ
(шифр)

спеціальності 091«Біологія та біохімія»
(код і назва спеціальності)

за освітньо-професійною програмою– «Біологія»

на тему «Дослідження показників IgE у дітей з алергічними захворюваннями» (назва за наказом ректора)

Керівники	Прізвище, ініціали	Оцінка	Підпис
кваліфікаційної роботи	Сідашенко О.І.		
розділів:			
Теоретичного	Сідашенко О.І.		
Практичного	Сідашенко О.І.		
Охорона праці	Столбченко О.В.		
Рецензент			
Нормоконтролер	Грунтова В.Ю.		

Дніпро
2024

Міністерство освіти і науки України
Національний технічний університет
« Дніпровська політехніка »

ЗАТВЕРДЖЕНО:
завідувач кафедри ЕТЗНС
Борисовська О.О.
« » _____ 2024 року

ЗАВДАННЯ
на кваліфікаційну роботу
ступеня бакалавра
студенту _____ Гаркуші Єлизаветі Едуардівна
(прізвище та ініціали)
академічної групи _____ 091 – 20 – 1
(шифр)
спеціальності – _____ 091«Біологія та біохімія
(код і назва спеціальності)
за освітньо-професійною програмою – «Біологія»
на тему «Дослідження показників IgE у дітей з алергічними захворюваннями»

затверджену наказом ректора НТУ «Дніпровська політехніка» від 21.05.24 р. № 453-с

	Розділ	Зміст	Термін виконання
1	Теоретичний	Обґрунтувати актуальність обраної теми дослідження. Охарактеризувати імунну систему людини та розвиток алергічної реакції. Виконати опис імунологічних показників людини при розвитку алергічних реакцій та захворювань. Навести характеристику імунологічних методів, що застосовують для вивчення показників імунітету та IgE.	01.03.2024- 01.04.2024.
2	Практичний	Описати методику виконання власних експериментів (місце проведення експериментальної роботи, методи, методики, протоколи). Навести опрацьовані та проаналізовані результати власних виконаних досліджень. Провести детальний аналіз показників загального IgE, що досліджували при розвитку алергічних захворювань у дітей. Порівняти отримані результати досліджень та проведеного аналізу із вже існуючими даними у літературі. Визначити напрямки для майбутніх досліджень у даному напрямку.	1.04.2024- 14.05.2024.
3	Охорона праці	Надати характеристику шкідливих та небезпечних факторів у лабораторії при проведенні експериментальних досліджень. Визначити загальні вимоги безпеки при роботі з хімічними речовинами та біоматеріалом, скласти перелік необхідних засобів індивідуального захисту; визначити процедуру управління та видалення лабораторних відходів. Сформулювати правила біоетики й основ біобезпеки при роботі з біооб'єктами та біоматеріалом	15.05.2024- 29.05.2024.

Завдання видано _____ Сідашенко О.І.
(підпис керівника) (прізвище, ініціали)

Дата видачі 10.10.2023

Дата подання до екзаменаційної комісії _____

Прийнято до виконання _____ Гаркуша Є. Е.

Реферат

Пояснювальна записка: 61 сторінок тексту, 13 рисунків, 1 таблицю, 35 літературних джерел, 5 додатків.

Мета роботи полягає у дослідженні показників IgE у дітей різних вікових груп для виявлення алергічних захворювань за допомогою хемілюмінісцентного методу.

У вступі викладено актуальність роботи та задачі, які були поставлені для розкриття теми.

У теоретичному розділі наведено загальну характеристику імунної системи людини, основні її складові, розкрито етіологічні фактори, патогенез та клінічні прояви алергічних захворювань у дітей. Описано різні методи діагностики, зокрема методи вимірювання загального IgE, та наведено порівняльну характеристику їх ефективності. Особливу увагу приділено хемілюмінісцентному методу, який дозволяє з високою точністю визначати рівні IgE у сироватці крові.

У практичному розділі наведено етапи підготовки дослідних зразків для проведення дослідження, детально описано імунохемілюмінісцентний метод (аналізатор Immulite 2000 XPI), що було застосовано для вивчення показників Ig E у дітей різних вікових груп. Встановлено частоту поширення алергічних захворювань серед дітей різного віку та проаналізовано показники Ig E (МО/мл) при різних патологічних станах, а саме алергічному риніті, бронхіальній астмі, атопічному дерматиті та харчовій алергії.

У розділі «Охорона праці» розроблено рекомендації безпечної роботи у клініко-діагностичній лабораторії.

У висновках наводяться результати виконання кваліфікаційної роботи.

ІМУНІТЕТ, АЛЕРГІЯ, АЛЕРГІЧНІ ЗАХВОРЮВАННЯ, АТОПІЧНИЙ ДЕРМАТИТ, АЛЕРГІЧНИЙ РИНИТ, БРОНХІАЛЬНА АСТМА, ХАРЧОВА АЛЕРГІЯ, IGE, ІМУНОГЛОБУЛІНИ, ХЕМІЛЮМІНСЦЕНТНИЙ МЕТОД

ЗМІСТ

Вступ	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	7
1.1. Характеристика імунної системи людини	7
1.2. Алергія та алергічні захворювання	9
1.2.1 Поняття алергії та алергенів	9
1.2.2 Динаміка алергічних реакцій	12
1.3. Розвиток алергічних захворювань у дітей	14
1.4. Роль IgE у патофізіології алергічних захворювань	24
1.5. Імунологічні методи оцінки імунітету та рівня IgE	25
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	28
2.1. Підготовка зразків до проведення дослідження	28
2.2 Зберігання сироватки крові	29
2.3 Проведення дослідження сироватки крові дітей на вміст IgE	29
2.4 Визначення показників IgE у зразках крові дітей	33
2.5 Дослідження поширення алергічних захворювань у дітей	35
2.6 Дослідження показників IgE у дітей різних вікових груп	39
РОЗДІЛ 3. ОХОРОНА ПРАЦІ	41
3.1 Основні вимоги до устаткування та оснащення медичної лабораторії	41
3.1.1 Основні вимоги та правила при роботі в лабораторії	43
3.2 Правила роботи з хімічними речовинами	46
3.3 Техніка безпеки при роботі з біологічним матеріалом	46
Висновки	48
Список використаних джерел	51
Додаток А	56
Додаток Б	58
Додаток В	59
Додаток Г	60
Додаток Д	61

ВСТУП

Алергічні захворювання включають генетично гетерогенний кластер імунологічно опосередкованих захворювань, включаючи астму, харчову алергію, алергічний риніт та екзему, які стали основними проблемами охорони здоров'я в усьому світі. За останні кілька десятиліть поширення алергічних захворювань постійно зростає [1].

Алергія та алергічні захворювання є поширеною проблемою у дітей різного віку. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), близько 10-30% населення світу страждають від різних форм алергії. Дослідження 2003 року показало, що захворюваність на астму серед дітей віком до 4 років у Сполучених Штатах зросла на 160% з 1980-х і 1990-х років. Відповідно до перехресного дослідження всього населення в шести регіонах Монголії на півночі Китаю, 4441 респондент (18,0%) повідомив про харчову алергію, при чому рівень захворюваності дітей був вищим, ніж у дорослих (38,7 та 11,9% відповідно)[1].

Імуноглобулін Е (IgE) є ключовим біомаркером, який використовується для діагностики та моніторингу алергічних захворювань. Визначення рівня IgE у крові дітей дозволяє не тільки діагностувати алергію, але й оцінити ступінь її вираженості та ефективність лікування.

Зростання захворюваності на алергію серед дитячого населення вимагає удосконалення методів діагностики для вчасного виявлення та адекватної терапії алергічних станів. Таким чином, дослідження, спрямовані на визначення вмісту IgE у зразках крові дітей, є актуальними і важливими для покращення якості медичного обслуговування та здоров'я дитячого населення.

У зв'язку з цим, метою роботи було дослідити показники IgE у дітей різних вікових груп для виявлення алергічних захворювань за допомогою хемілюмінісцентного методу.

З огляду на вище сказане, було сформовано наступні задачі:

1) Навести загальну характеристику імунітету людини та його складові. Проаналізувати поняття алергії та факторів, що її провокують. Розкрити динаміку алергічного процесу та розвиток алергічних захворювань у дітей.

2) Описати технологію отримання сироватки крові та хемілюмінісцентний метод визначення кількості IgE у сироватці крові за допомогою приладу Immulite 2000. Провести дослідження для встановлення показників IgE у дітей різних вікових груп, що страждають на atopічний дерматит, бронхіальну астму, алергічний риніт та харчову алергію. Проаналізувати отримані результати стосовно поширеності даних алергічних захворювань та рівня IgE порівняно з нормою.

3) Надати характеристику шкідливих та небезпечних факторів у клініко-діагностичній лабораторії при проведенні експериментальних досліджень.

Практичне значення кваліфікаційної роботи полягає у тому, що у зв'язку з поширенням алергічних захворювань серед дітей, дуже важливим є їх вчасна діагностика та правильна постановка діагнозу з метою попередження подальшого прогресування захворювання.

Апробація результатів кваліфікаційної роботи.

Апробація роботи проводилась на науково-практичній міжнародній дистанційній конференції «Сучасні досягнення та перспективи клінічної лабораторної медицини у діагностиці хвороб людини та тварин» (28 березня 2024 р.). За результатами досліджень надруковано тези доповіді.

Поширення алергічних захворювань у дітей та їх діагностика/
Сідашенко О.І., Гаркуша Є.Є. // Сучасні досягнення та перспективи клінічної лабораторної медицини у діагностиці хвороб людини та тварин: матеріали IV науково-практичної міжнародної дистанційної конференції, м. Харків, 28 березня 2024 р./ Національний фармацевтичний університет – Харків, 2024. – С. 27-29.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1. Загальна характеристика імунної системи людини

Імунітет – це імунологічний нагляд за сталістю внутрішнього середовища організму, тобто підтримання гомеостазу. Система клітин, тканин та органів, що забезпечує захист від усього чужорідного, формує імунну систему, яка, як наслідок, забезпечує імунну відповідь.

Імунна відповідь — це здатність організму, захищатись від шкідливих агентів. Він включає механізми захисту від більшості мікробів і спеціалізовані та дуже специфічні реакції на конкретного збудника. Ця імунна відповідь є вродженою, неспецифічною, адаптивно набутою або високоспецифічною.

Потрібно відмітити, що імунітет може бути набутим (адаптивним) та природнім (вродженим). При цьому, набутий імунітет поділяють на активний та пасивний.

До природніх механізмів захисту відносять, наприклад: шкірний бар'єр, слину, сльози, різні цитокіни, білки комплементу, лізоцим, бактеріальну флору та численні клітини, включаючи нейтрофіли, базофіли, еозинофіли, моноцити, макрофаги, ретикуло-ендотеліальну систему, природні клітинні кілери (NK), епітеліальні клітини, ендотеліальні клітини, еритроцити та тромбоцити [16].

Першими у складі імунної системи потрібно виділити клітини. До основних типів імунних клітин належать: нейтрофіли, які забезпечують фагоцитоз, лімфоцити, відіграють важливу роль у розвитку адаптивного імунітету (Т та В лімфоцити), моноцити, що перетворюються у макрофаги та є антигенпрезентуючими клітинами, базофіли та еозинофіли, які захищають від алергії та паразитів тощо [15].

Таблиця.1.1 – Типи імунних клітин [15]

Імунні клітини	Зображення	Функції
Нейтрофіли		Фагоцитоз
Лімфоцити		Адаптивний імунітет, поділяються на Т та В лімфоцити
Моноцити		Презентація антигену, фагоцитів. Дозрівають у макрофаги.
Базофіли		Алергічні реакції
Еозинофіли		Захист від паразитів

До клітин вродженого або природного імунітету належать: фагоцити (моноцити, макрофаги, нейтрофіли та дендритні клітини) та природні клітини-кілери (NK).

До клітин набутого імунітету відносять: Т-лімфоцити та В-лімфоцити. Перші класифікуються як CD4+Т-клітини та CD8+Т-клітини; а В-лімфоцити, які диференціюються в плазматичні клітини, які виробляють специфічні антитіла [16].

Системи органів, які беруть участь в імунній відповіді, це головним чином лімфоїдні органи, до яких належать селезінка, тимус, кістковий мозок, лімфатичні вузли, мигдалини та печінка. Лімфоїдна система органів класифікується за такими ознаками: первинні лімфоїдні органи (тимус і кістковий мозок), де Т- і В-клітини спочатку експресують рецептори антигену і стають функціонально зрілими. Вторинні лімфоїдні органи, такі як селезінка, мигдалики, лімфатичні вузли та імунна система шкіри та

слизової оболонки, є місцем, де В- і Т-лімфоцити розпізнають чужорідні антигени та розвивають відповідну імунну відповідь [16].

Т-лімфоцити дозрівають у тимусі, де вони досягають стадії функціональної компетентності, тоді як В-лімфоцити формуються у кістковому мозку, місці генерації всіх циркулюючих клітин крові [16].

1.2 Алергія та алергічні захворювання

1.2.1 Поняття алергії та алергенів

Алергія – це підвищена реакція імунної системи організму на певні речовини, що знаходяться у навколишньому середовищі. Симптоми алергічної реакції можуть бути дуже різними, наприклад, свербіж, почервоніння, висипання, кропив'янка, набряк губ, язика та дихальних шляхів (ангіоневротичний набряк), нудота, блювання, спазми в животі, задишка, хрипи та бронхоспазм, стридор, непритомність або колапс [22].

Алергени – це сенсibiliзуючі агенти, що найчастіше мають досить слабкі антигенні властивості. Хоча поняття “антиген” і “алерген” дуже близькі за суттю, але одне не завжди дорівнює другому. Так, практично жоден алерген – антиген, але не кожний антиген – алерген. Алергени – це особлива група антигенів, які відрізняються деякими біологічними і фізико-хімічними властивостями, а саме мають невисоку молекулярну масу, здатні сорбуватися та агрегуватися у невеличкі частки, просочуватися у покривні тканини та слизові оболонки, легко елюються у рідкі середовища організму, хімічно стабільні, практично не метаболізуються в організмі.

Алергію викликають всі види мікробів (віруси, бактерії, найпростіші, гриби), в тому числі представники мікрофлори, а також гельмінти. Живі збудники захворювань спричиняють більш виражену сенсibiliзацію порівняно з убитими паразитами.

Більшість алергенів є білками або глікопротеїнами з молекулярною масою від 5000 до 100 000. Хоча полісахариди та низькомолекулярні речовини також можуть бути алергенними. До звичайних алергенів відносять пилок, спори грибків (наприклад, плісняви),

кліщів домашнього пилу та епітеліальні матеріали тварин, але також можуть включати ліки, біологічні продукти та отрути комах [23].

Існує декілька класифікацій алергенів, але найбільш поширена серед них класифікація алергенів за походженням, яка включає алергени тваринного та рослинного походження.

Найпоширенішими групами рослинних білків, що є алергенами, є надродина купіну та проламіну та сімейства білків захисної системи рослин. Надродина купінових включає алергенні запасні білки насіння типу віциліну та легуміну, присутні в соєвих бобах, арахісі та горіхах. Надродина проламінів включає кілька важливих типів алергенів бобових, горіхів, злаків, фруктів і овочів, таких як запасні білки насіння альбуміну 2S, неспецифічні білки перенесення ліпідів, а також інгібітори альфа-амілази та протеази злаків [31].

Тваринні алергени включають білки ліпокаліні.Інгаляційні алергени, отримані від ссавців, складають велику та складну групу. За винятком котячого алергену Fel d 1, більшість усіх основних алергенів тварин належать до сімейства білків ліпокаліну . Як правило, ліпокаліні ссавців є невеликими позаклітинними білками, що складаються приблизно з 150-170 амінокислот з молекулярною масою близько 20 кДа. Ліпокаліні мають загальні біологічні функції, які переважно пов'язані з транспортуванням малих гідрофобних молекул, таких як стероїди, одоранти та феромони [32].

Наша імунна система відіграє вирішальну роль у захисті нашого організму від хвороб потворних мікроорганізмів, але іноді виникає занадто сильна відповідь. Ця підвищена чутливість пов'язана зі взаємодією імунної системи з антигеном (алергеном) і називається гіперчутливістю. Кумбсі Гелл класифікують реакції гіперчутливості на чотири типи. Перші три типи вважаються реакціями гіперчутливості негайного типу, оскільки вони виникають протягом 24 годин. Четвертий тип вважається реакцією уповільненої гіперчутливості, оскільки зазвичай виникає через 12 годин після

контакту з алергеном, а максимальний час реакції становить від 48 до 72 годин.

Чотири типи гіперчутливості можна охарактеризувати наступним чином [24]:

Тип I: реакція, опосередкована антитілами IgE

Тип II: цитотоксична реакція, опосередкована антитілами IgG або IgM

III тип: реакція, опосередкована імунними комплексами

Тип IV: сповільнена реакція, опосередкована клітинною відповіддю

1.2.2 Динаміка алергічних реакцій

При розгляді алергічних реакцій, які є важливою складовою розвитку алергічних захворювань, виділяють три основні стадії: імунологічну, патохімічну та патофізіологічну. Кожна з цих стадій має свої особливості і ключові механізми, які взаємодіють і призводять до розвитку клінічних проявів алергії.

1. Імунологічної стадія

Імунологічна стадія включає процеси, пов'язані з розпізнаванням імунною системою антигену (алергену) і виробленням специфічних антитіл.

1. Експозиція до алергену:

- Введення алергену в організм може відбуватися через дихальні шляхи, шкіру, шлунково-кишковий тракт або інші шляхи.
- Після первинного контакту з алергеном він зв'язується з антиген-презентуючими клітинами (АПК), такими як дендритні клітини.

2. Презентація антигену та активація Т-лімфоцитів:

- АПК обробляють алерген і презентують його у вигляді пептидних фрагментів на своїй поверхні разом з молекулами головного комплексу гістосумісності (МНС).
- Ці фрагменти розпізнаються Т-лімфоцитами (CD4+ Т-клітинами), що призводить до їх активації.

3. Активація В-лімфоцитів та синтез IgE:

- Активація Т-клітин призводить до виділення цитокінів, які стимулюють В-лімфоцити до диференціації в плазматичні клітини.
- Плазматичні клітини виробляють специфічні імуноглобуліни Е (IgE), які мають високу спорідненість до рецепторів на поверхні мастоцитів і базофілів.

4. Сенсibiliзація:

- IgE зв'язується з високоафінними рецепторами FcεRI на мастоцитах і базофілах.
- При повторному контакті з алергеном, IgE на поверхні цих клітин розпізнає і зв'язує алерген, що запускає наступну стадію.

2. Патохімічна стадія

Патохімічна стадія включає процеси вивільнення і дії медіаторів запалення, які виділяються з мастоцитів і базофілів при їх активації.

1. Активація мастоцитів і базофілів:

- При повторному контакті з алергеном, специфічний IgE, зв'язаний з FcεRI, зв'язується з алергеном.
- Це призводить до крос-зв'язування IgE і активації мастоцитів та базофілів.

2. Вивільнення медіаторів:

- Активація цих клітин спричиняє дегрануляцію, при якій виділяються медіатори запалення, такі як гістамін, лейкотрієни, простагландини, цитокіни та хемокіни.

3. Роль основних медіаторів:

- **Гістамін:** Викликає вазодилатацію, підвищену проникність судин, скорочення гладеньких м'язів і стимулює секрецію слизу.
- **Лейкотрієни:** Підвищують проникність судин, викликають бронхоспазм і залучають до місця запалення лейкоцити.
- **Простагландини:** Беруть участь у формуванні больових відчуттів, підвищеній проникності судин та індукції лихоманки.

3. Патофізіологічна стадія

Патофізіологічна стадія включає всі фізіологічні зміни, що виникають в організмі під впливом медіаторів запалення.

1. Розвиток місцевих і системних реакцій:

- **Місцеві реакції:** Включають набряк, почервоніння, свербіж, які спостерігаються в місці впливу алергену.

- **Системні реакції:** Можуть включати анафілаксію, при якій виникають генералізовані симптоми, такі як бронхоспазм, гіпотензія, та інші.

2. Залучення запальних клітин:

- У місце запалення мігрують еозинофіли, нейтрофіли і Т-лімфоцити, що сприяє посиленню запальної реакції і тканинного пошкодження.

3. Довготривалі зміни:

- Хронічне запалення може призвести до структурних змін в тканинах, таких як фіброз, гіперплазія слизових оболонок та ремоделювання дихальних шляхів у випадку бронхіальної астми.

1.3 Розвиток алергічних захворювань у дітей

Великою проблемою сьогодення є поширення алергічних захворювань у дітей різного віку, що не може не викликати занепокоєння. До таких алергічних захворювань відносять atopічний дерматит, на який страждають не лише діти раннього віку, але й підлітки та дорослі, бронхіальна астма – охоплює усі вікові групи, алергічний риніт тощо. Харчові алергії – одна з найбільших проблем сучасної медицини.

Алергічні захворювання, головним чином астма, харчова алергія (FA), алергічний риніт (AR), екзема тощо, традиційно називаються реакціями гіперчутливості негайного типу або типу 1, з IgE як критичним фактором. Цей вид анафілактичної реакції опосередковується антитілами IgE, які виробляються імунною системою у відповідь на білки навколишнього середовища, які називаються алергенами, включаючи пилок, шерсть тварин

або пилових кліщів. Ці антитіла IgE зв'язуються з тучними клітинами та базофілами, які виділяють гістамін, що зрештою викликає запалення [1].

Існує декілька гіпотез, що пояснюють виникнення алергічної реакції. Наприкінці 1980-х років було запропоновано гігієнічну гіпотезу, яка стверджує, що відсутність контакту з джерелами інфекції, паразитами обмежує нормальний розвиток імунної системи, що зрештою призводить до збільшення захворюваності на алергічні захворювання [1].

Також, в 2005 році була запропонована теорія мікрофлори, згідно якої прийом антибіотиків, інфекції та дієти, вплинуло на нормальні взаємовідносини мікрофлори із імунітетом, і привели до розвитку алергічних захворювань [1].

У здорових людей у кишківнику присутні різноманітні мікробні спільноти з численними бактеріальними видами, які визначаються як мікробіота. Дослідження показали, що кишкова мікробіота людини, ймовірно, містить 1000–1500 видів бактерій; однак кожна людина має лише приблизно 160 видів бактерій [1].

Було секвеновано бактеріальні геноми мікробіоти, вказавши, що мікробіота нашого кишківника містить близько 22,2 мільйона генів, що у 700 разів перевищує довжину геному людини. Мікробіота шлунково-кишкового тракту (ШКТ) здорових людей в основному складалася з чотирьох типів бактерій: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* та *Actinobacteria*. Більше того, більшість мікробіоти складалася з типів *Firmicutes* і *Bacteroidetes*, а клас *Clostridia* домінує. Слід зазначити, що мікробіом включає не лише бактерії, а й віруси, фаги, гриби, археї тощо.

Найважливіші фактори, що впливають на структуру мікробіому шлунково-кишкового тракту у немовлят, поділяються на ті, що виникають до народження, під час/під час народження та після народження, причому основними факторами є спосіб пологів, дієта немовляти (тобто тип годування немовляти) середовище, вживання антибіотиків немовлям тощо [1].



Рис.1.1.Фактори, що впливають на видовий склад мікробіоти [1].

На рис1.1 можемо бачити основні фактори, що впливають на видовий склад мікробіоти дитини [1].

Вважається, що спосіб пологів є життєво важливим фактором раннього складу шлунково-кишкового тракту у доношених немовлят. Велика кількість досліджень показала відмінності в різноманітності та/або складі кишкової мікробіоти доношених немовлят між немовлятами, народженими шляхом кесаревого розтину і традиційними пологами. Серед багатьох із цих досліджень узгоджуються висновки про нижчу загальну мікробну різноманітність і зменшення кількості *Bifidobacterium*, *Bacteroides* і *Lactobacillus* у немовлят, народжених від кесаревого розтину, порівняно з тими, які були народжені традиційним шляхом [1].

Відмінності в моделях мікробної колонізації є важливими не лише через їхній потенційний вплив на кінцевий склад мікробіоти, але також через те, що вони впливають на супутній розвиток імунної системи немовляти. Дозрівання слизової оболонки кишківника та пов'язаної з нею лімфоїдної тканини залежить від кишкової колонізації. Пейєрові бляшки, мезентеріальні

лімфатичні вузли та ізольовані лімфоїдні фолікули, асоційовані з ШКТ лімфоїдної тканини, потребують сигналів від мікробіоти ШКТ [1].

Таким чином, під впливом мікробіоти ШКТ, пул імунних клітин, створений протягом цього критичного періоду, впливатиме на імунітет і сприйнятливість до захворювань. У зв'язку з цим, порушення колонізації, викликане кесарівовим розтином, може відобразитися на зміненому розвитку імунної системи з потенційними довгостроковими наслідками. У дослідженні розглядався вплив кесаревого розтину на розвиток Т-клітинної відповіді та продукцію різних цитокінів. Дослідження виявили обмежені докази того, що кесарів розтин, як вважають, пов'язаний зі зниженими рівнями Th1-асоційованих хемокінів у дитинстві [1].

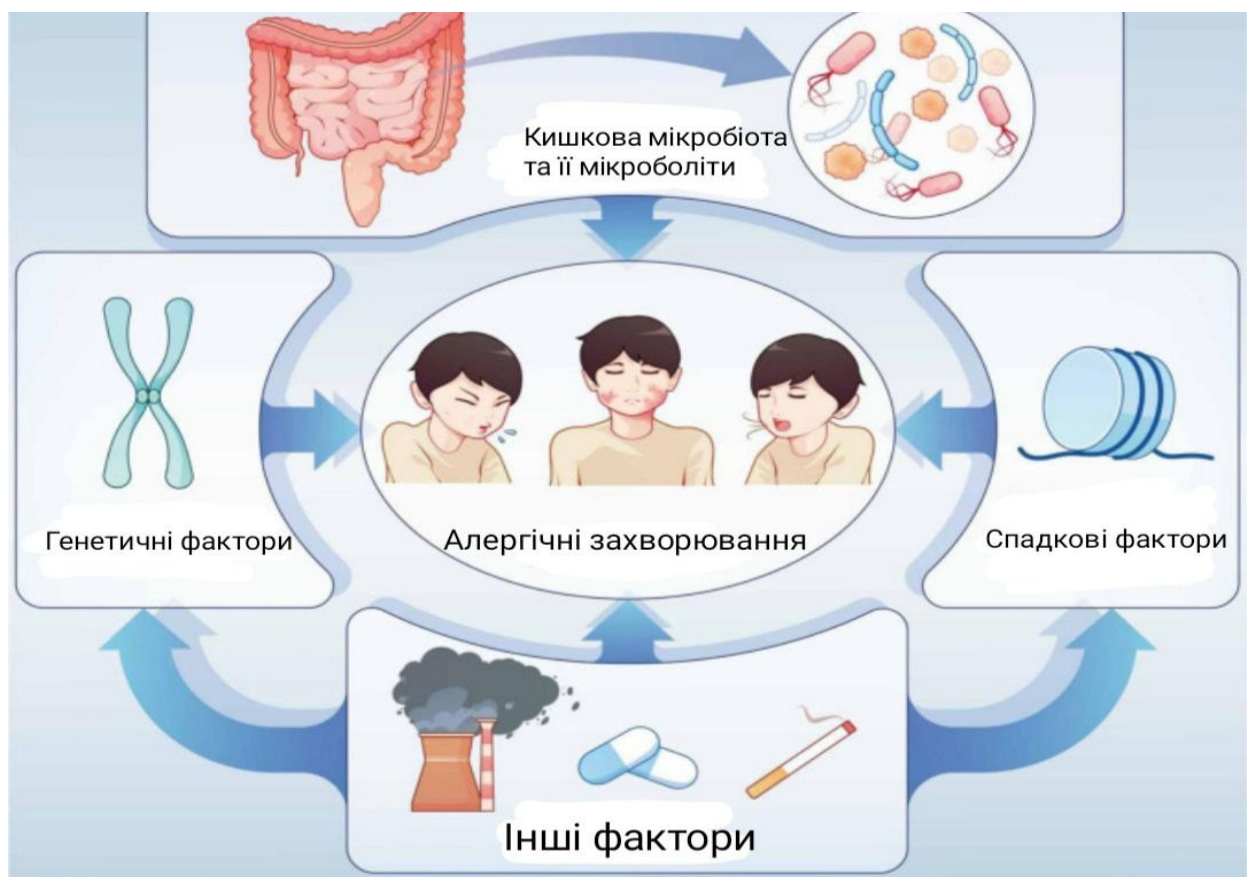


Рис.1.2 Фактори ризику розвитку алергічних захворювань [2].

Окрім впливу мікробіоти, описаної у дослідженні [1], до факторів ризику також відносяться генетичні передумови, епігенетичні та інші фактори навколишнього середовища, вплив препаратів тощо (рис.1.2) [2].

Як генетика, так і навколишнє середовище мають вирішальне значення для етіології та розвитку алергічних захворювань, і важко розрізнити їх незалежну роль в алергічних захворюваннях, коли вони поєднуються. Дослідження близнюків можна використовувати, щоб відокремити генетику від факторів навколишнього середовища, що дасть підказки до генетичного компонента алергічних захворювань. Було показано, що діти, у батьків або братів та сестер яких є алергія на арахіс, мають у 7 разів більший шанс розвитку захворювання порівняно з дітьми без сімейних факторів ризику. Загалом оцінки успадкованості для харчової алергії досягають 81% [2].

Спадковість по материнській лінії вважається найбільш вирішальним фактором у виникненні алергічних захворювань. Більшість мітохондрій успадковуються від матері, а мітохондріальна ДНК тісно пов'язана з виникненням та розвитком захворювання на бронхіальну астму та атопічний дерматит [2].

Алергічний риніт (АР). Алергічний риніт є одним із найпоширеніших захворювань у всьому світі, який, як правило, зберігається протягом життя людини. Частота алергічного риніту у дітей коливається від 2%-25% та від 1% до >40% у дорослих. Однак поширеність підтвердженого алергічного риніту серед дорослих європейців оцінюється в межах від 17% до 28,5%[6]. Захворюваність на алергічний (переважно сезонний) риніт дуже низька у перші 2 роки. Дослідження свідчать [7] про те, що у дуже небагатьох немовлят і малюків розвиваються симптоми алергічного типу протягом будь-якого сезону пилку до 3-го року життя. Загалом необхідно 2 роки (сезони) впливу навколишнього алергену, перш ніж алергічну сенсibiliзацію можна спостерігати за допомогою специфічного вимірювання IgE сироватки. Відсоток нових випадків із сезонним АР зростає у віці від 3 до 12 років із постійною швидкістю ~2% на рік [7].

Щодо патофізіології алергічного риніту, то відбувається це наступним чином: гіперчутливість типу I – це алергічна реакція, опосередкована антитілами IgE у відповідь на алергени. Реакції гіперчутливості типу I виникають швидко, як правило, протягом 20 хвилин після впливу алергену, і характеризуються активацією тучних і запальних клітин, а також їх інфільтрацією в тканинах. Алергічна відповідь при алергічному риніті може бути розділена на дві фази: ранню та пізню.

Рання фаза починається через 20 хвилин після впливу шкідливих алергенів. Антигенпрезентуючі клітини (АПК), такі як дендритні клітини на поверхні слизової оболонки, поглинають, обробляють і представляють пептиди з алергенів на молекулі головного комплексу гістосумісності (МНС) класу II. Антигенний комплекс і молекула МНС класу II служать лігандом для Т-клітинних рецепторів на наївних CD4 + Т-клітинах, що призводить до диференціювання наївних CD4 + Т-клітин у алерген-специфічну Th2 клітину. Цитокіни, такі як IL-4 та IL-13, що вивільняються з активованих Th2-клітин, взаємодіють з В-клітинами, продукуючи алерген-специфічний IgE. Цей алерген-специфічний IgE зв'язується з високоафінним рецептором Fc для IgE (FcεR), присутнім на тучних клітинах, що призводить до активації тучних клітин [8].

Після 4-6 год експозиції алергену починається пізня фаза алергічної відповіді. На даному етапі відбувається запалення слизової оболонки носа з надходженням і активацією різноманітних запальних клітин, таких як Т-клітини, еозинофіли, базофіли, нейтрофіли та моноцити. Залучення цих запальних клітин спровоковане впливом цитокінів, а саме: IL-4 та IL-5 (рис. 1.3.) [8].

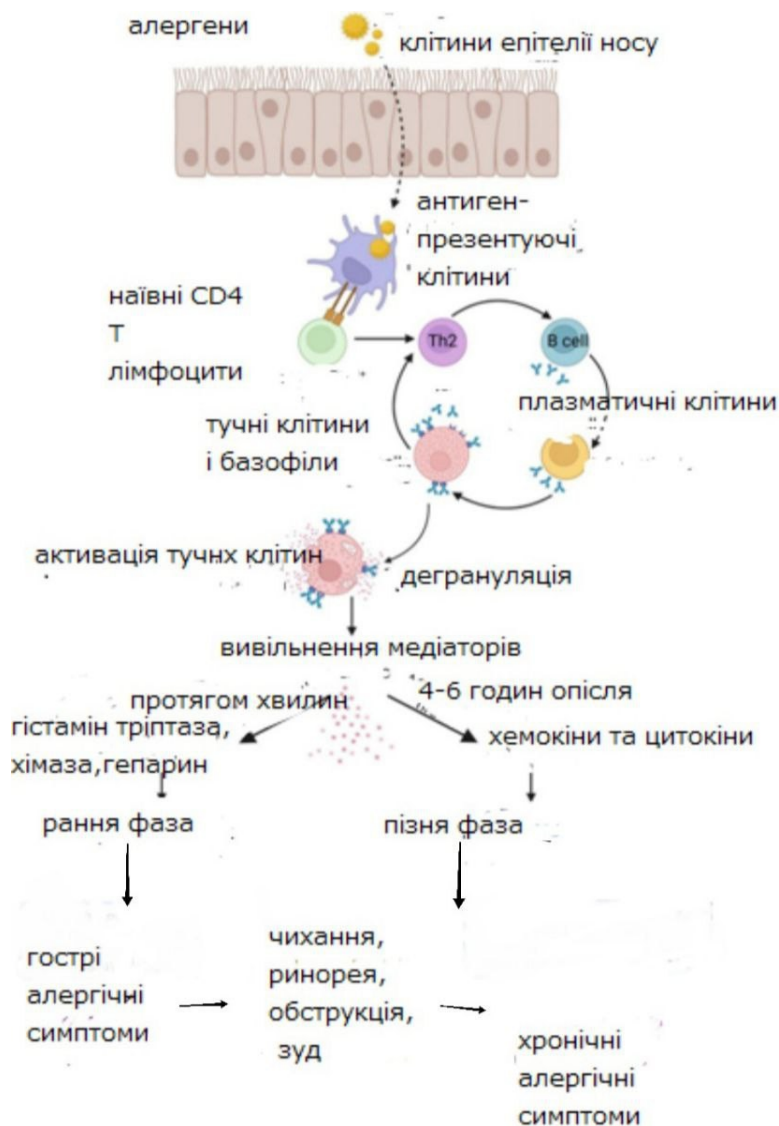


Рис.1.3 Патофізіологія алергічного риніту [8]

Харчова алергія. Алергічні реакції на харчові продукти є важливою клінічною проблемою як через їхню частоту в ранньому віці, так і через потенціал небезпечних для життя реакцій. Побічні реакції на харчові продукти поділяються на дві загальні категорії: неімунологічні реакції (харчова непереносимість) та імунологічні реакції (харчова алергія) [3]. Вважається, що схильність до розвитку харчової алергії значною мірою пов'язано з генетичною схильністю [3].

Поширеність IgE-опосередкованої харчової алергії становить від 3% до 7,5%; вищі частоти зазвичай виникають у дітей молодшого віку. Потрібно відмітити, що лише 1,5 % немовлят мають алергію на молоко протягом

першого року життя. Серед цих дітей 15% можуть зберегти свою чутливість до 20 років, а 35% матимуть алергію на інші продукти. Вважається, що алергія на яйця вражає приблизно 1,3% дітей, а алергія на арахіс – приблизно 0,5% дітей. Особливо схильні до розвитку харчової алергії маленькі діти. У дітей молодшого віку найбільш поширеними харчовими продуктами, що викликають алергію є молоко та яйця [3].

IgE-опосередкована харчова алергія виникає в результаті порушення регуляції в імунній системі, яка підтримує стан толерантності, запобігаючи неправильній ідентифікації доброякісних харчових антигенів як патогенів[4]У схильних осіб, які піддаються впливу певних алергенів, утворюються антитіла IgE, специфічні до їжі, які зв'язуються з базофілами, макрофагами, тучними клітинами та дендритними клітинами на Fc-епсилон-рецепторах.

Коли харчові алергени проникають через бар'єри слизової оболонки та досягають клітинних антитіл IgE вивільняються медіатори запалення та викликають скорочення гладких м'язів, розширення судин і секрецію слизу, що призводить до симптомів негайної гіперчутливості (алергії). Активовані тучні клітини та макрофаги, які здійснюють вплив на еозинофіли та лімфоцити, вивільняють цитокіни. Це призводить до тривалого запалення, що вражає шкіру, наприклад почервоніння, ангіоневротичний набряк або кропив'янка, дихальні шляхи – ринорея, свербіж у носі із закладеністю носа, чхання, задишка, набряк гортані, хрипи, порушення роботи ШКТ (нудота, свербіж у роті, блювання, біль у животі, діарея) та серцево-судинної системи (артеріальна гіпотензія, втрата свідомості, аритмії). Найбільш небезпечним є анафілактичний шок [3, 5]

Анафілаксія – це гостра важка алергічна реакція, яка зазвичай вражає дві або більше систем органів і виникає в результаті швидкого вивільнення потужних фармакологічно активних медіаторів з тучних клітин. Після впливу провокуючого фактора реакція може відбутися протягом декількох хвилин або годин, і у пацієнта може спостерігатися широкий спектр ознак і

симптомів. Анафілакстичний шок може розпочатися із почервоніння, тобто гіперемії шкіри та появи кропив'янки, яка може швидко прогресувати до кардіореспіраторної недостатності та смерті [3].

Бронхіальна астма. Дане захворювання часто розпочинається з дитинства, причому майже половини всіх немовлят мають ознаки бронхіальної астми протягом першого року життя, а у більшості з них стійка астма розвивається до 6 років. Складний взаємозв'язок між генетичною схильністю та факторами навколишнього середовища підкреслює її поширеність і тяжкість [9].

Генетичні локуси, залучені до сприйнятливості до астми, включають головний комплекс гістосумісності класу II, Toll-подібний рецептор 1 (TLR1), рецептор IL-6 (IL6R), (ZPBP2), і газдермін A (GSDMA) [9].

Одним із факторів, що впливає на розвиток бронхіальної астми у перинатальному періоді є недоношеність. Так як, у немовлят до 36 тижнів спостерігається порушення розвитку легень. Також, паління матері під час вагітності пов'язане зі зниженою функцією легенів у новонароджених та іншими несприятливими наслідками вагітності, включаючи передчасні пологи, що підвищує ймовірність дитячої астми. Вік матері молодше 20 років корелює з вищими показниками дитячої астми, тоді як вік матері 30 років і старше пов'язаний з нижчими показниками [9].

Існує дві фази загострення астми, які включають ранню фазу та пізню фазу. Рання фаза ініціюється антитілами IgE, які сенсibiliзуються та вивільняються плазматичними клітинами. Ці антитіла реагують на певні тригери в навколишньому середовищі. Потім антитіла IgE зв'язуються з високоафінними тучними клітинами та базофілами. Коли забруднююча речовина потрапляє, тучні клітини вивільняють цитокіни та, зрештою, дегранулюють. З тучних клітин вивільняються гістамін, простагландини та лейкотрієни. Ці речовини, у свою чергу, скорочують гладкі м'язи та викликають ущільнення дихальних шляхів [10].

Атопічний дерматит. Атопічний дерматит (АД) є найпоширенішим хронічним запальним захворюванням шкіри. Генетична схильність, порушення епідермального бар'єру та порушення роботи імунної системи є одними з критичних компонентів АД. Порушення шкірного бар'єру може бути початковим кроком у розвитку даного патологічного захворювання, що призводить до подальшого запалення шкіри та алергічної сенсibiliзації. Поширеність атопічного дерматиту у США становила 11,3–12,7% і 6,9–7,6% у дітей та дорослих відповідно [11].

Щодо генетичних передумов, то захворюваність на атопічний дерматит ґрунтується на мутаціях в гені філагрину. Ген філагрину (FLG) розташований на хромосомі 1q2 і кодує FLG (білок філагрину), який є основним структурним білком у роговому шарі. Pro-FLG полімери протеолітично розщеплюються та дефосфорилуються на мономери FLG, які пов'язані з агрегацією кератинових ниток та утворенням рогового шару. Утворення продуктів розпаду FLG, уроканової кислоти та піролідинкарбонової кислоти, сприяє гідратації рогового шару і кислому рН шкіри. Добре відомо, що мутації FLG порушують функцію шкірного бар'єру та збільшують ризик атопічного дерматиту [11].

Епігенетичні механізми є спадковими і можуть регулювати експресію генів без зміни послідовності ДНК. Існує все більше доказів, які демонструють, що вплив навколишнього середовища викликає епігенетичні зміни та атопічний дерматит через модифікацію ДНК і посттранскрипційну регуляцію, опосередковану мікро-РНК. Нещодавнє дослідження надало докази важливості метилювання ДНК і показало взаємозв'язок між метилюванням в 5'-С-фосфат-Г-3' сайтах IL-4R і розвитком даного захворювання у віці 1 року [11].

Дослідження показали, що імунні цитокіни 2 типу, наприклад IL-4 та IL-13, відіграють важливу роль у виробленні хемокінів, дисфункції шкірного бар'єру, придушенні антимікробних пептидів (AMP) і алергічному запаленні. Цікаво, що IL-31 посилює вивільнення та виробництво натрійуретичного

пептиду і координує вивільнення цитокінів та хемокінів із клітин шкіри, тим самим викликаючи свербіж у пацієнтів з atopічним дерматитом [11].

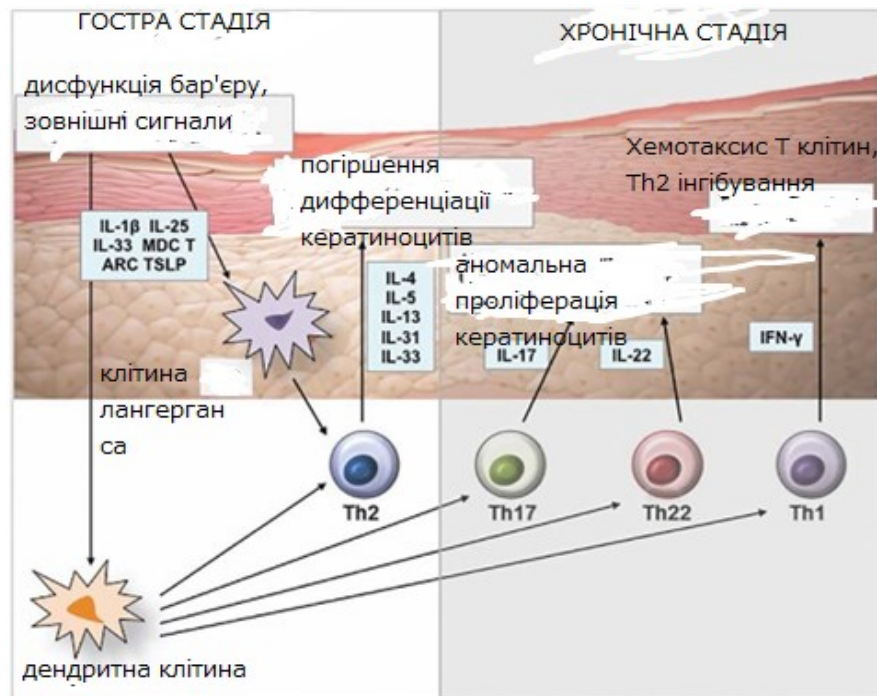


Рис.1. 4 Роль цитокінів у патофізіології atopічного дерматиту [11]

Є певний механізм (рис 1.4.) впливу цитокінів на епідерміс при розвитку даного алергічного захворювання. Порушений епідермальний бар'єр і тригери навколишнього середовища стимулюють кератиноцити вивільняти IL-1 β , IL-25, IL-33, MDC, TARC і TSLP, які активують дендритні клітини та клітини Лангерганса. Активовані дендритні клітини стимулюють клітини Th2 виробляти IL-4, IL-5, IL-13, IL-31 та IL-33, що призводить до дисфункції бар'єру, зниження виробництва АМФ, порушення диференціації кератиноцитів і симптомів свербіння. Хронічний atopічний дерматит характеризується рекрутуванням Th1, Th22 і Th17, що призводить до потовщення епідермісу та аномальної проліферації кератиноцитів [11].

Симптомами даного алергічного захворювання є свербіж, нечітка папульозна еритема та дрібні лусочки, які зазвичай вражають згини (шию, зап'ястки, щиколотки та повіки тощо). Усі ці симптоми призводить до потовщення та збільшення лущення шкіри [12].

1.4 Роль IgE у патофізіології алергічних захворювань

Імуноглобулін E(IgE), названий у 1968 році, є останнім із п'яти відкритих імуноглобулінів людини, який зазвичай пов'язаний із різноманітними проявами алергічних захворювань. Як один із п'яти ізотипів імуноглобуліну, імуноглобулін E (IgE) відіграє важливу роль у atopічних станах, викликаючи реакції гіперчутливості негайного типу. IgE також значно сприяє імунній відповіді організму на паразитарні інфекції, які більш поширені в країнах третього світу. У плазмі виявлена частина антитіл IgE [13].

Імуноглобуліни — гетеродимерні білки, що складаються з двох важких (H) і двох легких (L) ланцюгів. Їх можна функціонально розділити на варіабельні (V) домени, які зв'язують антигени, і константні (C) домени, які визначають ефекторні функції, такі як активація комплементу або зв'язування з Fc-рецепторами [25]. Загалом виділяють п'ять типів імуноглобулінів у людини: IgM, IgG, IgA, IgE та IgD.

IgM має молекулярну масу 970 Kd і середню концентрацію в сироватці крові 1,5 мг/мл. Він в основному виробляється під час первинної імунної відповіді на інфекційні агенти або антигени. Даний імуноглобулін є пентамером і активує класичний шлях системи комплементу. IgM розглядається як потужний аглютинін [26].

IgG є мономером з молекулярною масою 146 Kd, його концентрація у сироватці становить 9,0 мг/мл. IgG синтезується здебільшого під час вторинної імунної відповіді на патогени [26].

IgA представлений у 2 різних молекулярних структурах: мономерній (сироватковій) і димерній (секреторній) формах. Сироватковий IgA має молекулярну масу 160 Kd і сироваткову концентрацію 3 мг/мл. Секреторний IgA (sIgA) має молекулярну масу 385 Kd і середню концентрацію у сироватці крові 0,05 мг/мл. IgA є основним антитілом у виділеннях, які містяться у слині, сльозах, молозиві, виділеннях кишківника, статевих і дихальних шляхів [26].

IgE є мономером, має молекулярну масу 188 Кд і концентрацію у сироватці 0,00005 мг/мл. Він захищає від паразитів і зв'язується з високоафінними рецепторами тучних клітин і базофілів, викликаючи алергічні реакції.

IgE вважається найважливішим захистом хазяїна від різних паразитарних інфекцій [26]. Зазвичай він присутній у плазмі крові, при цьому його концентрація менше 1 мкг/мл і має період напіврозпаду приблизно 2 доби у сироватці [27]. Особливою властивістю IgE є те, що він здатний проходити через плаценту [28].

IgD є мономером з молекулярною масою 184 Кд. IgD присутній у мізерній кількості в сироватці (0,03 мг/мл) і має невідому функцію проти патогенів. IgD може відігравати важливу роль у диференціюванні лімфоцитів, викликаному антигеном [26].

Алергія, опосередкована імуноглобуліном E (IgE), є найпоширенішим захворюванням гіперчутливості, яким страждає понад 30% населення. Вплив навіть незначних кількостей алергенів може призвести до вироблення антитіл IgE у хворих на atopію. Це називається алергічною сенсibiliзацією, яка виникає переважно в ранньому дитинстві. Потім алергенспецифічний IgE зв'язується з рецепторами високої (FcεRI) і низькоафінної (FcεRII, також званий CD23) для IgE на ефекторних клітинах і антигенпрезентуючих клітинах. Подальший і повторний вплив алергену підвищує рівень алергенспецифічного IgE і, шляхом перехресного зв'язування рецепторів, викликає негайне вивільнення медіаторів запалення з тучних клітин і базофілів [14].

1.5 Імунологічні методи оцінки імунітету та IgE

Першим цікавим методом є проточна лазерна цитфлюориметрія, при якій можна визначити кількість моноцитів, лімфоцитів і гранулоцитів. Основа методу – це реєстрація світлорозсіювання і флюоресценції конкретно клітини у суспензії. Цей метод використовується з моноклональними антитілами, зв'язаними з флюоресцентними барвниками, що забарвлюють клітини крові [17].

Наступний метод дозволяє визначити вміст Т-лімфоцитів шляхом розеткоутворення з еритроцитами барана. Т-лімфоцити мають рецептори до цих клітин, що фактично є маркером для їх розпізнавання [17].

Окремо проводять тестування навантажень з лікарськими препаратами, що дозволяє визначати ефективність лікування. Для цього клітини інкубують певний час з відомими концентраціями ліків, часто імунокорегуючим, задля оцінки їх впливу на клітини і послідууючої екстраполяції на організм [17]

Вміст імуноглобулінів IgA, IgM, IgG оцінюється часто імуноферментним методом (ІФА). Основа методу – детекція у сироватці крові імуноглобулінів А, М, G за участі антиглобулінів-кон'югатів. Інтенсивність забарвлення обернено пропорційна вмісту антитіл у зразку [17].

Рівень IgE також можна визначити у сироватці імуноферментним методом, для цього береться імуноферментний аналіз у конфігурації сендвіч. У мікропланшет, на поверхні якого лежать специфічні анти IgE антитіла кладуть досліджувані зразки. Антиген вступає в реакцію з антитілами лунки. Потім після, відмивки, додають хромогенну суміш, та фотометрично визначають вміст IgE [17].

Хемілюмінесцентний імуноаналіз (CLIA) — це методика імунологічного аналізу, де міткою, тобто справжнім «індикатором» аналітичної реакції, є люмінесцентна молекула. Загалом, люмінесценція - це випромінювання видимого або майже видимого ($\lambda = 300\text{--}800$ нм) випромінювання, яке генерується, коли електрон переходить із збудженого стану в основний. Результиуюча потенційна енергія в атомі виділяється у вигляді світла [29].

Технологія CLIA дозволяє проводити аналітичні процедури з нижчими межами виявлення аналіту, ніж інші методи імунологічного аналізу. Іншими словами, CLIA здатний визначити наявність антитіл у надзвичайно низьких концентраціях (межа виявлення – зептомоль 10^{-21} моль) [29].

Аглотинація крові або гемаглотинація — це тип аглотинації, який виникає, коли антитіла зв'язуються зі специфічними сайтами зв'язування на

антигенах, що експресуються на еритроцитах (еритроцитах). Через легкість реакції злипання гемаглютинація є критично важливим методом у класифікації групи кров [30].

Реакції гемаглютинації традиційно проводяться двома способами: вручну за допомогою предметних скель і тестів аглютинації в пробірці та автоматично за допомогою тесту на гелевій колонці [30].

У найбільш поширеному підході до використання методу ELISA аліквоту зразка або калібратора, що містить антиген (Ag), який потрібно кількісно визначити, додають і дають зв'язатися з твердофазним антитілом (Ab). Після промивання додається мічене ферментом антитіло, яке утворює «сендвіч-комплекс» із твердофазного ферменту Ab-Ag-Ab. Незв'язане антитіло потім вимивається, і додається ферментний субстрат. Кількість утвореного продукту пропорційна кількості антигену в зразку [33].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Підготовка зразків до проведення дослідження

Підготовка зразків є ключовим етапом у будь-якому лабораторному дослідженні, включаючи дослідження показників загального IgE. Правильна підготовка забезпечує точність і надійність результатів

Для визначення показників IgE використовується сироватка крові.

Сироватку отримують наступним чином:

1) Виконують забір цільної крові у мікроцентрифужну пробірку. Здійснюється процедура на тще серце.

2) Після збору цільної крові дають їй згорнутися, залишивши її при кімнатній температурі. Зазвичай це займає 15-30 хвилин.

3) Видаляють згусток центрифугуванням (рис. 2.1.) при 1000-2000 об/хв протягом 10 хвилин.



рис 2.1. Центрифуга ELMi CM-6M в лабораторії IQLab

4) Після центрифугування, отриманий супернатант (сироватку) важливо негайно перенести у чисту мікроцентрифужну пробірку за допомогою піпетки.

5) Зразки слід зберігати при 2-8°C під час роботи.

Центрифуга є основним лабораторним інструментом для підготовки зразків до дослідження, зокрема в медичних та наукових лабораторіях. Вона використовується для розділення компонентів рідких сумішей за допомогою відцентрової сили, що створюється при швидкому обертанні

2.2 Зберігання сироватки крові

Умови зберігання сироватки дуже важливі, щоб її компоненти не втратили ефективність. Крім того, їх можна зарахувати до матеріалів, які можуть псуватися через причини, пов'язані з нагріванням.

Найважливішим фактором умов зберігання сироватки є температура. Сироватка крові зберігається при температурі +2 до +8 °C до 48 годин, а для довгострокового зберігання її заморожують при -20 до -80 °C, що дозволяє зберігати сироватку кілька тижнів, з мінімальними змінами її властивостей, при цьому уникаючи багаторазового розморожування.

Сироватки, в тому числі ізотонічні сироватки, які повинні зберігатися при температурі нижче 25 градусів, зазвичай використовуються протягом 4 годин. Перед використанням їх рекомендується зберігати в холодильнику і довести до кімнатної температури. Якщо не вжити необхідних заходів щодо умов зберігання сироватки, можна побачити деформації, такі як утворення осаду.

2.3 Проведення дослідження сироватки крові дітей на вміст IgE

Імуноглобулін Е відповідає за розвиток алергічної реакції, виробляється локально, переважно у підслизовому шарі тканин, які контактують із зовнішнім середовищем.

Імуноглобулін Е (IgE), незважаючи на те, що конститутивно присутній на низьких рівнях, раніше найчастіше досліджувався при atopічному захворюванні, де він відіграє важливу роль у дегрануляції тучних клітин та

ініціації відповіді Т-хелпера 2 (Th2). Проте з появою більш точним методів аналізу, було встановлено провідну роль IgE у активному розвитку багатьох алергічних станів та патологій [34].

Хоча дегрануляція, опосередкована IgE, є ефективним засобом ініціації захисної імунної відповіді, цей процес також може завдати значної шкоди здоровій тканині.

Класична IgE-опосередкована активація відбувається через FcεRI на тучних клітинах і базофілах. Мультивалентні антигени перехресно зв'язують з'єднаний з рецептором IgE, щоб викликати дегрануляцію та вивільнення попередньо сформованих медіаторів. Це прозапальне середовище залучає імунні клітини та ініціює імунну відповідь Т-хелпера 2[34].

Імуноглобулін Е (IgE) є ключовим маркером алергічних реакцій, і його вимірювання в сироватці крові є важливим етапом діагностики та моніторингу алергічних захворювань у дітей. Рівень IgE може бути підвищеним при різних алергічних та інших патологічних станах, тому визначення його концентрації допомагає лікарям визначити причину симптомів і розробити відповідну стратегію лікування.

Дослідження зразків проводили імунохемілюмінесцентним методом за допомогою аналізатору **Immulite 2000 XPI**. Це універсальний імунологічний аналізатор, призначений для швидкого та точного аналізу імунологічних проб. Перевагами даного методу є те, що аналізатор здатний проводити молекулярну алергодіагностику, дозволяє виявити наявність алергії і визначити основні фактори її розвитку на ранніх етапах захворювання, а також уникнути помилкового діагностування алергії або її причини при низьких рівнях імуноглобуліну. Загалом технологія ферментативно-посиленої хемілюмінесценції забезпечує високу точність і відтворюваність. Хемілюмінесценція в імуноферментних аналізаторах, таких як (Immulite 2000), – це метод, при якому світло випромінюється в результаті хімічної реакції. Він використовується для виявлення та кількісного визначення біомаркерів, наприклад, загального IgE. У процесі реакції утворюється світло,

інтенсивність якого вимірюється і пропорційна концентрації цільової речовини в зразку.

Immulate 2000 (рис. 2.2) — це високоточний імунохімічний аналізатор, який широко використовується для вимірювання концентрацій різних біомаркерів, включаючи імуноглобулін Е (IgE) в сироватці крові. Використання приладу забезпечує швидке та точне визначення рівнів IgE, що є критично важливим для діагностики та моніторингу алергічних захворювань у дітей.

Він здатний виконувати понад 100 видів тестів, таких як аналіз гормонів, алергічних маркерів та онкомаркерів. Цей прилад забезпечує високу точність і швидкість аналізу (до 200 тестів на годину), що робить його незамінним у медичних лабораторіях для діагностики різноманітних захворювань.



рис. 2.2. Імунохімічний аналізатор Immulate 2000 для визначення показників IgE

Прилад Immulite 2000 використовує сироватку крові для проведення аналізів, її кількість залежить від тесту, який проводиться. Зазвичай це від 25 до 100 мкл. Інформацію про точну кількість сироватки для конкретного тесту можна знайти у інструкції з експлуатації. З метою визначення концентрації IgE у сироватці крові дітей віком від 1 до 15 років застосовували 10 мкл згідно з інструкцією.

Для проведення діагностичного аналізу, застосовують готовий набір реагентів, який має наступні складники:

- 1) реагент для зв'язування – складається з антитіл до досліджуваного антигену;
- 2) реагент для мітки – до його складу входять мічені радіоактивним ізотопом антитіла, які зв'язуються з комплексом антиген-антитіло;
- 3) розчин для промивання – використовується для видалення надлишкових реагентів.
- 4) калібрувальні та контрольні розчини – перші використовуються для побудови калібрувальної кривої, наступні – для перевірки працездатності системи.

Один цикл роботи приладу зазвичай триває 20-60 хв. Визначення IgE відбувається протягом 30 хв.

Виділяють наступні етапи роботи під час проведення дослідження:

- 1) Здійснення забору дослідної крові та отримання сироватки для подальших досліджень. Сироватка може зберігатися при $+2...+8^{\circ}\text{C}$ до моменту проведення аналізу.
- 2) Перевірка стану приладу, калібрування та налаштування параметрів відповідно до інструкцій виробника.
- 3) Завантаження необхідних реагентів та тест-смужок.
- 4) Дослідні зразки сироватки розміщуються у спеціальні штативи для аналізу.
- 5) Проводиться маркування зразків для уникнення помилок у ідентифікації.

6) Зразки вводяться у прилад, де відбувається автоматичне змішування сироватки з реагентами.

7) Відбувається хемілюмінесцентна реакція, під час якої світловий сигнал пропорційний концентрації IgE.

8) Прилад автоматично обробляє результати і видає концентрацію IgE у МО/мл.

Результати можуть бути виведені на екран, роздруковані або передані на комп'ютер для подальшого аналізу.

Дослідження рівня IgE у сироватці крові дітей на приладі Immulite 2000 є ефективним методом діагностики і моніторингу алергічних захворювань. Завдяки високій точності, автоматизації процесу і швидкому отриманню результатів, Immulite 2000 забезпечує надійну діагностику, що є ключовим для своєчасного лікування і покращення якості життя пацієнтів.

2.4 Визначення показників IgE у зразках крові дітей

Вважається, що близько 50% жителів країн Європи мають симптоми алергії, серед них 30% дітей. Найбільш поширеними алергічними захворюваннями є бронхіальна астма, алергічний риніт та atopічний дерматит. Великою проблемою сучасності є розвиток харчової алергії у дітей.

Імуноглобулін E (IgE) є одним з п'яти основних класів імуноглобулінів (антитіл), які виробляються імунною системою людини. IgE відіграє ключову роль у реакціях гіперчутливості негайного типу, зокрема в алергічних реакціях та захисті від паразитарних інфекцій.

Підвищення рівня імуноглобуліну E (IgE) є ознакою алергічних захворювань. Однак високі рівні IgE також зустрічаються при ряді інших інфекційних і неінфекційних захворювань. У більшості випадків підвищений рівень IgE свідчить про алергію, екзему або хронічну інфекцію шкіри. Дуже високі рівні IgE не є рідкістю у пацієнтів з активною екземою, але частіше вказують на моногенний atopічний розлад або вроджені порушення імунітету з atopічним фенотипом [35].

Високі рівні IgE також виявляються при ряді інфекційних захворювань, таких як паразитарні інфекції, інфекція вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ), мікобактерії туберкульозу, цитомегаловірус, вірус Епштейна-Барра, проказа та кандидоз. Запальні захворювання, такі як еозинофільний гранулематоз з поліангіїтом і хвороба Кавасакі, також характеризуються підвищеним рівнем IgE. Крім того, високі рівні IgE можна виявити в таких новоутвореннях, як лімфома Ходжкіна та мієлома IgE. Інші захворювання, пов'язані з підвищенням рівня IgE в сироватці крові, включають муковісцидоз, нефротичний синдром, трансплантацію кісткового мозку, реакцію «трансплантат проти господаря» та бульозний пемфігоїд. Куріння тютюну та використання азтреонаму або пеніциліну G можуть призвести до підвищення загального рівня IgE[35].

За період з липня 2023 р. по червень 2024 р. на базі приватної клініко-діагностичної лабораторії «IQ-Lab» було проаналізовано 2825 дослідних зразків на вміст IgE у сироватці дітей різного віку. Дані пацієнти мали або симптоми алергічних захворювань, або вже страждали на певну патологію (наприклад, мали бронхіальну астму).

Було сформовано три групи дітей залежно від віку:

I група – від 1 до 5 років;

II група – від 6-9 років;

III група – 1-15 років.

Загалом, було встановлено (рис. 2.3), що серед 2825 дослідних зразків переважна більшість – 1300, що становить 46 % отримана від II групи дітей, віком від 6-9 років.

За вказаний період часу було досліджено на вміст IgE 925 зразків сироватки крові, що складало майже 33 % у дітей віком від 1-5 років, що не може не звернути на себе увагу. Від найстаршої вікової групи – 10-15 років – було отримано 21 % (600 дослідних зразків).

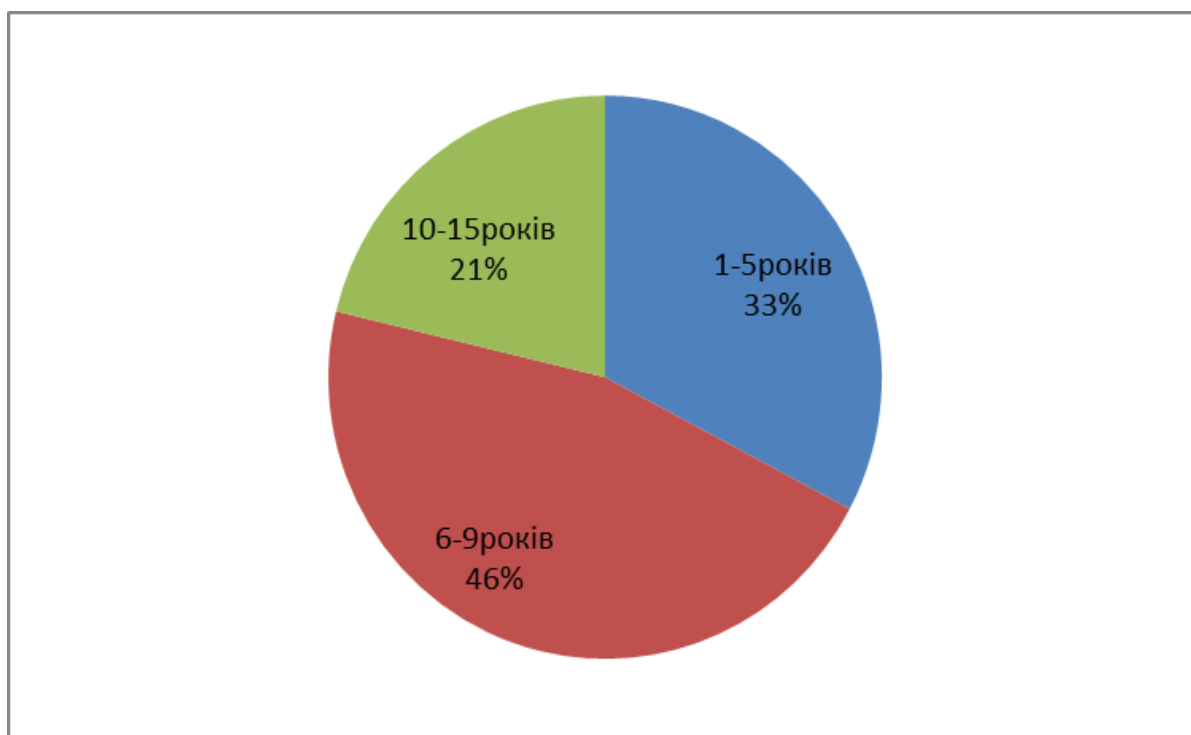


Рис. 2.3 Кількість проведених досліджень у різних вікових групах

Таким чином, можна сказати, що у період активного формування імунної систем дитини відбувається її сенсibilізація, яка провокує симптоми найпоширеніших алергічних захворювань та реакцій. У тому випадку, якщо вчасно не зреагувати та не попередити даний стан, можуть розвинути патологічні стани, що потребуватимуть активної терапії.

2.5 Дослідження поширення алергічних захворювань у дітей

Великою проблемою сучасності є поширення алергічних захворювань, а саме atopічного дерматиту, бронхіальної астми та алергічного риніту серед дітей. Окремо, обов'язково потрібно згадати про харчові алергії, на них страждають діти з раннього віку і останнім часом поширення даних патологічних станів набуває неабияких масштабів.

У зв'язку з цим, було проведено аналіз частоти поширення алергічних захворювань серед дітей різних вікових груп. Як вже було вказано, досліджували 2825 зразків крові.

З огляду на рисунок 2.4, серед дітей віком від 1 до 5 років найпоширенішим виявилось захворювання на atopічний дерматит.

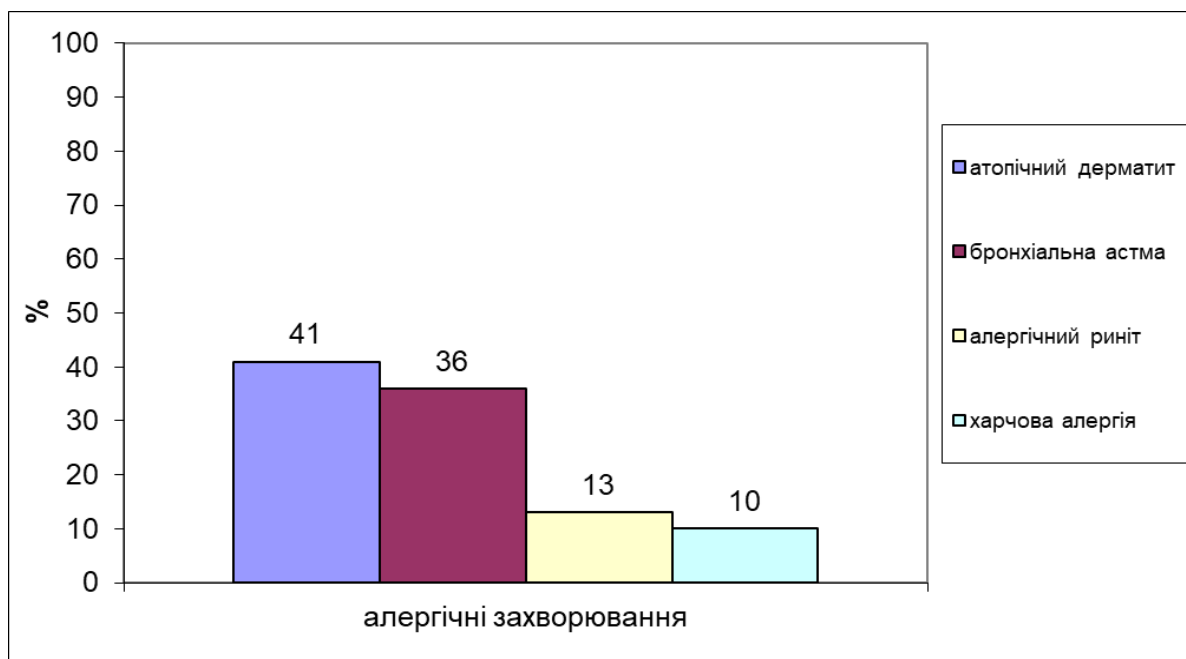


рис. 2.4 Поширення алергічних захворювань у дітей віком 1-5 років

Атопічний дерматит – це хронічне алергічне захворювання шкіри, що розвивається у дитячому віці та характеризується стійким рецидивуючим перебігом. Має IgE – залежний механізм.

Потрібно відмітити, що причинами атопічного дерматиту у дітей I групи може бути недотримання правил санітарної гігієни, реакція на дитячі косметичні засоби, генетика тощо.

На другому місці за поширенням серед дітей I вікової групи була бронхіальна астма. Саме у такому віці часто спостерігається дебют даного захворювання, тому дуже важливим є вчасна діагностика. Для того, щоб у подальшому уникнути хронізації процесу та переходу у тяжкі форми.

Такі захворювання, як алергічний риніт та харчова алергії серед дітей даної вікової групи зустрічалися найменше – 13% та 10% відповідно.

З огляду на рисунок 2.5, серед дітей віком від 6 до 9 років найпоширенішим виявилось захворювання на бронхіальну астму.

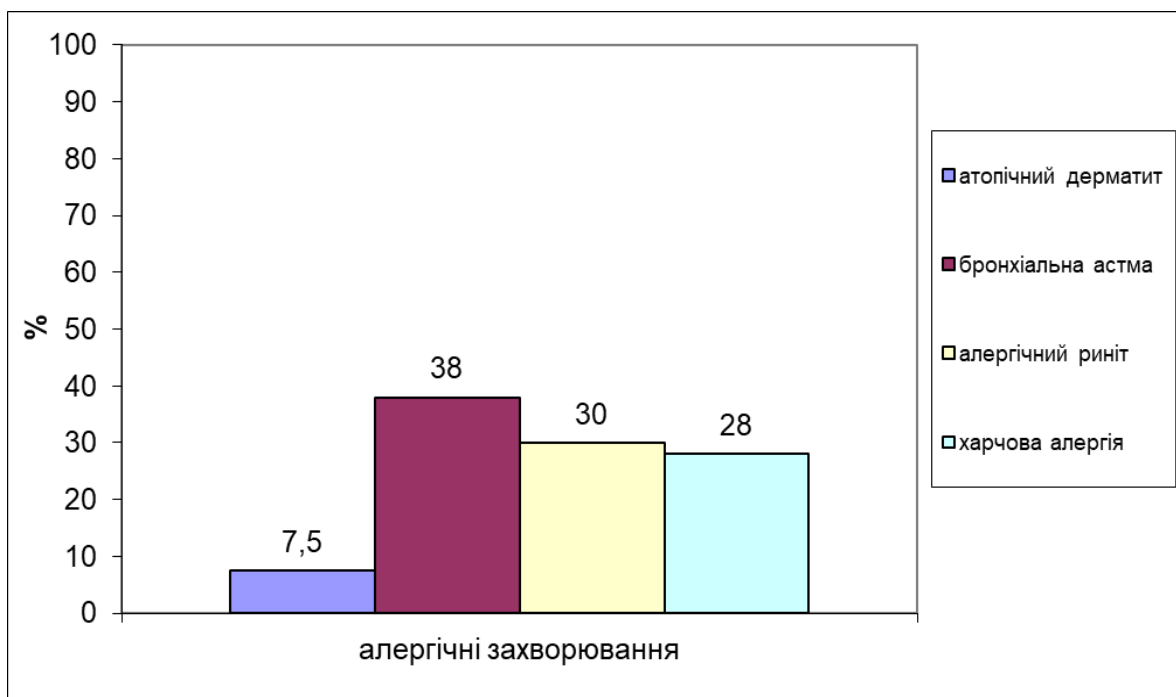


Рис.2.5. Поширення алергічних захворювань у дітей віком 6-9 років

Бронхіальна астма — це хронічне запальне захворювання дихальних шляхів, що характеризується спазмом та запаленням слизової оболонки бронхів і збільшенні слизової секреції. Основні симптоми включають приступи задишки, кашлю, характерне дихання та відчуття стиснення в грудях. Астма часто викликана алергічною реакцією на різні тригери, такі як пилок, шерсть тварин, харчові алергени чи інші подразники. Це захворювання потребує системного лікування для контролю симптомів та запобігання загострень.

На другому місці за поширенням серед дітей II вікової групи був алергічний риніт, це запальне захворювання слизової оболонки носа, спричинене алергічною реакцією на певні алергени, такі як пилок квітучих рослин, плісняву тощо.

На третьому місці за поширеністю є харчова алергія. Харчова алергія у дітей віком 6-9 років може проявлятися як реакція імунної системи на певні харчові продукти. Найпоширенішими є реакції на «червону» групу фруктів, наприклад, полуниця, а також цитрусові та яйця, але останнім часом даний перелік значно розширився.

Атопічний дерматит у дітей віком від 6 до 9 років є одним із проявів алергічних захворювань шкіри, характеризується запаленням та свербіжем шкіри. Він виявляється у малих процентах дітей цього вікового діапазону.

З огляду на рисунок 2.6, серед дітей віком від 10 до 15 років найпоширенішим виявилось захворювання на харчову алергію.

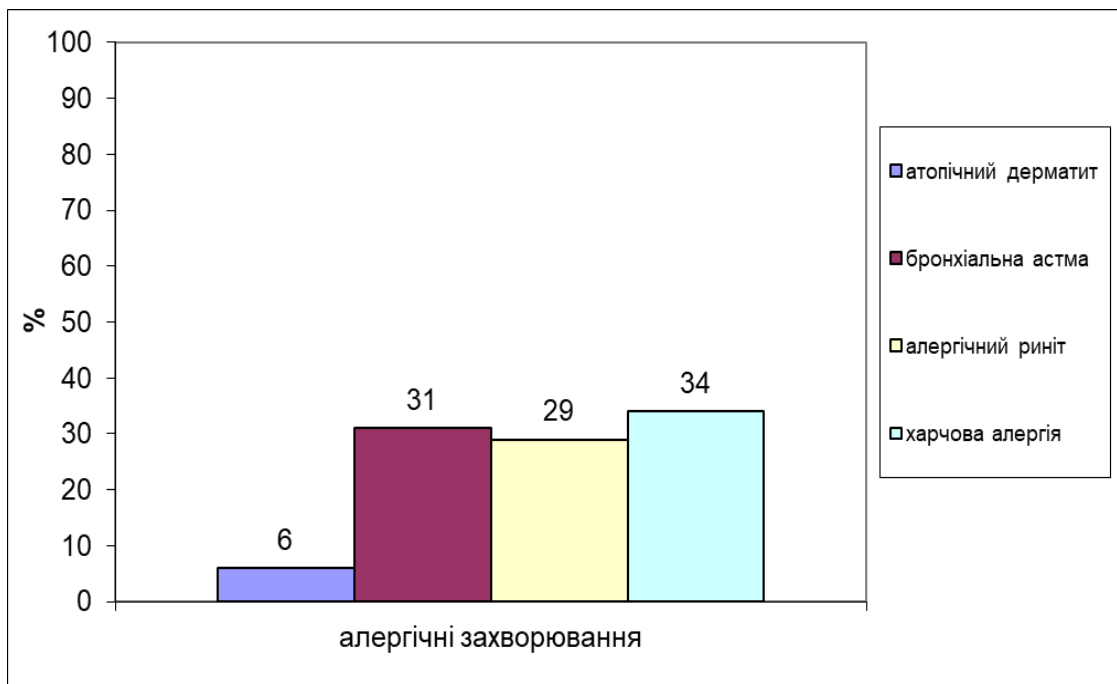


Рис. 2.6. Поширення алергічних захворювань у дітей віком 10-15 років

Харчова алергія виникає як негативна імунна реакція на певні їжу. Вона може проявлятися широким спектром симптомів, від легких до тяжких, включаючи свербіж, висип, відшарування шкіри, гострі кишкові реакції або навіть анафілактичний шок, що може бути життєзагрозливим.

На другому місці за поширенням серед дітей III вікової групи розділили між собою бронхіальна астма та алергічний риніт.

Атопічний дерматит у дітей віком від 10 до 15 років може виявлятися менш часто порівняно з молодшими віковими групами. Однак у деяких дітей цей захворювання може продовжувати проявлятися або поглиблюватися в цьому віці. Атопічний дерматит є хронічним запальним захворюванням шкіри, яке часто пов'язане з алергічними реакціями та може бути спровоковане різними факторами, включаючи генетичність, середовище та

імунну систему. Бронхіальна астма у такому віці найчастіше характеризується тяжким протіканням та має складні форми, що пояснюється невчасним діагностуванням захворювання у ранньому віці.

Таким чином, можна сказати, що алергічні захворювання поширені у різних вікових групах. Їх розвиток пов'язаний не лише з генетичним анамнезом, але й з іншими факторами, такими як: вплив навколишнього середовища, особливості харчування, застосування косметичних засобів тощо.

2.6 Дослідження показників IgE у дітей різних вікових груп

Згідно з даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), atopічний дерматит є найпоширенішим алергічним захворюванням у дітей, вражаючи до 20% дітей у всьому світі.

Бронхіальна астма є другим за поширеністю алергічним захворюванням у дітей, вражаючи до 10% дітей у всьому світі. Алергічний риніт вражає до 15% дітей у всьому світі. Харчова алергія вражає до 5% дітей у всьому світі.

У ході проведених досліджень було встановлено показники IgE у дітей різних вікових груп. Загалом проаналізовано 2825 дослідних зразків за період з травня по червень 2023-2024 рр.

Потрібно вказати показники норми IgE залежно від віку дітей, з якими проводилося порівняння: 1-5 років: <60,0 МО / мл 6-9 років <90,0 МО / мл 10-15 років <200 МО / мл.

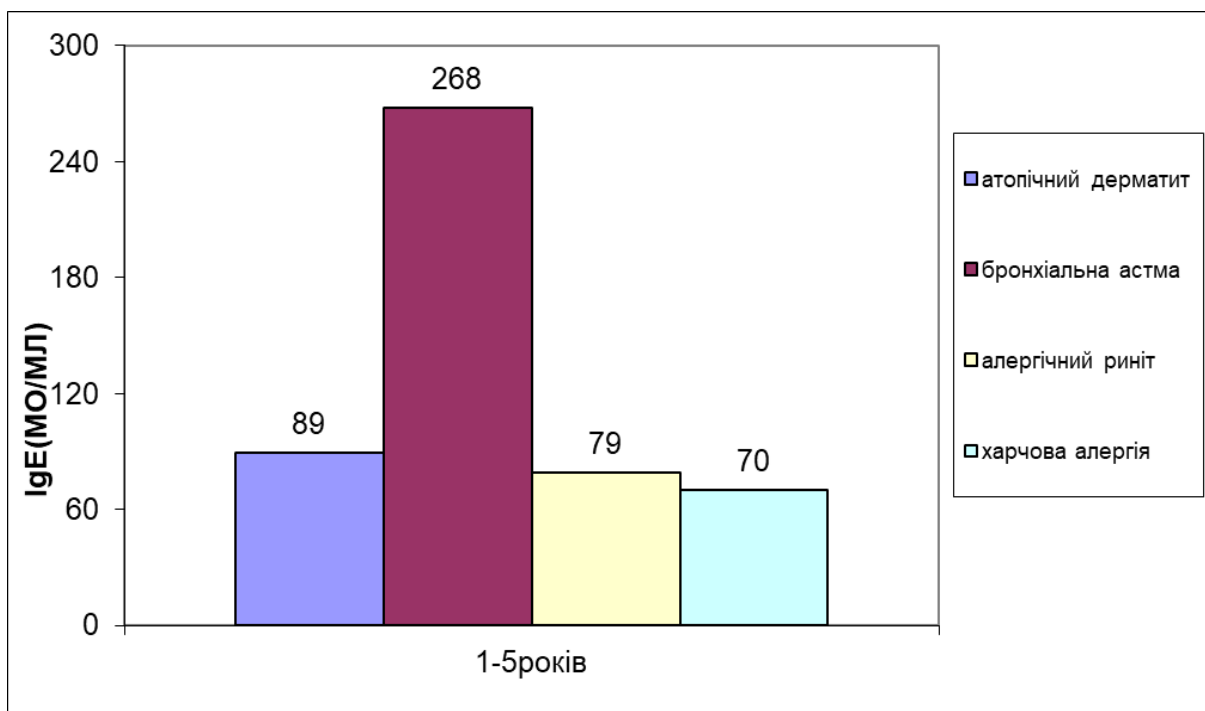


рис. 2.6. Середні показники IgE для дітей I вікової групи

Встановлено, що у дітей віком від 1-5 років середні показники IgE при атопічному дерматиті перевищували норму у 1,5 разів, а при розвитку бронхіальної астми – у 4,5 порівняно з контролем. При цьому харчова алергія та алергічний риніт у дітей даної вікової групи не були вираженими.

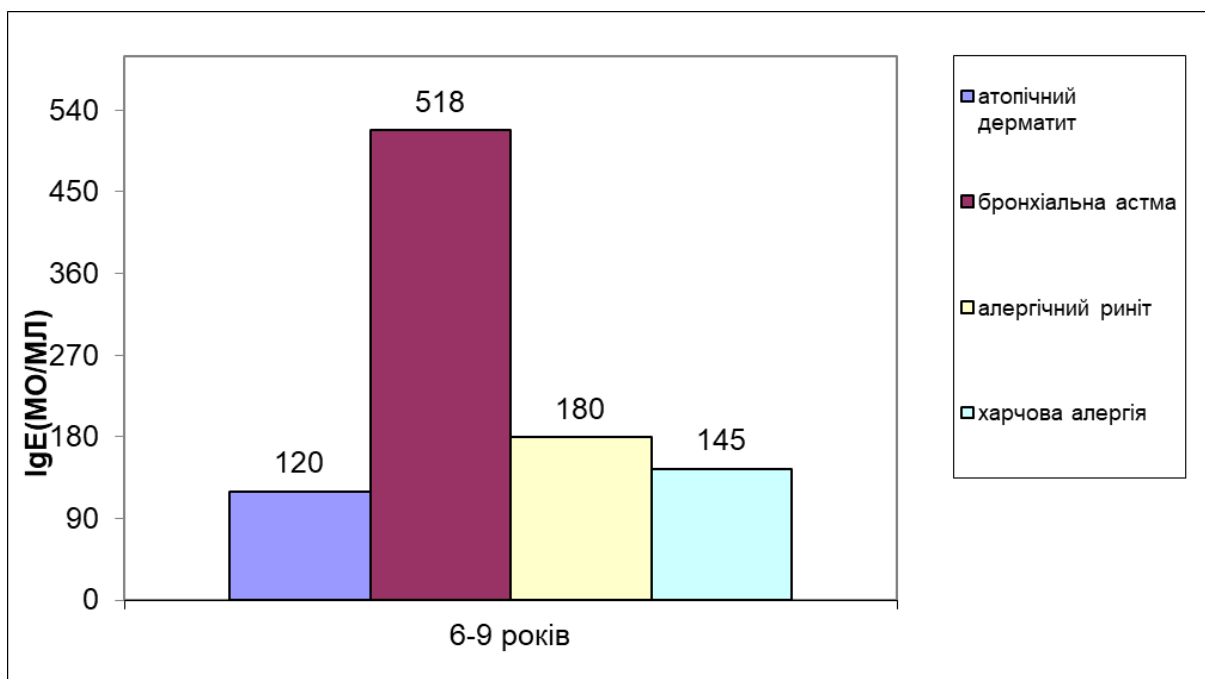


рис 2.7. Середні показники IgE для дітей II вікової групи

Виявлено, що дітей віком 6-9 років – при бронхіальній астмі середні показники IgE у середньому у 5,6 разів, а при алергічному риніті – у 2 рази

вище за норму. Потрібно відмітити, що харчова алергія спостерігається частіше і середні показники імуноглобуліну Е перевищують норму у 1,6 разів.

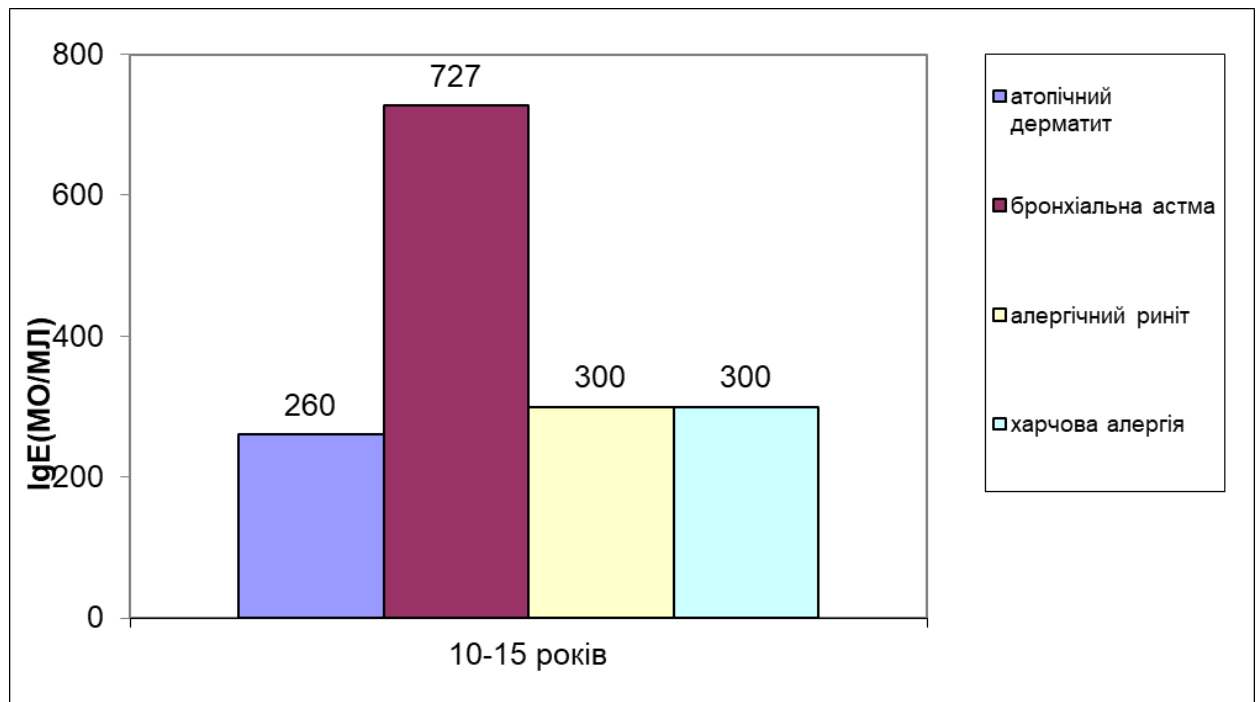


Рис. 2.6. Середні показники Ig E для дітей III вікової групи

У дітей віком від 10-15 років значно перевищували показники IgE при бронхіальній астмі, що говорить про її тяжкий перебіг. При цьому у середньому показник перевищував норму у 3,7 рази. Це пояснюється тим, що у такому віці дане захворювання є хронічним та рецидивуючим, може провокуватися рядом факторів. Прояви харчової алергії та алергічного риніту – у 1,5 разів вище за контроль.

Таким чином, з огляду на отримані результати, можемо сказати, що вчасна і правильна діагностика із застосуванням надчутливих та точних імунохімічних методів дасть можливість попереджувати розвиток алергічних захворювань у дітей, а також призначати адекватну лікувальну терапію.

ВИСНОВКИ

Сьогодні, у зв'язку з високим рівнем антропогенного навантаження на організм людини, спостерігається постійне зростання алергічних захворювань, особливо у дітей. За останніми даними, близько 50% жителів країн Європи мають симптоми алергії, серед них 30% дітей, що викликає неабияке занепокоєння.

1) Алергія – це стан підвищеної чутливості імунної системи організму на певні речовини – алергени, що знаходяться у навколишньому середовищі. Найбільш поширеними алергічними захворюваннями є бронхіальна астма, алергічний риніт та атопічний дерматит.

2) Невчасна та неадекватною діагностика алергічних реакцій у ранньому віці, провокує розвиток алергічних захворювань у старшої вікової групи та провокує хронізацію даних процесів. Особливо це небезпечно для дітей, так як їх імунна система знаходиться у стані активного формування.

3) За період з липня 2023 р. по червень 2024 р., на базі приватної клініко-діагностичної лабораторії «IQ-Lab» було проаналізовано 2825 дослідних зразків сироватки дітей різного віку на вміст IgE. Імуноглобулін E відповідає за розвиток алергічної реакції, виробляється локально, переважно у підслизовому шарі тканин, які контактують із зовнішнім середовищем. Дослідження проводили у трьох вікових групах дітей: I група – 1-5 років, II група – 6-9 років, III група – 10-15 років.

4) Дослідження показників IgE здійснювали імунохемілюмінісцентним методом за допомогою аналізатору Immulite 2000 XPI. Це універсальний імунологічний аналізатор, призначений для швидкого та точного аналізу імунологічних проб. Перевагами даного методу є те, що аналізатор здатний проводити молекулярну алергодіагностику, дозволяє виявити наявність алергії і визначити основні фактори її розвитку на ранніх етапах захворювання, а також уникнути помилкового діагностування алергії або її причини при низьких рівнях імуноглобуліну.

5) Встановлено, що серед 2825 дослідних зразків, переважна більшість – 46 % отримана від II вікової групи дітей, 33 % досліджень проведено для дітей віком від 1-5 років та 21 % – це найстарша вікова група (10-15 років).

6) Проаналізовано частоту поширення алергічних захворювань серед дітей різних вікових груп, а саме – алергічного риніту, atopічного дерматиту, бронхіальної астми та харчової алергії.

7) Встановлено, що серед дітей віком 1-5 років найпоширенішим виявилось захворювання на atopічний дерматит – 41 %, (розвивається у дитячому віці та характеризується стійким рецидивуючим перебігом), на другому місці – бронхіальна астма – 36 % (часто спостерігається дебют даного захворювання, тому дуже важливим є вчасна діагностика), 13 % та 10 % - алергічний риніт та харчова алергія відповідно.

8) Діти віком 6-9 років найчастіше хворіли на бронхіальну астму – 38 %, на другому місці алергічний риніт 30 %, 28 % – харчова алергія та 7,5 %– atopічний дерматит.

9) Серед дітей віком 10-15 років найпоширенішим було захворювання на харчову алергію – 34 %. Бронхіальна астма підтвердилася у 31 % пацієнтів (найчастіше у такому віці дане захворювання перебігає зі значними ускладненнями). Алергічний риніт – на рівні 29 % та atopічний дерматит – 6 %.

10) У ході проведених досліджень було вивчено показники IgE (МО/мл) у різних вікових групах дітей. Встановлено, що у I вікової групи середні показники IgE при atopічному дерматиті перевищували норму у 1,5, а при розвитку бронхіальної астми – у 4,5 разів порівняно з контролем.

11) Виявлено, у дітей віком 6-9 років – при бронхіальній астмі середні показники IgE у 5,6 разів, а при алергічному риніті – у 2 рази вище за норму. Харчова алергія спостерігається частіше і середні показники Ig E перевищують норму у 1,6 разів.

12) У дітей віком від 10-15 років значно перевищували показники IgE при бронхіальній астмі, що говорить про її тяжкий перебіг – у середньому у

3,7 рази порівняно з нормою. Прояви харчової алергії та алергічного риніту – у 1,5 разів вище за контроль.

13) Таким чином, з огляду на отримані результати, можемо сказати, що вчасна і правильна діагностика із застосуванням надчутливих та точних імунохімічних методів дасть можливість попереджувати розвиток алергічних захворювань у дітей, а також призначати адекватну лікувальну терапію.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Hu, T., Dong, Y., Yang, C., Zhao, M., & He, Q. (2021). Pathogenesis of children's allergic diseases: Refocusing the role of the gut microbiota. *Frontiers in Physiology*, 12, 749544. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.749544>.
2. Wang, J., Zhou, Y., Zhang, H., Hu, L., Liu, J., Wang, L., Wang, T., Zhang, H., Cong, L., & Wang, Q. (2023). Pathogenesis of allergic diseases and implications for therapeutic interventions. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 138. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01344-4>.
3. Chad, Z. (2001). Allergies in children. *Paediatrics & Child Health*, 6(8), 555–566. <https://doi.org/10.1093/pch/6.8.555>.
4. Elghoudi, A., & Narchi, H. (2022). Food allergy in children-the current status and the way forward. *World Journal of Clinical Pediatrics*, 11(3), 253–269. <https://doi.org/10.5409/wjcp.v11.i3.253>.
5. Lopez CM, Yarrarapu SNS, Mendez MD. Food Allergies. [Updated 2023 Jul 24]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482187/>].
6. Goniotakis, I., Perikleous, E., Fouzas, S., Steiropoulos, P., & Paraskakis, E. (2023). A clinical approach of allergic rhinitis in children. *Children*, 10(9), 1571. <https://doi.org/10.3390/children10091571>.
7. Scadding, G. K., Smith, P. K., Blaiss, M., Roberts, G., Hellings, P. W., Gevaert, P., McDonald, M., Sih, T., Halcken, S., Zieglmayer, P. U., Schmid-Grendelmeier, P., Valovirta, E., Pawankar, R., & Wahn, U. (2021). Allergic rhinitis in childhood and the new EUFOREA algorithm. *Frontiers in Allergy*, 2, 706589. <https://doi.org/10.3389/falgy.2021.706589>.
8. Nur Husna, S. M., Tan, H. T., Md Shukri, N., Mohd Ashari, N. S., & Wong, K. K. (2022). Allergic rhinitis: A clinical and pathophysiological overview. *Frontiers in Medicine*, 9, 874114. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.874114>.
9. Lizzo, J. M., Goldin, J., & Cortes, S. (2024). Pediatric asthma. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551631/>.

10. Sinyor, B., & Concepcion Perez, L. (2023). Pathophysiology of asthma. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551579/>.
11. Kim, J., Kim, B. E., & Leung, D. Y. M. (2019). Pathophysiology of atopic dermatitis: Clinical implications. *Allergy & Asthma Proceedings*, 40(2), 84–92. <https://doi.org/10.2500/aap.2019.40.4202>.
12. Plant, A., & Ardern-Jones, M. R. (2021). Advances in atopic dermatitis. *Clinical Medicine*, 21(3), 177–181. <https://doi.org/10.7861/clinmed.2021-0280>
13. Hostoffer, R. W., & Joseph, N. I. (2023). Immunoglobulin E. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482212/>.
14. Shamji, M. H., Valenta, R., Jardetzky, T., Verhasselt, V., Durham, S. R., Würtzen, P. A., & van Neerven, R. J. J. (2021). The role of allergen-specific IgE, IgG and IgA in allergic disease. *Allergy*, 76(12), 3627–3641. <https://doi.org/10.1111/all.14908>.
15. Nicholson, L. B. (2016). The immune system. *Essays in Biochemistry*, 60(3), 275–301. <https://doi.org/10.1042/EBC20160017>.
16. Justiz Vaillant, A. A., Sabir, S., & Jan, A. (2022). Physiology, immune response. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539801/>.
17. Кузнецова, Л. В., Бабаджан, В. Д., Харченко, Н. В., та ін. (Ред.). (2013). *Імунологія: Підручник*. Вінниця: ТОВ Меркьюрі Поділля.
18. Bayot, M. L., & Limaiem, F. (2023). Biosafety guidelines. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537210/>.
19. Ribes, R., Iannarelli, P., & Duarte, R. F. (2009). Laboratory safety and biohazards. In *English for Biomedical Scientists* (pp. 210–222). https://doi.org/10.1007/978-3-540-77127-2_13.
20. Langlois A. Negotiating Bioethics: The Governance of UNESCO’s Bioethics Programme. London and New York: Routledge; 2013. Chapter 2, Bioethics:

Human genetic and biomedical research ethics at UNESCO and beyond. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK189517/>.

21. Datta, S. K. (2020). Ethics in laboratory medicine: Perspectives and challenges in resource limited settings. *EJIFCC*, 31(4), 274–281. <https://doi.org/10.5339/qfarc.2020.HBPP2767>.
22. Dougherty, J. M., Alsayouri, K., & Sadowski, A. (2023). Allergy. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545237/>.
23. Lei, D. K., & Grammer, L. C. (2019). An overview of allergens. *Allergy & Asthma Proceedings*, 40(6), 362–365. <https://doi.org/10.2500/aap.2019.40.4247>.
24. Marwa, K., & Kondamudi, N. P. (2023). Type IV hypersensitivity reaction. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562228/>.
25. Schroeder, H. W., Jr., & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2 Suppl 2), S41–S52. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046>.
26. Justiz Vaillant, A. A., Jamal, Z., Patel, P., et al. (2023). Immunoglobulin. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513460/>.
27. Amarasekera, M. (2011). Immunoglobulin E in health and disease. *Asia Pacific Allergy*, 1(1), 12–15. <https://doi.org/10.5415/apallergy.2011.1.1.12>.
28. Rindsjö, E., Joerink, M., Papadogiannakis, N., & Scheynius, A. (2010). IgE in the human placenta: Why there? *Allergy*, 65(5), 554–560. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2010.02345.x>.
29. Cinquanta, L., Fontana, D. E., & Bizzaro, N. (2017). Chemiluminescent immunoassay technology: What does it change in autoantibody detection? *Autoimmunity Highlights*, 8(1), 9. <https://doi.org/10.1007/s13317-017-0097-2>.
30. Samae, M., Chatpun, S., & Chirasatitsin, S. (2021). Hemagglutination detection with paper-plastic hybrid passive microfluidic chip. *Micromachines*, 12(12), 1533. <https://doi.org/10.3390/mi12121533>.

31. Breiteneder, H., & Radauer, C. (2004). A classification of plant food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113(5), 821–830. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.01.779>.
32. Zahradnik, E., & Raulf, M. (2014). Animal allergens and their presence in the environment. *Frontiers in Immunology*, 5, 76. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00076>.
33. Alhajj, M., Zubair, M., & Farhana, A. (2023). Enzyme linked immunosorbent assay. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922/>.
34. Luker, A. J., Lownik, J. C., Conrad, D. H., & Martin, R. K. (2019). A new look at IgE beyond allergies. *F1000Research*, 8, F1000 Faculty Rev-736. <https://doi.org/10.12688/f1000research.18186.1>.
35. Kostova, P., Papochieva, V., Miteva, D., Georgieva, B., Mileva, S., Shahid, M., Lukanov, T., & Petrova, G. (2023). Elevated IgE levels-an allergy or an underlying inborn error of immunity in children with recurrent infections? *Antibodies*, 12(4), 70. <https://doi.org/10.3390/antib12040070>.