

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ВОЛИНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ЛЕСІ УКРАЇНКИ**

**Кафедра фізіології людини і тварин**

*На правах рукопису*

**ПАНАСЮК ТЕТЯНА ОЛЕКСАНДРІВНА**

**ПАРАЗИТАРНІ ІНВАЗІЇ ЛЮДИНИ В ПАТОГЕНЕЗИ  
РЕСПІРАТОРНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ**

Спеціальність: 091 Біологія

Освітньо-професійна програма: Лабораторна діагностика

Робота на здобуття освітнього ступеня «Магістр»

Науковий керівник:

**КОЗАЧУК НАТАЛІЯ ОЛЕКСАНДРІВНА,**

доктор біологічних наук, доцент

РЕКОМЕНДОВАНО ДО ЗАХИСТУ

Протокол № \_\_\_\_\_

засідання кафедри фізіології людини і тварин

від \_\_\_\_\_ 2023

Завідувач кафедри

доц. Качинська Т.В. \_\_\_\_\_

**ЛУЦЬК – 2023**

**Анотація**

**Панасюк Т.О. ПАРАЗИТАРНІ ІНВАЗІЇ ЛЮДИНИ В ПАТОГЕНЕЗІ РЕСПІРАТОРНИХ ЗАХВОРИЮВАНЬ.** Робота присвячена вивченню особливостей біології основних збудників паразитарних інвазій як *Ascaris lumbricoides*, *Toxocara canis*, *Gardia lamblia*, *Echinococcus granulosus*, *Opistorchosis felinus*. Описаний взаємозв'язок між інфікуванням даними паразитами та розвитком респіраторних захворювань. Обрахований рівень антитіл IgG до *Toxocara canis*, *Ascaris lumbricoides* у вибірці із 18 пацієнтів. Знайдено взаємозв'язок між рівнем антитіл IgG до *Toxocara canis* та *Ascaris lumbricoides* через коефіцієнт кореляції Пірсона.

Ключові слова: паразитичні інвазії, респіраторні захворювання, IgG.

### **Abstract**

**Panasiuk T.O. PARASITIC INVASIONS OF HUMANS IN THE PATHOGENESIS OF RESPIRATORY DISEASES.** The work is devoted to the study of the peculiarities of the biology of such main causative agents of parasitic invasions as *Ascaris lumbricoides*, *Toxocara canis*, *Gardia lamblia*, *Echinococcus granulosus*, *Opistorchosis felinus*. The relationship between the identification of the described parasites and the development of respiratory diseases is described. The calculated level of IgG antibodies to *Toxocara canis*, *Ascaris lumbricoides* in a selection of 18 patients. The Pearson correlation coefficient revealed a relationship between the level of IgG antibodies to *Toxocara canis* and *Ascaris lumbricoides*.

Key words: parasitic invasion, respiratory disease, IgG

### **ЗМІСТ**

ВСТУП.....	4
------------	---

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	6
1.1. Загальна характеристика респіраторних захворювань.....	6
1.2. Механізми розвитку респіраторних захворювань у відповідь на інвазію певних паразитів.....	9
1.2.1. Біологічні особливості <i>Ascaris lumbricoides</i> .....	9
1.2.2. Цикл розвитку та біологічні особливості <i>Toxocara canis</i> .....	13
1.2.3. Життєвий цикл <i>Giardia lamblia</i> .....	15
1.2.4. Біологія <i>Echinococcus granulosus</i> .....	17
1.2.5. Біологічні ознаки <i>Opisthorchis felinus</i> .....	20
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	25
2.1. Визначення вмісту IgG до <i>Ascaris lumbricoides</i> у зразках крові методом ELISA.....	25
2.2. Визначення вмісту IgG до <i>Toxocara canis</i> у зразках крові методом ELISA.....	30
2.3. Визначення рівня тиреотропного гормону в зразку крові пацієнта методом рідинної хроматографії у тандемі з мас-спектрометрією.....	31
2.4. Визначення рівня онкомаркера СА 15-3 в зразках крові пацієнтів.....	34
2.5. Визначення рівня антитіл методом RIA(radioimmunoassay).....	36
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	39
ВИСНОВКИ.....	49
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	50

## ВСТУП

*Актуальність дослідження.* Респіраторні інфекції є причинами

високої смертності та втрати робочої сили в усьому світі. Пацієнти в похилому віці або з серцево-судинними чи легeneвими захворюваннями в анамнезі знаходяться в групі особливого ризику. Зокрема, у 2019 році у світі було зареєстровано 2 603 913 смертей через респіраторні інфекції. Таким чином, смертність від респіраторних захворювань є четвертою в світі [2,17].

Власне, темпи поширення паразитарних інфекцій зростають у всьому світі через швидку урбанізацію міст, глобальне потепління та міграції[11].

Респіраторні інфекції мають доволі гетерогенну етіологію. Так, збудниками респіраторних захворювань можуть бути віруси, бактерії, гриби, паразити.

Зокрема паразити здатні викликати різні захворювання легень, такі як бронхіт, пневмонію, тощо.

Так, наприклад, аскаридоз викликає бронхіт, пневмонію, та інші запальні захворювання легень.

Таким чином, збільшення поширеності паразитарних інфекцій впливає на поширеність респіраторних захворювань.

Тому, вивчення особливостей патофізіології респіраторних захворювань викликаних паразитарними інвазіями є перспективним.

**Мета дослідження:** Встановити роль паразитарних інвазій в людей з респіраторними захворюваннями.

Відповідно до мети були поставлені наступні **завдання:**

1. Проаналізувати індивідуальні та групові особливості паразитарних інвазій у пацієнтів з респіраторними захворюваннями.
2. Описати взаємозв'язок різних паразитарних інвазій в людей з респіраторними захворюваннями.

**Предмет дослідження.** Патогенез респіраторних захворювань людини.

**Об'єкт дослідження.** Роль паразитарних інвазій людини в патогенезі респіраторних захворювань.

**Новизна отриманих результатів.**

Отримані дані, щодо існування кореляції між рівнем антитіл до токсокар собачої та аскариди людської. Наявність кореляції підтверджена статистично

*коефіцієнтом кореляції Пірсона.*

***Практичне значення отриманих результатів.***

Визначили рівень антитіл до токсокар до аскарид, таким чином підтвердивши діагноз аскаридоз і токсокароз. Отримали дані щодо існування кореляції між рівнем антитіл до тоскокари собачої та аскариди людської, для подальшого дослідження.

## **РОЗДІЛ 1**

### **ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ**

#### **1.1. Загальна характеристика респіраторних захворювань**

Респіраторні інфекції можуть проявлятися захворюваннями верхніх дихальних шляхів (риніт, синусит, отит, фарингіт, епіглотит, трахеїт), або захворюваннями нижніх дихальних шляхів (бронхіт, пневмонія) або обома. Системні прояви можуть включати гарячку, головний біль і міалгію[1].

До основних збудників, респіраторних захворювань належать наступні організми[1]:

Bacterial	Fungal	Viral	Other
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Influenza A	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Coccidioides immitis</i>	Influenza B	<i>Coxiella burnetii</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Aspergillus</i> spp.	Adenovirus types 4 and 7	<i>Yersinia pestis</i>
Mixed anaerobic bacteria	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Hantavirus	<i>Francisella tularensis</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Coronavirus	<i>Burkholderia pseudomallei</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Bacillus anthracis</i>
<i>Legionella</i> spp.			<i>Leptospira</i> spp.
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>			<i>Schistosoma</i> spp. (acute)
<i>Chlamydia pneumoniae</i>			<i>Ascaris lumbricoides</i>
<i>Chlamydia psittaci</i>			<i>Strongyloides stercoralis</i>
			Hookworm
			<i>Paragonimus westermani</i>
			<i>Wuchereria bancrofti</i> (tropical pulmonary eosinophilia)

Рис. 1.1. Основні збудники респіраторних захворювань[1].

Респіраторні інфекції викликають віруси (вірус грипу, коронавірус), грибки (*Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Aspergillus* spp.), бактерії (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*), паразити (*Schistosoma* spp., *Ascaris lumbricoides*)[1].

Слід зазначити, що збільшення рівня захворюваності на паразитарні інвазії збільшує відсоток респіраторних захворювань легень. Відповідно, у країнах, де високий відсоток захворювань на паразитарні інвазії, поряд із тим, збільшений відсоток респіраторних захворювань. Проте, все більше даних свідчать про збільшення кількості пацієнтів, у яких діагностовано респіраторне захворювання легень, викликане інвазією паразитів, навіть у країнах з низьким рівнем поширеності паразитарних інфекцій. Подібне збільшення рівня захворюваності на респіраторні захворювання (що викликані інвазією паразитів), в країнах з низьким рівнем поширеності

паразитарних інфекцій, пояснюється збільшенням кількості осіб, що мають імуносупресивні стани. Окрім цього, додатковими причинами є трансплантація органів, та міграція. Паразити можуть викликати широкий спектр легеневих захворювань, починаючи від легкого бронхіту до небезпечного для життя гострого респіраторного дистрес-синдрому[9].

Окрім цього, паразитарні захворювання легень можуть імітувати такі захворювання, як бактеріальна пневмонія, туберкульоз легень, бронхіальна астма, рак легень, легенева гіпертензія[9].

До основних паразитів, що викликають респіраторні захворювання легень належать[10]:

Nematodes	Trematodes	Cestodes
Ascariasis: <i>Ascaris lumbricoides</i>	Schistosomiasis: <i>Schistosoma haematobium</i> and <i>Schistosoma japonicum</i>	Hydatid cyst: <i>Echinococcus granulosus</i> and <i>Echinococcus multilocularis</i>
Ancylostomiasis: <i>Ancylostoma duodenale</i> and <i>Necator americanus</i>	Paragonimiasis: <i>Paragonimus westermani</i>	
Strongyloidiasis: <i>Strongyloides stercoralis</i>		
Tropical pulmonary eosinophilia: <i>Wuchereria bancrofti</i>		

Рис. 1.2. Основні збудники респіраторних захворювань[1].

До основних збудників респіраторних захворювань легень належать: *Ascaris lumbricoides* - аскаридоз, *Ancylostoma duodenale* - анкілостомоз, *Schistosoma japonicum* - шистосоміаз, *Echinococcus granulosus* - ехінококкоз. Тобто маємо представників і нематод (аскаридоз), трематод (шистосомоз), цестод (ехінококкоз)[10].

Нематоди, трематоди та цестоди можуть по-різному вражати дихальну систему. Паразитарні інфекції можуть проявлятися у вигляді вогнищевих або дифузних захворювань легень. Дифузні захворювання легень можна далі розділити на транзиторні легеневі інфільтрати та альвеолярні або інтерстиціальні захворювання легень. Аскаридоз, анкілостомоз і токсокароз зазвичай викликають транзиторні легеневі інфільтрати, тоді як шистосомоз, стронгілоїдоз викликають дифузні інтерстиціальні захворювання легень[11].

Паразити можуть вражати різні відділи грудної клітки від трахеобронхіального дерева, легеневої паренхіми та плевральної порожнини до грудної стінки. Паразитичні захворювання легень можуть мати широкий спектр симптомів та неспецифічних клінічних проявів, що призводить до діагностичних і терапевтичних дилем, зокрема заважає коректній дифференціальній діагностиці. Незважаючи на те, що переважна більшість паразитарних інвазій лікуються медикаментозно або проходять самостійно, хірургічне втручання має першорядне значення в діагностиці певних паразитарних інвазій, наприклад- ехінококкових кист у легенях[12].

До основних факторів ризику розвитку респіраторних захворювань належать: похилий вік, наявність серцево-судинних захворювань, іммунодефіцитних станів[2].

Також, особи, що мають легеневі захворювання, немовлята, маленькі діти мають підвищений ризик розвитку ускладнень респіраторних захворювань[16].

Таким чином, існує величезна кількість паразитарних захворювань (анкілостомоз, шистостомоз, аскаридоз) що здатні інфікувати легеневу тканину, викликаючи широкий спектр симптомів та клінічних проявів, від бронхіту до пневмонії.

## **1.2. Механізми розвитку респіраторних захворювань у відповідь на інвазію певних паразитів**

**1.2.1. Біологічні особливості *Ascaris lumbricoides*.** *Ascaris lumbricoides* (Linnaeus, 1758) є найпоширенішою кишковою нематодою, що передається через ґрунт. Кінцевим хазяїном є людина. За оцінками, у всьому світі 891,6 мільйона людей були інфіковані *A. lumbricoides* у 2010 році. В Європі аскаридоз є рідкісним захворюванням, яке вражає переважно сільських жителів (1,2%) і людей, які регулярно контактують зі свинями з професійних причин. Аскаридоз зазвичай виникає через ковтання сільськогосподарських продуктів або продуктів харчування, заражених



яйцями паразитів. Погані санітарні умови та неадекватне видалення стічних вод відіграють ключову роль у підтримці та поширенні аскаридозу[3].

Аскаридоз викликає два різні патологічні стани: імунну реакцію на мігруючі личинки в певних тканинах та/або обструкцію внаслідок фізичної присутності дорослих черв'яків у шлунково-кишковому тракті[25].

Аскаридоз має складний життєвий цикл, при чому на кожній із стадій змінюється симптоматика, через різну локалізацію гельмінту[3].

Так, людина є остаточним хазяїном *A. lumbricoides*, і фекально-оральний шлях передачі гельмінту є основним способом передачі. Самка *A. lumbricoides*, що живе в тонкому кишечнику, відкладає близько 200 000 яєць на день. Ці яйця, що потрапляють у людські фекалії, можуть залишатися життєздатними в ґрунті до 10 років. Після проковтування цих яєць, у тонкому кишечнику з'являються личинки, що мігрують через ворітну вену до печінки, після чого у легені. Досягнувши легень, ці личинки прокладають свій шлях в альвеоли, звідки вони піднімаються по трахеобронхіальному дереву, щоб досягти гіпофаринкса, де знову потрапляють у кишечник. Повернення личинок назад у кишечник завершує міграцію личинок і ініціює розвиток дорослої особини[7]. Ілюстрація життєвого циклу на рисунку нижче:

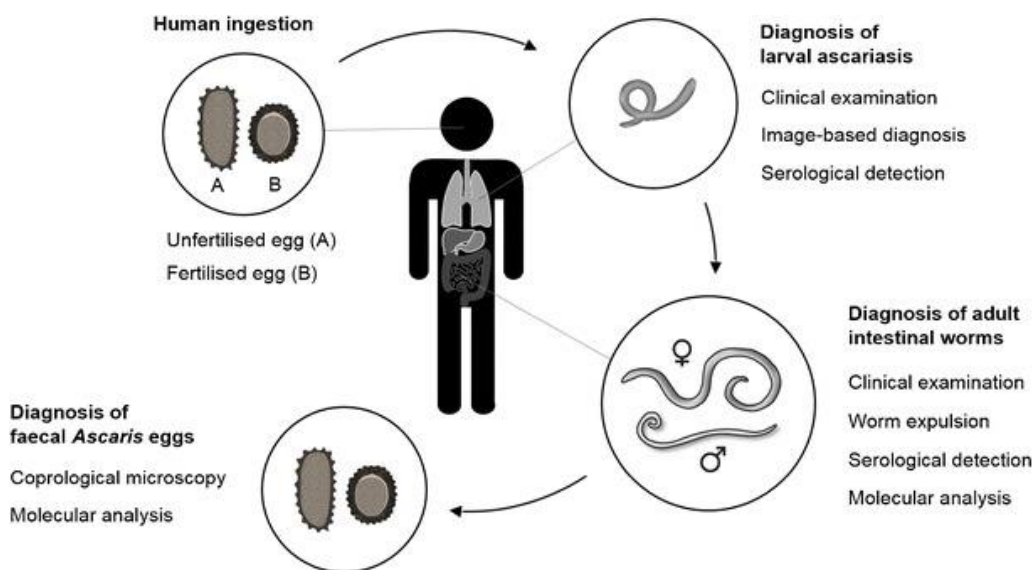


Рис. 1.3. Життєвий цикл *Ascaris lumbricoides*[25].

Локалізація гельмінту в дихальних шляхах може призвести до розвитку пневмонії, що відомий як синдром Леффлера[3,5,7].

Взагалі, синдром Леффлера виникає через 4-16 днів після проковтування ембріональних яєць *A. lumbricoides*. Пневмонія, викликана *A. lumbricoides* є результатом реакції гіперчутливості на личинки *A. lumbricoides*, що мігрують через легені. Симптомами є кашель, свистяче дихання, лихоманка, задишка, в рідких випадках – кровохаркання, а також кропив'янка на шкірі[7,3,5].

Доросла аскарида, що завершила свою міграцію через легені живе у тонкій кишці, однак може мігрувати через ампулу Фатера, викликаючи холангіт, перитоніт, панкреатит, холецистит, абсцес печінки[3]

Стан, при якому, в тонкому кишечнику наявні дорослі аскариди, називається кишковим аскарідозом, що, як правило, протікає безсимптомно. Однак, можуть виникати біль у животі, нудота та діарея[3].

Морфологія статевозрілої особини аскариди людської на ілюстрації нижче:



Рис. 1.4. Морфологія статевозрілої особини *Ascaris lumbricoides* (самець)[3].

Цікаво, що інфікування аскарідозом призводить до змін на гістологічному рівні. Так, на моделі мишей, інфікованих аскарідозом, авторами статті[4], було показане потовщення м'язового шару бронхіол. Деталі на рисунку нижче:

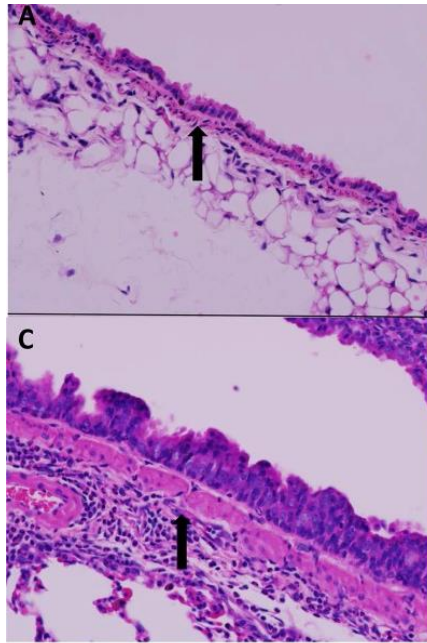


Рис. 1.5. Гістологічний зріз легеневої тканини. А-контрольна миша, С-інфікована аскаридозом.

Таким чином, інфікування аскаридозом призводить до гістологічних змін легеневої тканини, що у свою чергу може призводити до порушення процесів дихання.

Так, в іншому дослідженні, було показано, що інфікування *Ascaris lumbricoides* призводить до появи пневмонії, із появою такої симптоматики, як кашель, хрипи у верхній частині лівої легені. Окрім цього, має місце зростання еозинофілії, та збільшення рівня IgE (50МО/мл). Рентгенографія грудної клітки пацієнта з аскаридозом в анамнезі, на рисунку нижче[6]:



Рис. 1.6. Рентгенографія пацієнта хворого на аскаридоз[6].

На рентгенографії можемо бачити пневмонічні інфільтрати лівої легені.

Окрім цього, згідно даних досліджень[8], збільшуються рівні С-реактивного білку, та лейкоцитів.

Дослідження[13]показують, що мігруючі личинки можуть індукувати утворення тканинних і легеневих гранульом через активацію макрофагів, нейтрофілів і еозинофілів. Це може призвести до перибронхіального запалення, збільшення продукції бронхіального слизу та, нарешті, бронхоспазму. *Ascaris lumbricoides* може продукувати як специфічний, так і поліклональний IgE. Окрім цього, повідомлялося про підвищення рівня IgG у пацієнтів з аскаридозом.

Личинки можуть мігрувати через легені приносячи до крововиливу кровоносних судин легенів, що у свою чергу викликає запальну реакцію, що супроводжується набряком. Накопичення рідини в легенях призводить до «аскаридної пневмонії», яка може бути летальною. Дорослі особини можуть призводити до фізичної обструкції шлунково-кишкового тракту[52].

Цікаво, що інфікування *A. Lumbricoides* призводить до збільшення рівня малонілальдегіду. Власне, малонілальдегід є маркером збільшеного окисного стресу, внаслідок утворення ліпідних пероксидів. Ліпідні пероксиди утворюються із поліненасичених жирних кислот, при підвищеному рівні активних форм кисню. В дослідженнях було показано, що рівень малонілальдегіду між контрольною групою та хворими на аскаридоз статистично достовірно відрізняються[52].

Окрім цього, аскаридоз може призводити до появи астми, алергічного риніту, алергії, екземи та алергічного кон'юнктивіту[53].



Рис. 1.7. Атопічний дерматит, викликаний *A. Lumbricoides*[53].

### 1.1.2. Цикл розвитку та біологічні особливості *Toxocara canis*.

Паразит, викликає захворювання, що називається токсокароз. Власне, поява токсокарозу є наслідком проковтування яєць *Toxocara canis*, що виділяються із кишечника остаточного хазяїна-собаки. Потрапивши до організму людини, яйця токсокари прикріплюються до тонкого кишечника, пенетрують оболонку кишечника та потрапляють в системний кровотік, де розносяться до різноманітних тканин, призводячи до розвитку запалення та появи еозинофілії[17].

Потрапляння личинок токсокар до легень, викликає бронхіт, астму, пневмонію[17].

Таким чином, довгострокове існування личинок *T. canis* в легенях людини може індукувати запалення легень, хронічному запальному процесу в дихальних шляхах.

Щодо біохімічних змін показників крові, то токсокароз не призводить до збільшення рівня С-реактивного білку, або ШОЕ, однак можливе підвищення рівнів аланін амінотрансферази, аспартатамінотрансферази, у випадку, якщо відбулося потрапляння личинок не тільки до легень, а й до печінки. Збільшення рівня еозинофілів характерне для токсокарозу (згідно

досліджень: 57% мають еозинофілію, 43% не мають)[20].

Щодо симптомів локалізації личинок у легенях то виділяють наступні: кашель (26%), біль у грудях (15%), шлунково-кишкові симптоми (3%), решта - безсимптомне протікання. Таким чином, для токсокарозу характерне безсимптомне протікання хвороби[20].

Експериментальні дослідження показали, що личинки *T. canis* індують Th2- імунологічну відповідь, що призводить до секреції IL-4, IL-5 та IL-13; з послідуною продукцією IgE, диференціацією та активацією еозинофілів у мишей[18,19].

При інвазії личинок *T. canis* відбувалися зміни легеневої тканини на гістологічному рівні. Деталі на рисунку нижче:

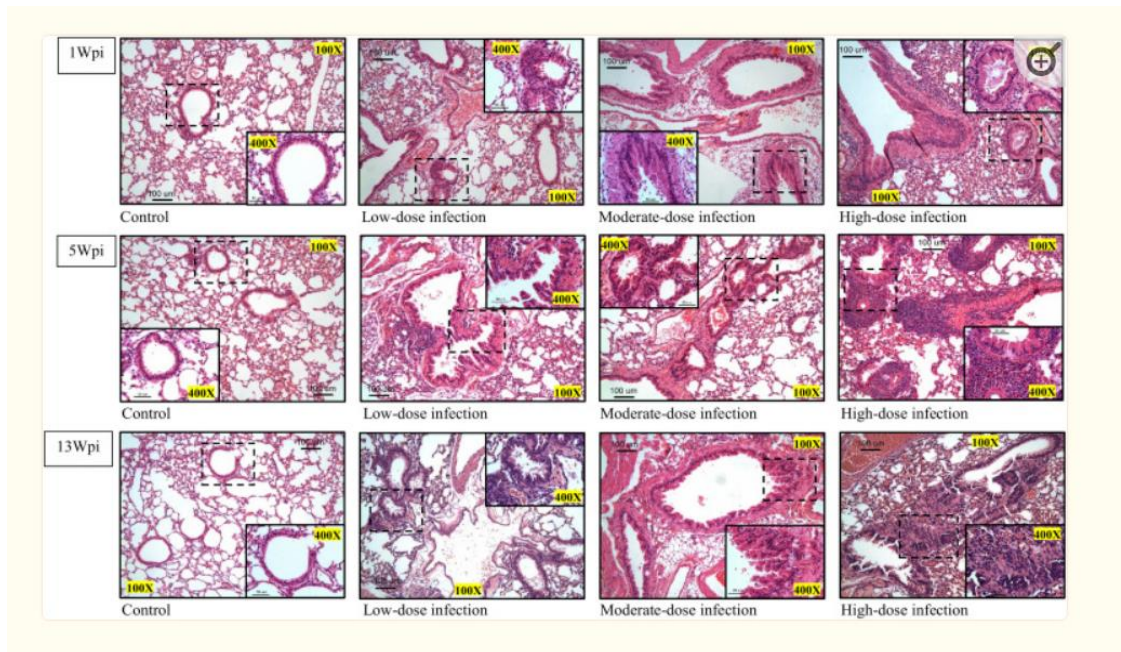


Рис. 1.8. Гістологічні зрізи легеневої тканини мишей, інфікованих *T. canis*[18].

Експериментальне зараження мишей токсокарою собачою призводить до появи інфільтрату у легеневій тканині. 1,5,13Wpi - кількість інфільтрату на 1, 5, 13 тижні захворювання.

Дослідження показують[19], що токсокароз викликає алергічні реакції у дітей, зокрема – бронхіальну астму, алергічний риніт.

**1.2.3. Життєвий цикл *Giardia lamblia*** – або лямблія, джгутиковий найпростіший паразит, що інфікує верхній відділ тонкої кишки[23].



Вперше описана А. Левенгуком у 1681 році, пізніше повністю (усі життєві форми, від цисти до трофозоїта) охарактеризована Ламбом. Раніше вважали її коменсалом (не несе фактичної шкоди організму) але наразі вважається паразитом, що викликає діарею, та мальабсорбцію. *Giardia lamblia* інфікує людей по усьому світу.

Життєвий цикл включає в себе чергування трофозоїта та цисти. Цисти резистентні до умов зовнішнього середовища та інфікують організми. Власне, інфікування відбувається при проковтуванні цист лямблій, внаслідок недостатньої гігієни, де, у кишечнику, оболонка цисти розчиняється під дією панкреатичних ензимів, вивільняючи трофозоїт. Трофозоїт ділиться нестатевим способом (поділом навпіл) і виділяється назовні з каловими масами.

Ілюстрація життєвого циклу на рисунку нижче[21]:

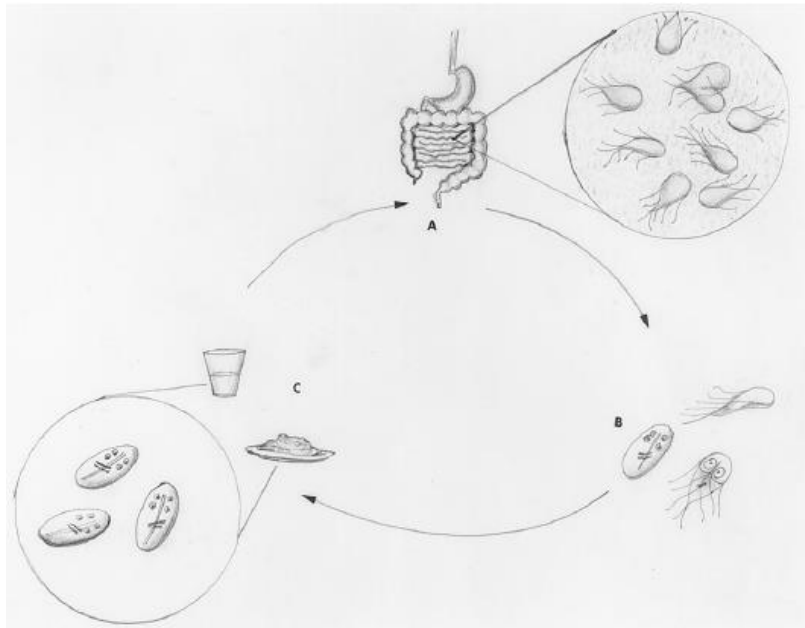


Рис. 1.9. Життєвий цикл лямблій[21].

А-нестатевий поділ лямблій у тонкому кишечнику; В-виділення паразиту разом із каловими масами у зовнішнє середовище; С-заковтування цист паразита у зв'язку із недостатньою гігієною, або контамінацією продуктів харчування цистами лямблій[21].

Щодо симптомів захворювання, то більшість носіїв лямблій не відчують жодних симптомів (до 60% асимптоматичний перебіг

захворювання), решта ж, відчувають такі симптоми, як метеоризм, спазми в животі, здуття живота, нудота, анорексія, нездужання та втрата ваги[21].

Щодо епідеміологічних даних, то, у країнах, що розвиваються, поширеність лямбліозу людини зазвичай коливається від 20% до 30% на 100% населення, при чому у розвинених країнах статистика значно менша: від 3% до 7%[23]

Така значна різниця в поширеності лямбліозу є наслідком, загалом, більш кращої гігієни, оскільки основний шлях передачі фекально-оральний.

Окрім цього, лямблії можуть призводити до розвитку легневих захворювань. Так, у лікарській практиці[22], можлива поява плеврального випоту, внаслідок інфікування лямбліями. Власне, рентгенографічний знімок плеврального випоту можемо бачити на рисунку нижче:

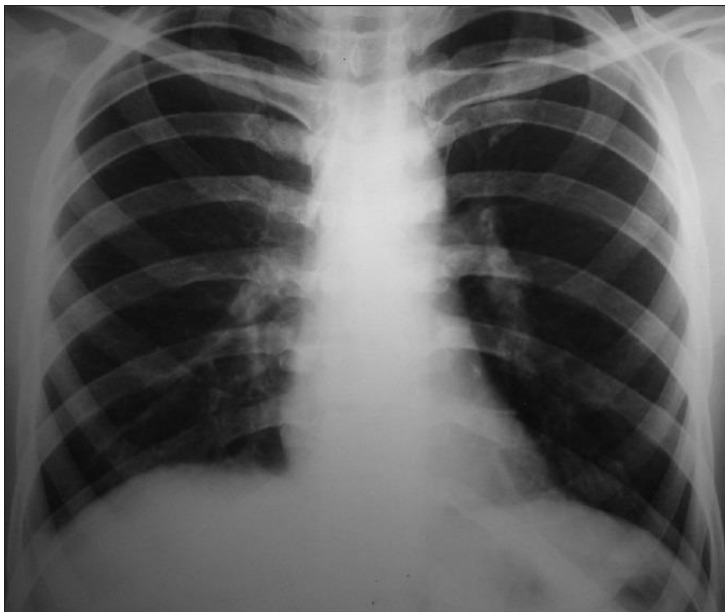


Рис. 1.10. Плевральний випіт пацієнта, хворого на лямбліоз

**1.1.4. Біологія *Echinococcus granulosus*.** *Echinococcus granulosus*-паразит, що викликає захворювання, що називається кістозний ехінококкоз. Кістозний ехінококкоз призводить до появи кіст у різноманітних органах, найчастіше-печінці та легенях. Цікаво, що у дітей, кісти локалізуються переважно у легенях[14]. Життєвий цикл паразита наступний: остаточними хазяїнами є собаки. Проміжний хазяїн - людина, а також різноманітні



теплокровні хребетні, такі як вівці, кози, велика рогата худоба, коні та свині[12,14].

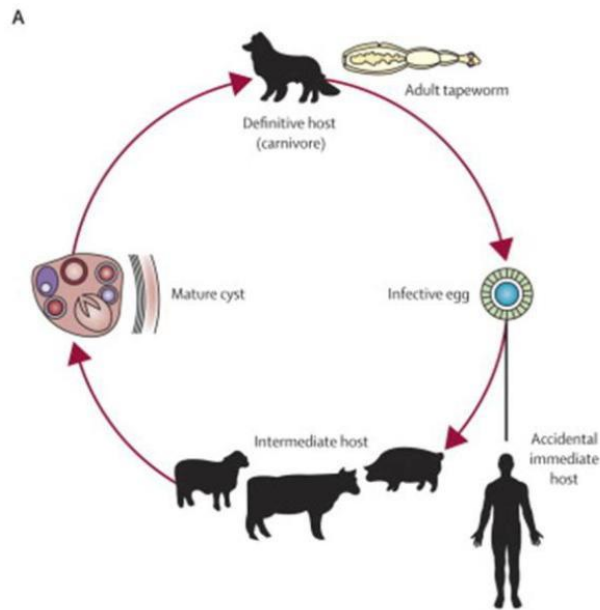


Рис. 1.11. Життєвий цикл *Echinococcus granulosus*[14].

Дорослий черв'як, що мешкає в тонкій кишці остаточного хазяїна, зазвичай має довжину 2–7 мм. Ехінокок прикріплюється до слизової оболонки кишечника, де паразитує, виділяючи з фекаліями яйця паразита. Яйця виділяються і прилипають або до шерсті тварини, або до трави. Проміжні хазяїни заковтують яйця під час випасання на зараженій траві. Личинки вилуплюються в тонкій кишці проміжного хазяїна. Вони потрапляють у портальний кровообіг через кишкову стінку, а потім прямують до вісцерального капілярного русла; найчастіше в печінку та легені. Тут вони розвиваються в метацестоди і переростають у гітадину кісту, наповнену рідиною. Внутрішня частина кісти заповнена сотнями або тисячами протосколекс, із яких можуть розвиватися дорослі особини. Кісту разом з м'ясом проковтує остаточний господар (собака), і таким чином цикл завершується. Люди заражаються або при споживанні сирої їжі, зараженої собачими фекаліями, або при прямому контакті з собаками[12,14].

В групі ризику, особи що мали тривалий контакт із домашніми тваринами (собаками) та/або сільськогосподарськими тваринами (вівцями).

Власне, гітадна кіста - це кістозне ураження спричинене личинковою стадією паразита *Echinococcus*. Кіста може виникнути в будь-якому органі,

але найчастіше з'являється в печінці та легенях з відповідною частотою 60% і 20–30% серед усіх випадків[15].

Гідатидна кіста складається з трьох шарів з рідиною усередині. Зовнішній шар називається перицистою, ектокистою або адвентиційним шаром. Він утворюється в результаті реакції тканин хазяїна на паразитів. Наступним шаром є багат шарова мембрана, або екзоциста, а внутрішній шар відомий як гермінативний шар або ендодит. Ламінований шар непроникний для бактерій, тому його розрив може викликати вторинні бактеріальні інфекції. Зародковий шар є найбільш активним шаром цисти[15].

Швидкість росту гідатидної кісти залежить від м'якості органу та еластичності навколишніх тканин. Кісти легенів ростуть швидше, ніж кісти печінки, оскільки легені мають м'яку консистенцію, ніж печінка. Негативний плевральний тиск може ще більше прискорити швидкість росту кіст. Через порівнянно більшу еластичність тканин, кісти у дітей ростуть швидше і стають більшими, ніж у дорослих[15].

При появі кіст у легенях, людина може відчувати різноманітні симптоми, прояв, інтенсивність яких залежить від локалізації та розміру кісти. Так, серед найбільш поширених виділяють наступні симптоми: кашель, біль у грудях, задишка[12].

Як бачимо, симптоматика неспецифічна, що створює проблеми при діагностиці, і ускладнює вчасне діагностування.

Окрім цього, можливий розрив кісти. Розрив кісти в бронх може проявлятися відхаркуванням кістозного вмісту, продуктивним кашлем, повторюваним кровохарканням, лихоманкою або навіть анафілактичним шоком[12].

Окрім цього, розрив кісти в плевральний простір може призвести до пневмотораксу, плевального випоту[13].

Діагностика включає рентгенографію грудної клітки, або комп'ютерну томографію.



Рис. 1.12. Рентгенограма грудної клітки пацієнта з ехінококком[12].

На рентгенограмі можемо бачити дві кісти в правій легені (одна розірвана), та одну неушкоджену в лівій легені.

Симптоми наявності гідатидної кісти залежать від локалізації та розміру кісти та наявності ускладнень. Неускладнені дрібні периферично розташовані кісти часто залишаються безсимптомними і виявляються випадково при рентгенографії органів грудної клітки. Симптоми з'являються, коли кісти ростуть достатньо великими, щоб здійснювати механічний вплив на сусідні структури або призводити до розвитку ускладнень. Слід також зазначити, що кісти розміром більше 5 см у діаметрі можуть спричинити здавлення бронхів. До ускладнень належить розрив оболонки кісти, вторинну інфекцію, пневмоторакс і нагноєння. Після розриву кісти у пацієнтів може раптово виникнути біль у грудях, кашель, лихоманка та кровохаркання[15].

**1.2.5. Біологічні ознаки *Opisthorchis felineus*** - трематода, що паразитує у гепатобілінарній системі людини. Основним симптомом даної паразитарної інвазії є тупа біль в правому підребер'ї[28].

Окрім цього, для гострої інфекції характерні наступні симптоми: гарячка, слабкість, втомлюваність, втрата апетиту, діарея, втрата ваги. Час від проковтування трематод до появи симптомів становить 2-3 тижні[29].

До основних факторів ризику належать поїдання прісноводної риби з родини Cyprinidae, наприклад, язь ( *Leuciscus idus* ), язь ( *Leuciscus leuciscus* ), лящ ( *Abramis spp.*), карась ( *Carassius carassius* ), короп ( *Cyprinus spp.*) та ін. Більшість інфікованих учасників їли недоготовану рибу.

Патогенез опісторхозу включає ранню та пізню фази. Рання фаза (гострий опісторхоз) триває від кількох днів до 4–8 тижнів. Пізня фаза (хронічний опісторхоз) триває роками, з епізодичною появою гастродуоденіту, панкреатиту, внаслідок хронічного паразитування *O.felineus* в гепатобілінарній системі. У патогенезі хронічної стадії провідну роль відіграють повторні інвазії паразитами, із подальшим фіброзом жовчовивідних шляхів, підшлункової залози, стеатозом печінки, порушенням тонічної та моторної функції жовчних шляхів, жовчного міхура та розвитком холестазу[30].

Цікаво, що хронічна паразитарна інвазія *O.felineus* викликає, так званий, карбонільний стрес у клітинах печінки. Графічна ілюстрація на рисунку нижче:

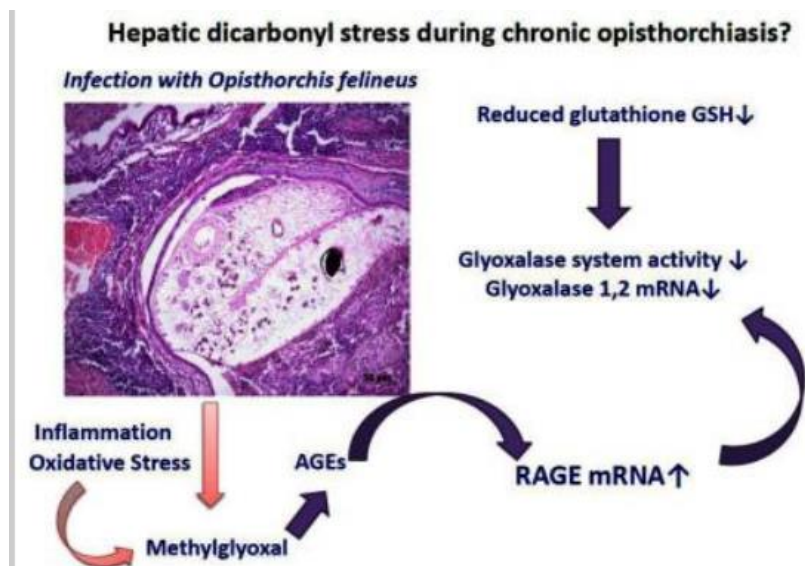


Рис. 1.13. Карбонільний стрес у клітинах печінки[31].

Власне, карбонільний стрес пояснюється особливостями метаболізму вуглеводів. Так, карбонільний стрес виникає внаслідок накопичення токсичної сполуки метилгліоксалу, що може реагувати з біологічними молекулами - ліпідами, білками, нуклеїновими кислотами) призводячи до утворення продуктів гліюксилування (advanced glycated end products-AGE).

AGE може реагувати зі специфічними рецепторами RAGE, викликаючи пошкодження тканини. Збільшення продукції метилгліюксалу, викликається запальним процесом, що спостерігається при інфікуванні *O.felineus*. Метилгліюксаль метаболізується ферментів гліюксилазою, рівень експресії якої зменшується при інвазії *O.felineus*.

Цікаво, що розвиток *O.felineus* може призводити до онкологічних захворювань, зокрема холангіокарциноми. В патофізіології розвитку холангіокарциноми ключову роль відіграє генерація активних форм кисню, пряма дія білків гельмінту, що інгібують апоптоз і стимулюють проліферацію клітин[32].

Окрім цього, *O.felineus* виділяє специфічні канцерогени- оксистероли, катехол естрогени, що працюють як генотоксичні сполуки. Власне, ці генотоксичні сполуки пошкоджують ДНК хазяїна, що поряд із іншими факторами (продукція активних форм кисню, метилгліюксалу) стимулюють проліферацію ракових клітин[32].

Не менш важливу роль у формуванні ракових клітин віддають грануліну. Припускають, що білок гранулін стимулює канцерогенні процеси у відповідь на зараження гельмінтами. Грануліни *O. felineus*, *O. viverrini* та *C. sinensis* є гомологічними грануліну людини. Людські та гельмінтові грануліни стимулюють проліферацію епітеліальних клітин, включаючи холангіоцити. Варто зазначити, що хоча й людський і гельмінтний гранулін стимулюють проліферацію клітин, однак роблять це через різні сигнальні каскади. Людський гранулін діє як антагоніст сигнального шляху фактора некрозу пухлин (TNF). Сигнальний шлях гранулінів *O.felineus* невідомий, але було виявлено, що гранулін *O. viverrini* потрапляє в холангіоцити та активує сигнальні шляхи: MAP-кіназу та епідермальний фактор росту.

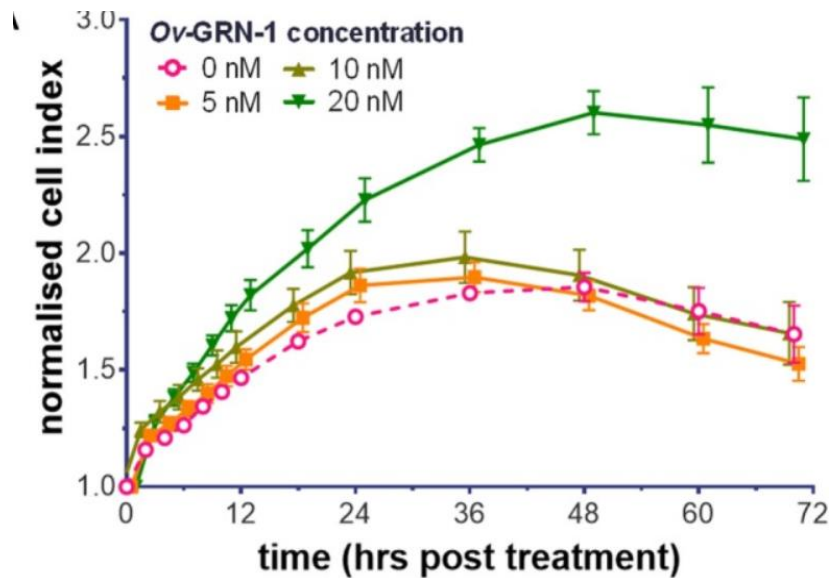


Рис. 1.14. Вплив грануліну на проліферацію клітин *in vitro*[51].

У відповідь на введення в культуру грануліну, епітеліальні клітини починають більш активно ділитися, збільшуючи свою популяцію. Таке збільшення швидкості поділу *in vivo* може стимулювати раковий процес, через збільшення кількості загальних клітин, та, відповідно, ракових, таким чином збільшуючи навантаження на імунну систему.

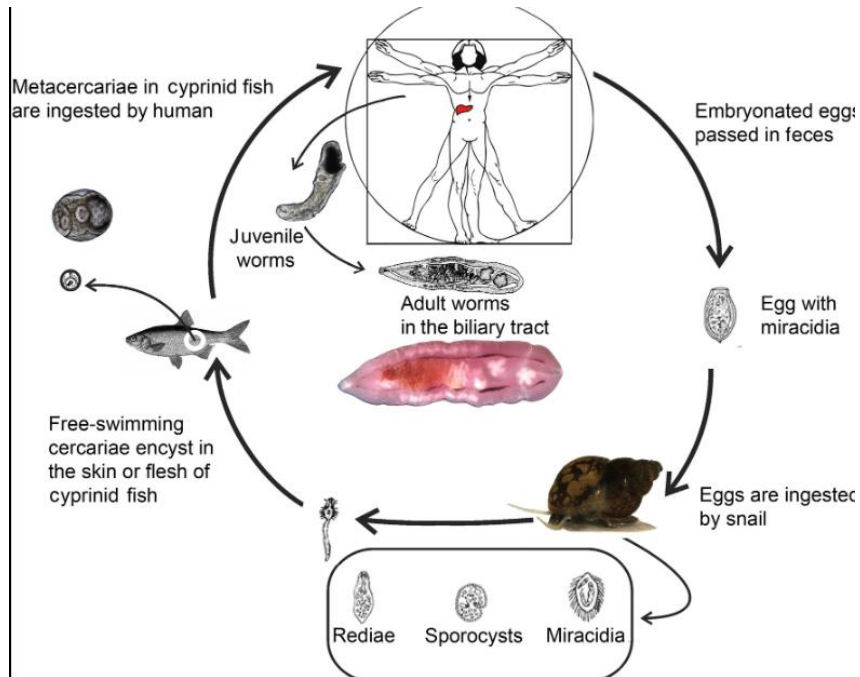
Результати досліджень показують, що місцеві жителі набувають імунологічної толерантності до антигенів гельмінтів внаслідок повторних заражень, що виникають ще в дитинстві. Як наслідок - інвазія, що набуває хронічного перебігу, без вираженої гострої фази опісторхозу. Таким чином, інфекція протягом багатьох років проходить в безсимптомній формі без класичної еозинофілії на гемограмі[30].

Біохімічні аналізи крові показують збільшення рівня нейтрофілів, АЛТ, АСТ (внаслідок паразитування в гепатобілінарній системі), змін ШОЕ[30].

УЗД черевної порожнини показує збільшення розмірів правої частки печінки, дифузні зміни структури стінок жовчного міхура та внутрішньопечінкових жовчних проток у вигляді лінійної гіперехогенної смугастості, помірні дифузні неоднорідні зміни. А в структурі підшлункової залози наявна вільна рідина в черевній порожнині і в плевральних порожнинах[30].

Щодо епідеміологічних особливостей, то *O.felineus* зустрічається на території України, росії, Білорусії, Казахстану, країн Балтії. Цікаво, що поширеність *O. felineus* є відносно низькою серед дітей і поступово зростає з віком, а максимум (80% в ендемічних районах) поширеності інфекції спостерігається серед дорослих людей віком 40 років. [28,30]

Життєвий цикл *O.felineus* проілюстрований на рисунку 1.15. нижче[32]:



Дорослий гельмінт виділяє яйця в жовчовивідні протоки. Із жовчовивідних протоків яйця потрапляють у кал, і у зовнішнє середовище. Після чого, їх має проковтнути равлик, де яйця розвиваються в церкарії. Церкарії потрапляють у сиру рибу і розвиваються у метацеркарії. Після чого, риба споживається людиною, або іншими ссавцями, де метацеркарії перетворюються на дорослі черви, що паразитують у жовчному міхурі[32].

## РОЗДІЛ 2

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

### 2.1. Визначення вмісту IgG до *Ascaris lumbricoides* у зразках крові методом ELISA

У дослідженні взяли участь пацієнти діагностичного центру лабораторії Нето Медіка м.Луцьк. Всі були ознайомлені з метою дослідження і дали добровільну згоду на участь у ньому. Діагноз пацієнтів був поставлений сімейним лікарем, а за необхідності підтверджений профільним спеціалістом.

Всього в дослідженні взяли участь 19 осіб (5 чоловічої статі і 14 жіночої статі) віком від 13 до 65 років.

Таблиця 2.1

#### Характеристика досліджуваних

Шифр досліджуваного	Стать	Вік	Діагноз
1	жінка	60	Хронічний бронхіт в стадії загострення
2	жінка	65	Аменорея
3	жінка	21	Зоб
4	чоловік	20	Кашель невідомого генезу
11	жінка	15	
14	чоловік	60	Гіпертонія
10-0	жінка	24	Зоб
13-С	чоловік	63	
1-С	жінка	39	Хронічний реніт
2-С	жінка	13	Дерматит
3-С	жінка	18	
4-С	жінка	63	
4-С	чоловік	39	Бронхіт. Правостороння пневмонія
5-0	жінка	59	
6-0	жінка	59	
7-С	чоловік	14	
8-С	жінка	18	Астма



9-0	жінка	24	
5-C	жінка	57	

Досліджувані були направлені сімейним лікарем для здачі аналізу крові IgG таких паразитів: аскарида людська, токсокара собача, лямблія.

Визначення вмісту IgG у зразках крові дев'ятнадцяти пацієнтів проводили методом ELISA.

Імуноферментний аналіз (ІФА) є широко застосовуваним методом, через його гнучкість: аналізи можна проводити й поза лабораторією, використовуючі готові набори, або в лабораторних умовах. Типовий мікропланшет для ІФА має 96 лунок, що дозволяє одночасно аналізувати велику кількість зразків[44].

Власне, метод ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay, ІФА) ґрунтується на хімічній взаємодії між антигеном та антитілом. Власне, реакція антиген-антитіло грає вирішальну роль у захисті організму від бактерій, токсинів, а також паразитів. Реакція антиген-антитіло високоспецифічна, таким чином, проводячи цю реакцію *in vitro*, можна отримати високоселективний кількісний та якісний аналіз антигенів у зразках[26].

Комплекс антиген-антитіло мітять ферментом, продукт реакції якого можна детектувати спектрофотометрично (наприклад фермент лужна фосфатаза, що метаболізує нітрофенілфосфат у нітрофенол, що детектується при 405 нм). Слід зазначити, що фермент іммобілізують на твердому носії (полістирол, полівінілхлорид, поліпропілен). При наявності антитіл у зразку, відбувається реакція антиген-антитіло, із послідуочим виділенням продукту реакції, що детектують спектрофотометрично[26].

До основних переваг ІФА належить: 1) відносна простота виконання дослідження; 2) високочутливість методу; 3) безпечність та екологічна чистота; 4) відносна дешевизна.

До недоліків ІФА можна віднести: 1) відносно висока вірогідність хибнопозитивних, та хибнонегативних результатів; 2) хімічна нестабільність

антитіла, оскільки антитіло-білок[26].

Під час проведення ІФА, антиген або антитіло іммобілізується на мікропланшеті. Для перешкодження неспецифічній адсорбції інших білків, поверхня промивається альбуміном, казеїном, або знежиреним молоком.

При наявності в зразку антитіла, чи антигену, відбувається взаємодія антиген-антитіло, із послідуною активацією іммобілізованого ферменту, і виділенню продукту реакції, що детектується спектрофотометрично[26].

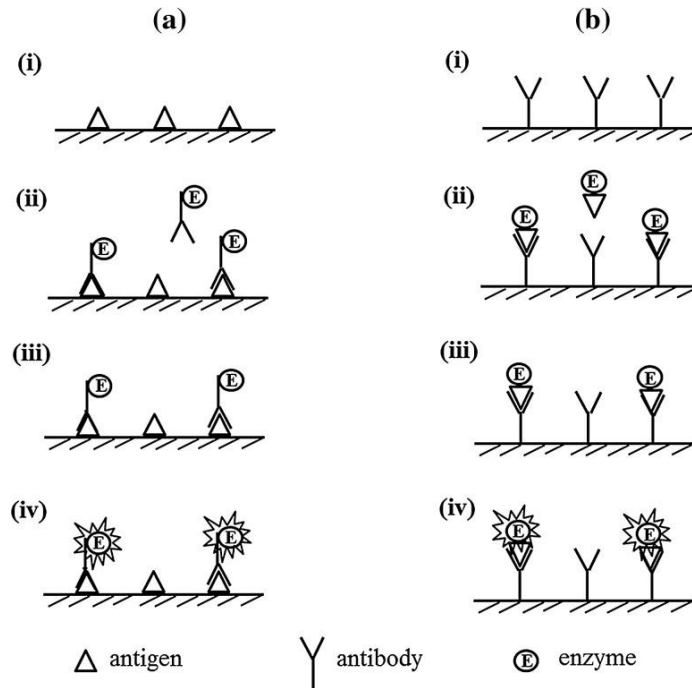


Рис. 2.2. Схема проведення ІФА[26].

a-іммобілізований антиген; b-іммобілізоване антитіло; 1-іммобілізація антигену чи антитіла на субстраті; 2-інкубація з антитілом чи антигеном, що зв'язаний с ферментом; 3-вимивання незв'язаних антигенів чи антитіл; 4-спектрофотометричне детектування продукту реакції.

Метод ELISA дозволяє визначати наступні речовини[43]:

- Антитіла (Аутоантитіла, антитіла до інфекційних захворювань, антитіла до вірусу гепатиту А,В,С, вірусу ВІЛ)
- Онкомаркери (ПСА-простат специфічний антиген, карциноембріональний антиген)
- Гормони (лютеїнізуючий, фолікулостимулюючий, пролактин, тестостерон, людський хоріогонадотропін)
- Наркотичні речовини (амфетамін, метамфетамін, 3-4

метилендіоксиметамфетамін, кокаїн)

Існує прямий, непрямий, та сендвіч-ІФА. Прямий та непрямий ІФА починається із внесення антигенів у лунки планшета, після чого планшети інкубують при 37 градусах. Як тільки інкубація закінчується, наступним кроком є промивання такими агентами як бичачий сироватковий альбумін, аprotинін, або іншими тваринними білками. Внесення тваринних білків у мікропланшети зменшує ризик хибнопозитивних результатів[43].

Після внесення тваринних білків, вносять буферний розчин, промивають, та вносять мічене ферментом антитіло[43].

В прямому ІФА, мічене антитіло прямо зв'язується із потрібним для нас протеїном. Потім, мікропланшети промиваються, щоб вилучити усі незв'язані антитіла. В якості міченого ферменту часто застосовують лужну фосфатазу або пероксидазу[43].

У непрямому ІФА, використовуються два антитіла, перше зв'язується із антигеном, а друге зв'язане комплементарно з першим, а також із ензимом[43].

Непрямий ІФА має вищу чутливість і є більш дорогим, в порівнянні із прямим ІФА[43].

Сендвіч-ІФА називається таким, через те, що в даній конфігурації, антиген розташований “як сендвіч”, між двома антитілами[43].

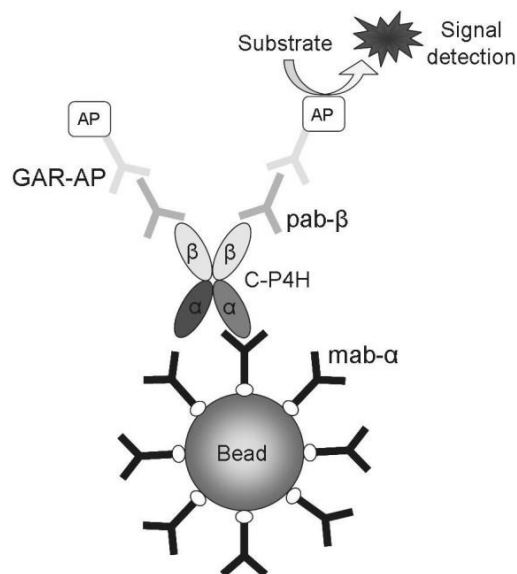


Рис. 2.3. Принцип роботи сендвіч-ІФА[45].

В данному випадку, антиген CP4-H розташований між двома антитілами,

тобто, зв'язаний з антитілом, іммобілізованим на магнітній наночастинці, а також з антитілом зв'язаним із пероксидазою[45].

Вміст антитіл до IgG *Ascaris Lumbricoides* визначали методом ELISA, за протоколом[27]: мікропланшети були вкриті антигенами, що специфічні до антитіл IgG у зразках крові 19 пацієнтів. В якості міченого ферменту виступала пероксидаза, а субстратом для ферменту був тетраметилбензидін. Кількісне визначення продукту реакції визначали при 450/620 нм.

Реагенти для проведення реакції:

- Буферний розчин (20х фосфатний буфер-0,2М, рН 7,2+/-0,2)
- Розчин для тетраметидбензидіну (тетраметилбензидін 0,1%)
- Розчин для ензиму (фосфатний буфер 10 мМ, пероксидаза)
- Буфер для розведення зразків (10 мл фосфатний буфер 10 мМ, хлорометилизотиазиалинон/метилизотиазиалинон-СМІТ/МІТ-3:1)

Готуємо буферний розчин концентрацією 20 х, для цього змішуємо 10 мл буферного розчину із 190 мл дистальованої води. Розводимо зразки, отримані від пацієнтів, для цього використовуємо буфер для розведення зразків. 10 мкл зразку крові змішуємо із 1мл буфера для розведення зразків.

Розносимо 100 мкл розведеного зразку у відповідні лунки мікропланшета. Накриваємо фольгою та інкубуємо при 37 градусах. Аспіруємо вміст, промиваємо вміст лунок 300 мл буферним розчином. Вносимо 100 мкл розчину для ферменту (із ферментом в складі). Інкубуємо 15 хвилиин при температурі 20-25 градусів. Блакитний колір виникає при наявності у лунках антитіл IgG, що присутні у зразках крові. Кількісно визначаємо IgG при довжині хвилі 450/620 нм.

## **2.2.Визначення вмісту IgG до *Toxocara canis* у зразках крові методом ELISA**

Зразки крові пацієнтів перевіряли на токсокароз шляхом проведення ELISA (визначення наявності антитіл IgG до *Toxocara canis*)[33].

**Матеріали дослідження:**

- Мікропланшети із E/Sa антигеном до *T. canis*, іммобілізованим на полістирені.
- Фосфатний буфер (0,3% Твін-20, 0,1% бичачий альбумін)
- Фермент фосфатаза
- 5-нітрофенілфосфатаза 1мг/мл
- Розчин гідроксиду натрію (100 мкл)

ІФА проводили наступним чином: внесли фосфатний буфер у лунки, інкубували їх 15 хвилин (кімнатна температура), розводили зразки крові пацієнтів (1/200). Після чого вносили 100 мкл розведеної сироватки у лунки мікропланшета, із послідуною їх інкубацією. В якості ферменту тут використовувалася фосфатаза, а не пероксидаза, як при визначенні IgG до *Ascaris lumbricoides*.

Таким чином, для ELISA можуть використовуватися різноманітні ферменти-пероксидаза, фосфатаза, які дають продукт реакції, що можна детектувати спектрофотометрично.

Хромогенну реакцію (фермент фосфатаза, субстрат - 5 нітрофенілфосфатаза) зупиняли внесенням 100 мкл розчину гідроксиду натрію.

### **2.3. Визначення рівня тиреотропного гормону в зразку крові пацієнта методом рідинної хроматографії у тандемі з мас-спектрометрією**

Рівень тиреотропного гормону у крові пацієнта визначали методом рідинної хроматографії в тандемі з мас-спектрометрією[37].

Рідинна хроматографія в тандемі з мас-спектрометрією є вкрай гнучким методом для аналітичних досліджень, що беззаперечно посприяв покращенню якості та точності багатьох лабораторних досліджень, із розділення і визначення кількісного вмісту стероїдів, амінокислот, вітамінів, пептидів, протеїнів, нейромедіаторів, біомаркерів раку[47].

Взагалі, рідинна хроматографія розроблялася і застосовується для розділення компонентів суміші. Розділення компонентів суміші відбувається між розчином (рідка фаза-елюент) і стаціонарною фазою. Стаціонарна фаза-

має певну хімічну структуру і високоафінно зв'язує певні компоненти суміші. Таким чином, на стаціонарній фазі абсорбуються бажані нам молекули, а інші компоненти розчину вимиваються із колонки. Поєднання рідинної хроматографії із іншими технологіями, наприклад масс - спектрометрією, дозволяє не тільки розділяти а й кількісно визначати концентрацію абсорбованої речовини[38,39].

Принципи розділення компонентів суміші за участі рідинної хроматографії описані на рисунку нижче[38]:

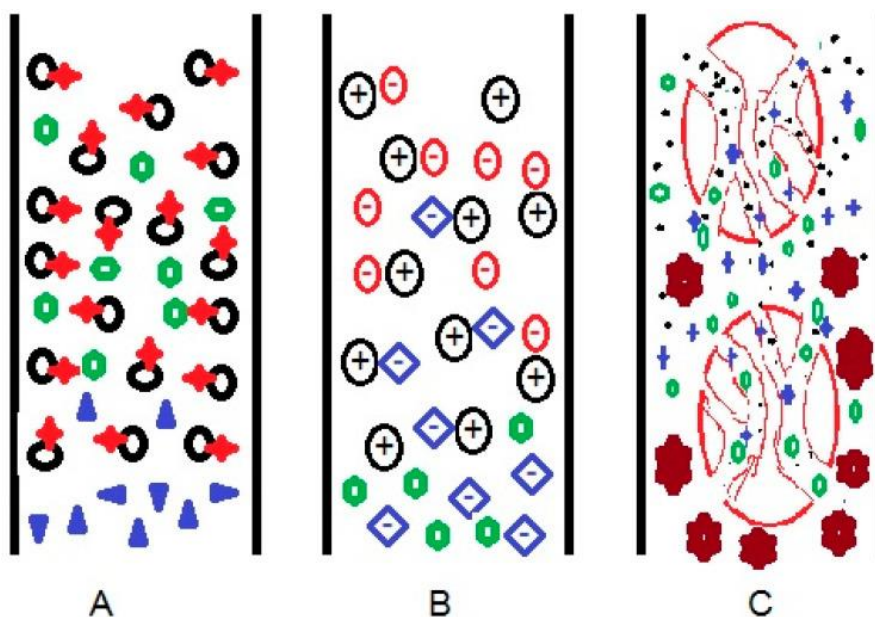


Рис. 2.4. Способи розділення компонентів суміші за участі рідинної хроматографії[38].

а- на основі різної аффіності компонентів суміші; б-на основі різниці в силі електростатичних взаємодій; с-за розміром молекул.

Так, під різної аффіністю розуміють здатність стаціонарної фази (чорним виділено) завдяки певним функціональним групам (наприклад карбонільної, спиртової, тощо) специфічно зв'язуватися з певними молекулами із суміші (зеленим).

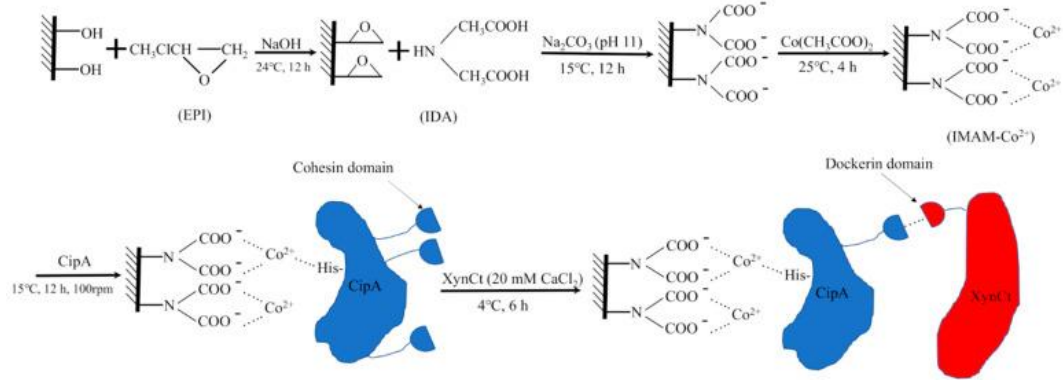


Рис. 2.5. Приклад застосування різноманітних стаціонарних фаз для зв'язування бажаної речовини[38].

На даній ілюстрації бачимо ковалентне зв'язування білка CipA, іммобілізованого ковалентними зв'язками з IDA (імінодіацетат), із білком XynCt.

Тиреотропний гормон визначали описаним вище методом рідинної хроматографії в тандемі з масс – спектрометрією. Для цього, використовували наступні матеріали:

Матеріали дослідження:

- Дитіотриетол (DDT)-25 г/л
- Аскорбінова кислота-25 г/л
- Цитратна кислота-25 г/л
- ОПТ-полімер (60 мг)-тверда фаза (картриджі)
- Ацетон
- Метанол (30%)

Зразки крові відбирали у пацієнтів. Виділяли сироватку крові, після чого заморожували. Брали по 0,5 мл розмороженої сироватки крові, поміщали в 10 мл центрифужну пробірку і додавали 120 мл розчину, що містив 25 г/л аскорбінової кислоти, цитратної кислоти, дитіотриетолу, для перешкодження деградації тиреотропного гормону. Додавали 1 мл ацетону, для депротейнізації протеїнів у зразках, перемішували, інкубували 30 хвилин при кімнатній температурі. Вортексували зразки, після чого центрифугували при 3500 грм при температурі 25 градусів, протягом 5 хвилин. Супернатант виділяли, а преципітат заново центрифугували, додавши перед тим розчин

ацетону з водою (1:1). Супернатанти об'єднували, а об'єм розчину зменшували до 1,0 мл шляхом випарювання азотом. Отримані екстракти іммобілізували на картриджах (які попередньо промивали послідовно 3,0 мл метанолу (30%) та 5,0 мл дистильованої води) і проводили рідинну хроматографію (розчинник - оцтова кислота в метанолі-0,1%)[37].

Елюент збирали в 4х-міліметрові скляні флакони з бурштинового скла, після чого об'єм зменшували до 200 мкл випарюючи азотом.

Отримані 200 мкл зразки використовували у мас-спектрометрії для кількісного визначення рівня тиреотропного гормону.

Взагалі, мас-спектрометрія використовується з середини двадцятого століття в лабораторіях фундаментальної науки та різних галузях промисловості для кількісного та якісного аналізу. Протягом багатьох років складні прилади та спеціальні знання, необхідні для розробки аналітичних методів, а також складність підготовки проб обмежували використання мас-спектрометрії вузькоспеціалізованими лабораторіями. Однак з тих пір робота інструментів була спрощена, а самі інструменти стали більш надійними, що зробило технологію більш доступною для більшої кількості користувачів. Незважаючи на те, що мас-спектрометрія продовжує використовуватися в дослідницьких програмах для виявлення біомаркерів і характеристики складних білків, ці інструменти все частіше можна знайти також у звичайній клінічній лабораторії[46].

Мас-спектрометричний аналіз заснований на розділенні іонів за відношенням їх маси до заряду ( $m/z$ )[46]

При проведенні мас-спектрометрії відбувається іонізація молекул, їх перетворення із розчину в газофу фазу. Маси іонів аналізуються на основі співвідношення маси до заряду ( $m/z$ ) [40]. Вміст тиреотропного гормону кількісно виділяли в зразках (200 мкл) на спектрометрі Agilent 1200 Series Binary Pump SL. Об'єм зразка для спектрометра становив – 5 мкл.

#### **2.4. Визначення рівня онкомаркера СА 15-3 в зразках крові пацієнтів**



Визначення рівня онкомаркера СА 15-3 у зразках крові пацієнтів проводили методом ECLIA[41].

Власне, метод ECLIA (Electrochemiluminescence immuno assays електрохемілюмінесцентний імуноаналіз) базується на основі метода ECL (Electrochemiluminescence електрохемілюмінесценція). ECLвключає в себе електрохімічні реакції та люмінесценцію, таким чином, що електрична енергія перетворюється на випромінювання світла. В ECL використовуються люмінофори - речовини, що випромінюють світло. У ECL люмінофори збуджуються шляхом перенесенням електронів за участі окислювально-відновних реакцій. Збуджені люмінофори випромінюють світло, яке можна виявити та кількісно визначити шляхом вимірювання кількості випромінюваного світла[42].

ECL використовується для аналізу вмісту таких речовин[42]:

- гормонів (тиреотропний гормон, Т3 ,Т4, прогестерон, тестостерон фолікулостимулюючий гормон, лютеїнізуючий гормон, пролактин);
- онкомаркерів (карциноембріональний антиген, СА-125, СА-19.9, СА-15.3, бета-хоріонічний гонадотропін людини, простат-специфічний антиген);
- препаратів (карбамзепін, дигоксин, фенітоїн, ванкоміцин);
- вітамінів (В12, D, фолієва кислота);
- білків (феритин, Д-димер, натрійуретичний поліпептид, інсулін, С-пептид);
- прозапальних маркерів (С-реактивний білок, інтерлейкіни, фактор некрозу пухлини);
- Антитіл (Антитіла до тиреопероксидази, антитіла до тиреоглобуліну, антитіла до вірусу простого герпесу, антитіла до вірусу краснухи, антитіла до токсоплазми, антитіла до вірусу гепатиту Е, антитіла до вірусу Коксакі, антитіла до SARS-CoV).

Метод **ECLIA** (Electrochemiluminescence immuno assays

електрохемілюмінесцентний імуноаналіз) включає в себе принципи ECL та ІФА, тому власне це і є електрохемілюмінесцентний імуноаналіз[42].

Електрохемілюмінесцентний імуноаналіз (ECLIA) передбачає взаємодію між антитілом і відповідним антигеном. Під час ECLIA використовуються антитіло, що захоплює антиген, як правило, біомолекулу, і мічене антитіло для проявлення реакції. Захоплююче антитіло іммобілізується на твердій фазі, такій як мікропланшет або магнітна кулька, тоді як мічене антитіло зв'язується з люмінесцентним маркером і електрохімічно активною молекулою. Таким чином, в ECLIA реалізуються принципи ECL (люмінесцентний маркер), ІФА(антиген-антитіло)[42].

Більшість тест систем ECLIA не мають клінічно значущої інтерференції, внаслідок наявності в сироватці ендогенних речовин. Однак, повідомлялося, про інтерференцію при наявності у високій концентрації білірубину, гемоглобіну, а також при наявності ліпідемії. Можлива перехресна реакція між лютеїнізуючим гормоном і людським хоріогонадотропіном[42].

## **2.6 Визначення рівня антитіл методом RIA(radioimmunoassay).**

Визначення рівня антитіл проводили методом радіоімунологічного аналізу.

Радіоімунологічний аналіз заснований на конкуренції між міченим і неміченим антигеном за специфічні сайти антитіл, утворюючи комплекси антиген-антитіло[56].

Радіоімунологічний аналіз є новою технікою *in vitro* для визначення ультраслідових речовин, що поєднує високу чутливість, точність радіоізотопних вимірювань і специфічність реакцій антиген-антитіло. У широкому розумінні будь-який метод, який використовує мічені радіоізотопи антигену або антитіла для проходження аналізу імуної відповіді, можна назвати радіоімуним аналізом[56].

Класичний радіоімуний аналіз — це метод, у якому мічений антиген

конкурує з неміченим антигеном за обмежену кількість антитіл. Його можна розділити на два типи: конкурентний RIA (радіоімунологічний аналіз) і неконкурентний RIA[56].

Конкурентний RIA використовує радіоізотопне вимірювання, а неконкурентний RIA є радіоаналітичним методом, який використовує мічені радіонуклідами антитіла для виявлення антигену[56].

Власне, перший розроблений імунологічний аналіз був описаний Ялоу та Берсоном у 1959 році. Вони використовували мічений радіоактивним ізотопом інсулін для оцінки концентрації інсуліну в плазмі людини, і таким чином розробили перший радіоімунологічний аналіз (RIA)[54].

Для RIA потрібно наступне: зразок, що містить цікавий антиген, комплементарне антитіло та радіоактивно мічену версію антигену. Антиген зразка та антитіло інкубують разом, дозволяючи антигену зразка зв'язатися з антитілом[54].

Потім додають радіоактивно мічений антиген. Мічений радіоактивним ізотопом антиген конкурує з антигеном зразка і витісняє його з антитіла[54].

Вимірюючи радіоактивність гранули, можна визначити кількість радіоактивно міченого антигену, який зв'язався з антитілом, і, отже, концентрацію антигену в зразку[54].

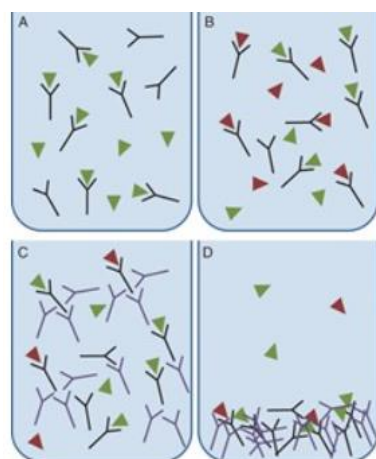


Рис. 2.6. Схема проведення радіоімунологічного аналізу[54].

(А) Зразок пептиду інкубують з первинним антитілом. ( В ) Потім додають мічений радіоактивним ізотопом пептид. Він конкурує з пептидом

зразка і витісняє його. ( С ) Вторинне антитіло зв'язується з первинним антитілом і змушує його випадати в осад із розчину. ( D ) Центрифугування змушує комплекс антитіло–антиген утворювати осад.

Порівняльні переваги радіоімунологічного аналізу[56,57]:

- *Методологія.* З точки зору чутливості, специфічності та точності, немає суттєвої різниці між радіоімуним методом та іншими імунологічними методами, такими як хемілюмінесценція.
- *Автоматизація.* В останні роки з постійним розвитком технології радіоімунологічного аналізу з'явилася повністю автоматизована система радіоімунологічного аналізу. Автоматична радіоімунологічна система контролюється 8 голками для введення зразків, а продуктивність детектування становить 1000 пробірок на годину, що значно вище порівняно з імпортною автоматичною хемілюмінесценцією.
- *Ціноутворення.* Незалежно від того, імпортовані чи вітчизняні набори радіоімунологічного аналізу, їх ціна, як правило, нижча, ніж аналогічна імпортована повністю автоматична хемілюмінесценція.

Безпека та захист навколишнього середовища. Багато хто помилково вважає радіоімунологічний препарат радіоактивним. Він не такий безпечний і екологічно чистий, як інші нерадіоактивні методи виявлення, такі як хемілюмінесценція. Насправді доза радіоімуного опромінення дуже мала. Деякі ізотопи можуть потрапляти в організм через непошкоджену шкіру, і забруднюючі речовини осідають у просторі або адсорбуються різними поверхнями, утворюючи поверхневе забруднення. Цей вид забруднення має великий обсяг, який може піддати працівників зовнішньому випромінюванню, а забруднення повітря також може призвести до зовнішнього випромінювання. Якщо радіоактивний матеріал потрапляє в організм через дихальні шляхи або травний тракт людей, це спричинить внутрішнє опромінення[56].

### РОЗДІЛ 3

#### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз отриманих результатів проводився індивідуально по кожному пацієнту, по всій вибірці, по родинних пацієнтів.

Отже, за результатами аналізу на IgG *A.lumbricoides* були отримані такі дані :семеро із дев'ятнадцяти пацієнтів мали значення вище ніж 1,1 (референсні значення для IgG<0,9 – негативний, 0,9–1,1 – сумнівний, >1,1- позитивний). Результати представлені на рисунку 3.1.

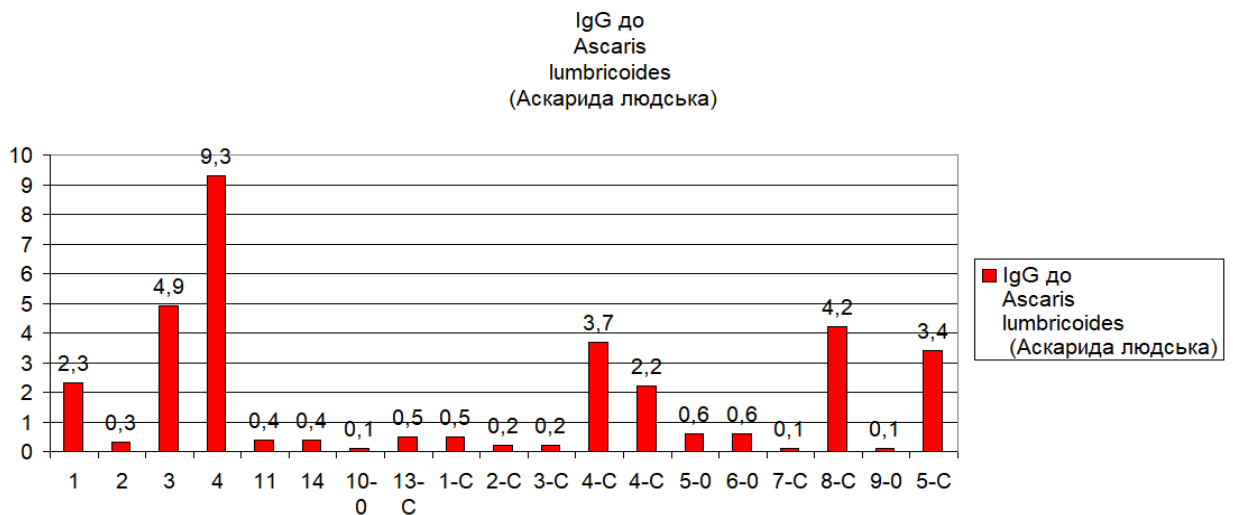


Рис. 3.1. IgG до *A.lumbricoides* у зразках крові 19 пацієнтів.

Пацієнт 1 мав значення антитіл 2,3, що є позитивним результатом на аскаридоз. Пацієнт 2 мав значення 0,3, що є негативним значенням. Пацієнт 3 мав значення антитіл 4,9 що є більшим за 1,1 і, відповідно, позитивним результатом на аскаридоз. Пацієнт 4 мав значення в 9,3, що є позитивним результатом на аскаридоз. Пацієнт 11 мав 0,4 значення антитіл, що є

негативним результатом. Пацієнт 14 мав значення 0,4, що є негативним результатом на аскаридоз. Пацієнт 10-О мав значення 0,1, що є негативним тестом на аскаридоз. Пацієнт 13-С мав значення 0,5, що є негативним тестом на аскаридоз. Пацієнт 1-С мав значення 0,5, що є негативним тестом на аскаридоз. Пацієнт 2-С мав значення 0,2, що є негативним значенням на аскаридоз. Пацієнт (3-с) мав значення 0,2 що є негативним тестом на аскаридоз. Пацієнт (4-с) мав значення 3,7, що є позитивним результатом тесту на аскаридоз. Пацієнт мав значення (4-с) мав значення 2,2, що є позитивним тестом на аскаридоз. Пацієнт (5-0) мав значення антитіл 0,6, що є негативним результатом на аскаридоз. Пацієнт (6-0) мав значення 0,6, що є негативним результатом на аскаридоз. Пацієнт (7-С) мав значення антитіл 0,1, що є негативним результатом на аскаридоз. Пацієнт (8-С) має значення антитіл 4,2 що є позитивним результатом на аскаридоз. Пацієнт (9-0) має значення антитіл 0,1, що є негативним результатом на аскаридоз. Пацієнт (5-С) мав рівень антитіл, що дорівнював 3,4, що є позитивним результатом на аскаридоз.

Таким чином, семеро пацієнтів мають ознаки зараження аскаридозом.

Цікаво, що пацієнт номер 1, віком 60 років, із значенням антитіл 2,3 має хронічний бронхіт у стадії загострення. Той факт, що аскариди здатні викликати легеневі захворювання (гранульоми, пневмонічні інфільтрати) широко описаний у науковій літературі[6,4,13].

Інший пацієнт, під номером 4-С, віком 63 роки, зі значенням антитіл 3,7 мав бронхіт та правосторонню пневмонію. Ці результати також узгоджуються із даними експериментальних наукових статей.

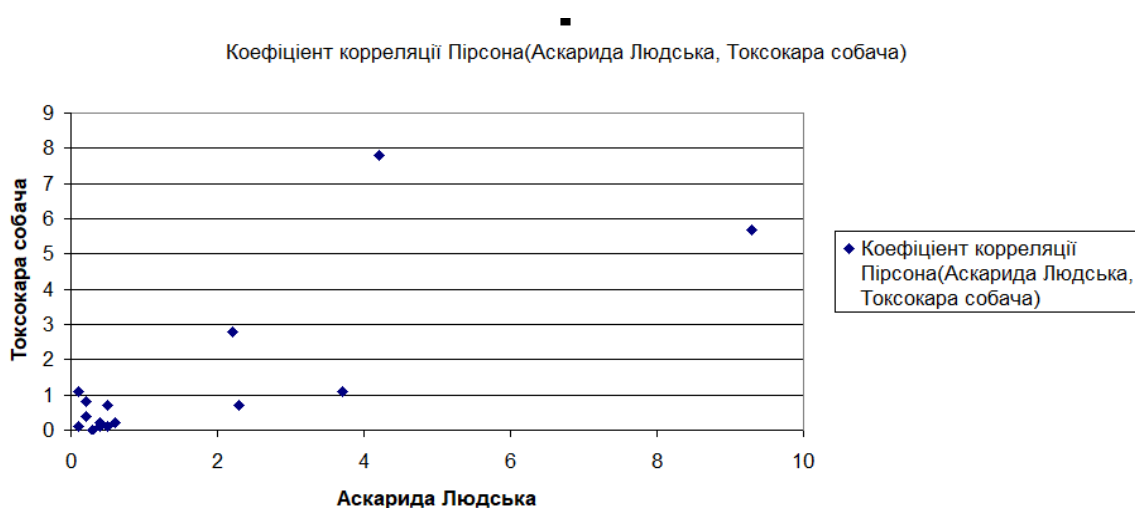


Рис. 3.2. Коефіцієнт кореляції Пірсона.

Окрім цього, нами був обрахований коефіцієнт кореляції Пірсона, що дорівнював 0,779. Коефіцієнт дорівнював позитивному значенню, що показувало лінійну залежність збільшення рівня антитіл до токсокар і антитіл до аскариди людської.

В іншій вибірці нами також був обрахований коефіцієнт кореляції Пірсона.

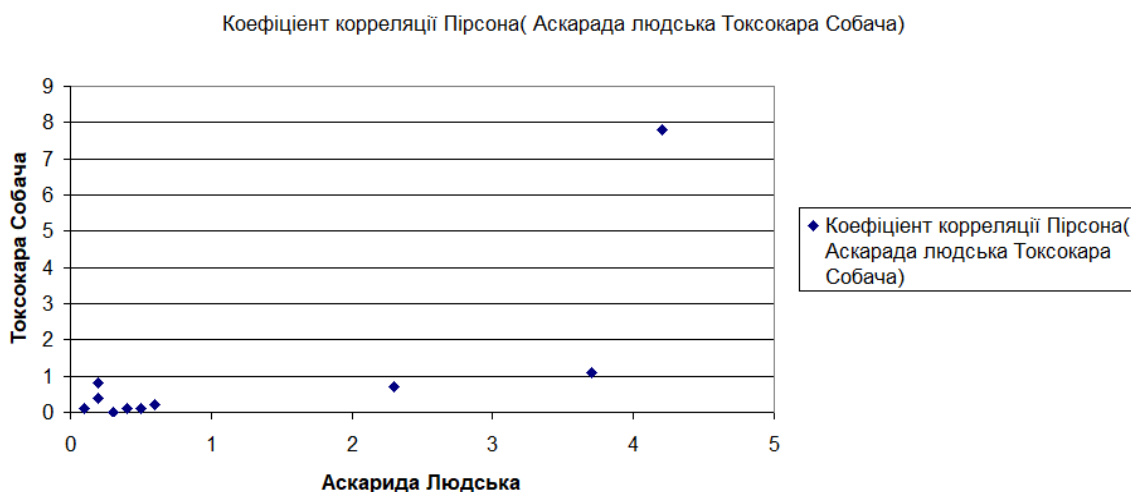


Рис. 3.3. Коефіцієнт кореляції пірсона вибірки із 12 пацієнтів

Коефіцієнт кореляції Пірсона становив 0,745 що є позитивним значенням, таким чином збільшення антитіла до аскарид лінійно пов'язано із збільшенням рівня антитіл до токсокар.

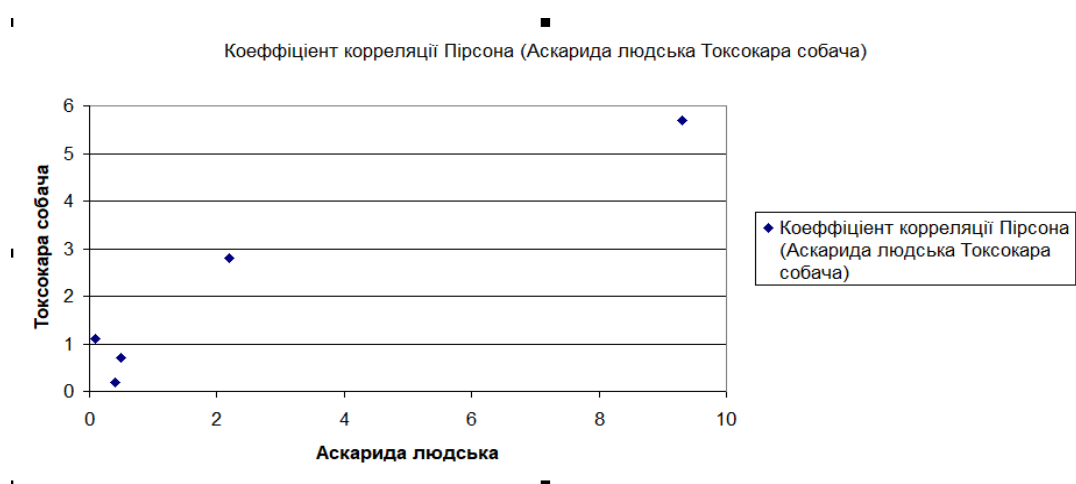


Рис. 3.4. Коефіцієнт кореляції Пірсона вибірки із 5 пацієнтів

У даній вибірці коефіцієнт кореляції Пірсона становив 0,95, що вказувало на сильну кореляцію між рівнем антитіл до токсокари, та антитіл до аскарид.

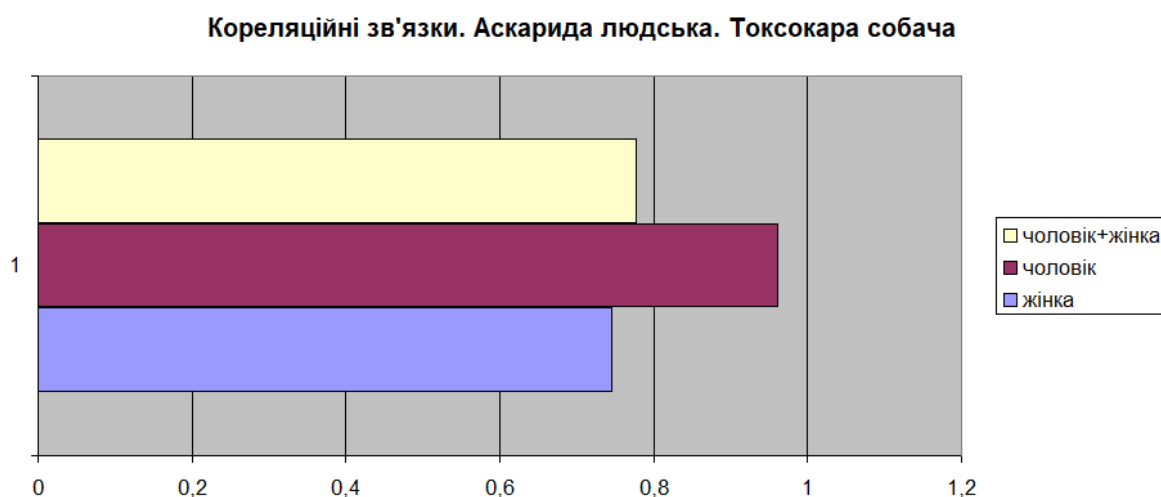


Рис. 3.5. Кореляційні зв'язки. Аскарида людська. Токсокара собача

У нашій вибірці пацієнтів дуже сильно варіабельним є вік (від 13 до 65 років). Цікаво, що усі інші пацієнти не мало яскраво – виражених легеневих захворювань, і що важливо – усі вони мали відносно молодий вік (13-39). Спекулюючи, ми припускаємо, що із віком вірогідність появи легеневих ускладнень збільшується.

У пацієнта номер 13-С був також взятий аналіз на ПСА, однак він показав негативний результат. Власне, ПСА, або Простат-специфічний антиген-серінова протеаза, що секретується виключно епітеліальними клітинами. Відомо, що від 30 до 50% пацієнтів з гіперплазією простати мають підвищений рівень ПСА, що залежить від ступеня обструкції та



розмірів простати. Від 25 до 92% пацієнтів із раком простати мають підвищений рівень ПСА. Таким чином, ПСА – онкомаркер, вимірювання якого необхідне для моніторингу ракового захворювання[34].

ПСА у нормі присутній у крові здорових пацієнтів, однак його концентрація не має бути вище  $4 \cdot 10^{-6}$  г/л[35,36].

У пацієнта 13-С рівень ПСА становив 0,18 , що вказує на негативний результат.

Нами не було знайдено даних в літературі, щодо асоціації між рівнем ПСА і інфікуванням аскаридою людською. Отримані нами дані не дозволяють говорити про висновки, оскільки нами був проведений аналіз на ПСА у одного пацієнта, що неможливо статистично обрахувати.

Також, нами був проведений ELISA на визначення IgG до токсокар. Результати на діаграмі нижче:

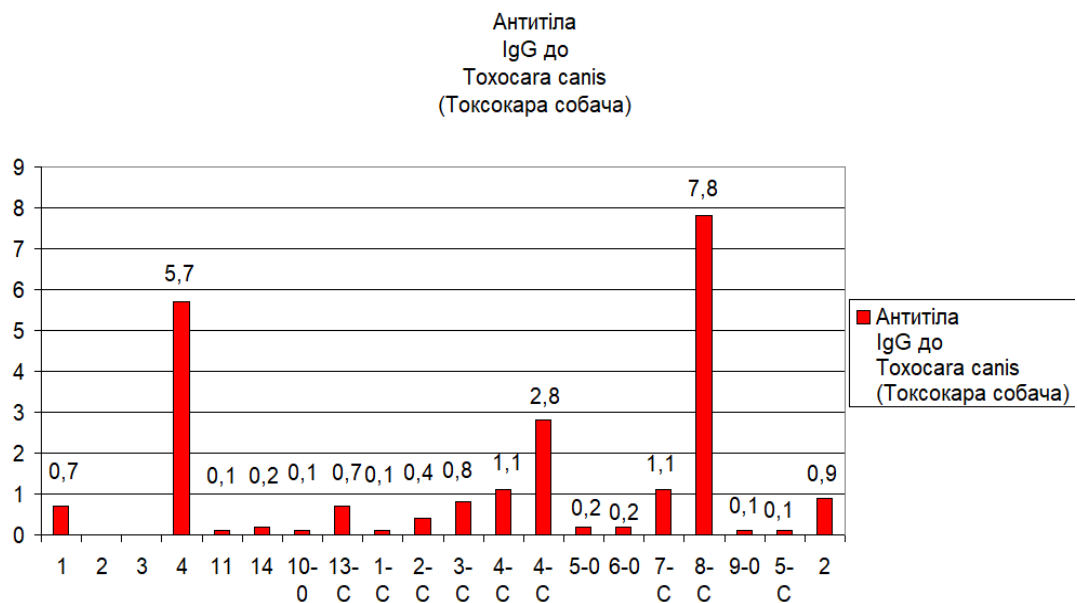


Рис. 3.6. Результати аналізів 19 пацієнтів на токсокароз.

Як бачимо, у пацієнтів під номерами 4, 4-с, 8-с, рівень антитіл до собачої токсокари був вищий за 1,1, що може свідчити про наявність гострої або хронічної інвазії.

Пацієнт (1) мав рівень антитіл до тоскокар 0,7, що є негативним результатом на токсокароз. Пацієнт (4) мав рівень антитіл 5,7, що є позитивним результатом на тоскокароз. Пацієнт (11) мав рівень антитіл до тоскокар, що дорівнював 0,1 (негативний результат). Пацієнт (14) мав рівень

антитіл 0,2 (негативний результат). Пацієнт (10-0) мав рівень антитіл 0,1 (негативний результат). Пацієнт (13-С) мав рівень антитіл до токсокар, що дорівнював 0,7 (негативний результат). Пацієнт (1-с) мав рівень антитіл до токсокар, що дорівнював 0,1 (негативний результат). Пацієнт (2-С) мав рівень антитіл 0,4 (негативний результат). Пацієнт (3-С) мав рівень антитіл 0,8 (негативний результат). Пацієнт (4-С) мав рівень антитіл 1,1 (сумнівний результат). Пацієнт (5-0) мав рівень антитіл 0,2 (негативний результат). Пацієнт (6-0) мав рівень антитіл 0,2 (негативний результат). Пацієнт (7-С) мав рівень антитіл 1,1(сумнівний результат). Пацієнт (8-С) мав рівень антитіл 7,8 (позитивний результат). Пацієнт (9-0) мав рівень антитіл, що дорівнював 0,1 (негативний результат). Пацієнт (5-С) мав рівень антитіл-0,1 (негативний результат). Пацієнт (2) мав рівень антитіл, що дорівнював 2 (позитивний результат).

Цікаво, що в анамнезі, у пацієнта номер 1 хронічний бронхіт в стадії загострення. Однак, його аналізи до токсокар- негативні(значення-0.7). Таким чином, хронічний бронхіт пацієнта номер 1 не є результатом інвазії токсокарами.

У пацієнта номер 4-С бронхіт та правостороння пневмонія. Результати ІФА -1,1. Тобто тут сумнівний результат, однак враховуючи наявність правосторонньої пневмонії, спекулюємо, що причиною цієї пневмонії є наявність інвазії токсокари собачої.

Отримані результати, щодо пацієнта 4-с, що має правосторонню пневмонію та бронхіт, узгоджуються з результатами досліджень, описаних в науковій літературі[48]. Так, внаслідок інвазії токсокарою відбувається активація імунної системи, що призводить до іммуно-опосередкованих пневмоній, що може супроводжуватися різноманітними симптомами, такими як кашель, лихоманка, болі в животі.

Так, в експерименті[18], було показано, що експериментальне зараження мишей токсокарозом призводить до появи інфільтрату легеневої тканини. Таким чином, отримані нами результати узгоджуються із експериментальними дослідженнями.

Пацієнти під номерами 4, 7с, 8с мали високі значення антитіл до токсокари собачої, однак, в анамнезі не мали легеневих захворювань. Таким чином, зараження токсокарозом не означає сто відсоткову появу легеневого захворювання.

До основних легеневих захворювань, що спостерігалися у наших пацієнтів були хронічний бронхіт в стадії загострення, правостороння пневмонія.

Наступним аналізом ІФА були антитіла IgG до *O.felineus*. Результати на діаграммі нижче:

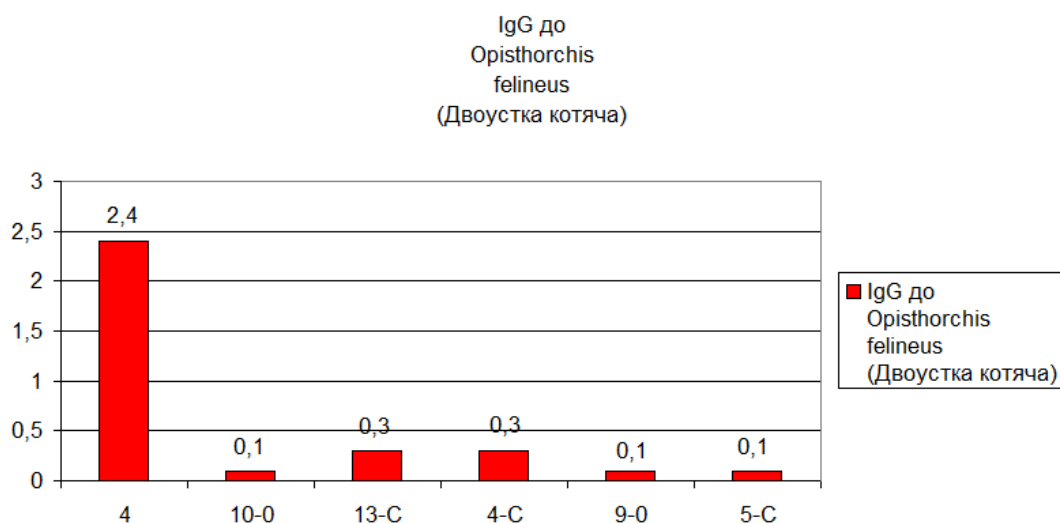


Рис. 3.7. ІФА пацієнтів до *O.felineus*

Єдиним пацієнтом, що мав позитивний результат до *O.felineus* був пацієнт номер 4. Цікаво, що у цього ж пацієнта позитивні результати на аскаридоз, тосокароз, опісторхоз.

Також, ми проводили аналіз наявності антитіл до лямблїї, однак усі пацієнти мали негативні результати. Деталі на діаграмі знизу:

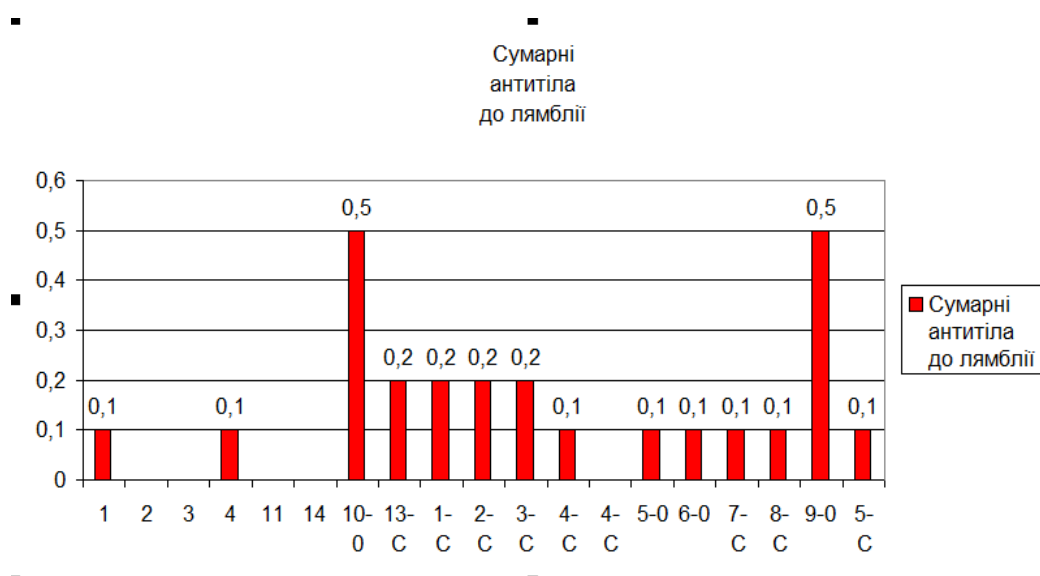


Рис. 3.8. Сумарні антитіла до лямблій.

У проаналізованих пацієнтів результати ІФА були негативні.

Окрім цього, ми проводили статистичний аналіз, де оцінювали, чи є кореляція між рівнем антитіл до лямблій, та антитіл до токсокари собачої

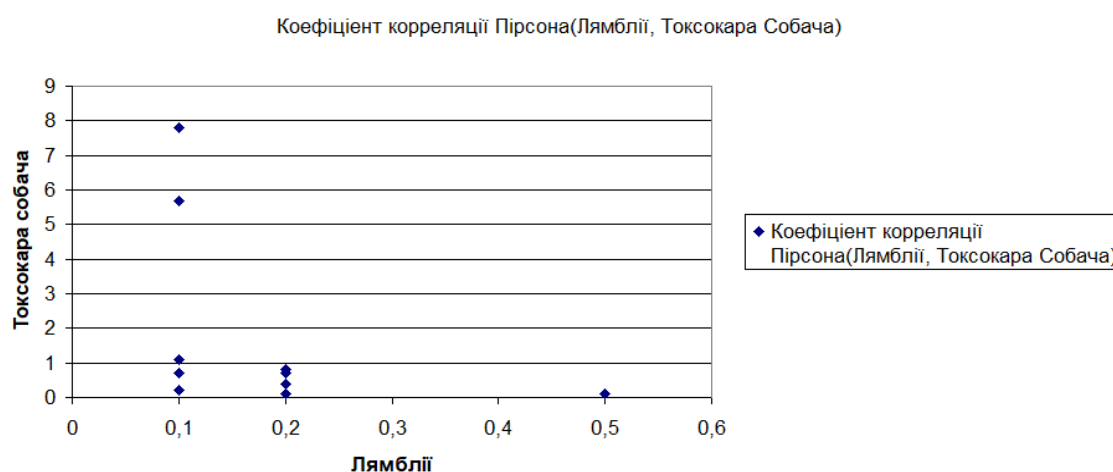


Рис. 3.9. Коефіцієнт кореляції Пірсона вибірки із 13 пацієнтів

Отримані нами значення кореляції Пірсона становили  $-0,35$ , що свідчило про відсутність лінійної залежності між рівнем антитіл до токсокари собачої та лямблій

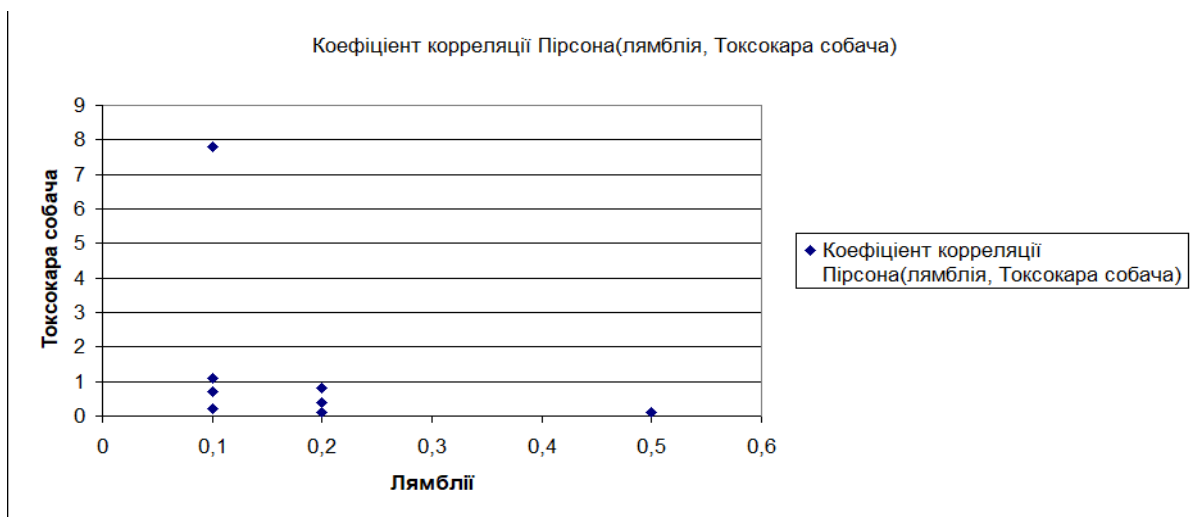


Рис. 3.10 Коефіцієнт кореляції Пірсона вибірки із 10 пацієнтів

Отримане нами значення в  $-0,31$  не дозволяє говорити про наявність лінійної залежності.

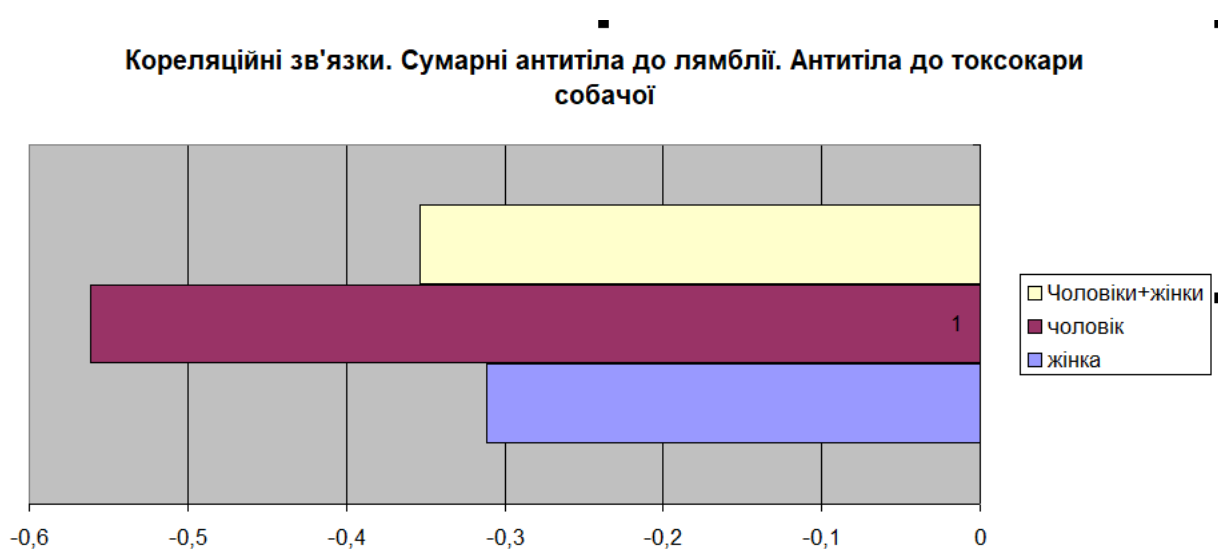


Рис. 3.11. Кореляційні зв'язки. Сумарні антитіла до лямблій. Антитіла до токсокари собачої.

Таким чином, не можна говорити, що зі збільшенням рівня антитіл до токсокари збільшується рівень антитіл до лямблій.

Ці результати відрізняються від отриманими нами даними, щодо лінійної залежності між рівнем антитіл до аскариди людської та токсокари собачої.

Таким чином, можна підсумувати, що зі збільшенням рівня антитіл до

лямблій не збільшується рівень антитіл до токсокар, А також, те, що зі збільшенням рівня антитіл до аскариди людської, збільшується і рівень антитіл до токсокари собачої.

Середні значення рівня антитіл до лямблії становили 0,192, до токсокари собачої 1,38125, до аскариди людської 1,7, до двоустки котячої 0,64.

## ВИСНОВКИ

1. Збільшення рівня захворюваності на паразитарні інвазії збільшує відсоток респіраторних захворювань легень. Паразити можуть вражати різні відділи грудної клітки від трахеобронхіального дерева, легеневої паренхіми та плевральної порожнини до грудної стінки. Окрім цього інфікування паразитами призводить до змін на гістологічному рівні. Так, на моделі мишей, інфікованих аскаридозом було показано потовщення м'язового шару бронхіол. Також, мігруючі личинки аскарид можуть індукувати утворення тканинних і легеневих гранульом через активацію макрофагів, нейтрофілів і еозинофілів. Це може призвести до перибронхіального запалення, збільшення продукції бронхіального слизу та, нарешті, бронхоспазму. При ехінококкозу можливе утворення кіст в легенях.
2. Визначали рівень антитіл до аскариди людської. У вибірці із 19 пацієнтів, семеро пацієнтів мали значення антитіл більше ніж 1,1, що свідчило про ураження аскаридозом.
3. Визначали рівень антитіл до токсокари собачої. У вибірці із 19

пацієнтів, троє мали значення антитіл більше ніж 1,1, що свідчило на наявність токсокар

4. Окрім цього, коефіцієнтом кореляції Пірсона встановлена кореляція між рівнем антитіл до аскариди людської та токсокари собачої

#### Список використаних джерел

1. Adam RD. Biology of *Giardia lamblia*. Clin Microbiol Rev. 2001 Jul;14(3):447-75. doi: 10.1128/CMR.14.3.447-475.2001. PMID: 11432808; PMCID: PMC88984.
2. Aleksandra L, Barbara Z, Natalia LA, Danuta KB, Renata GK, Ewa ML. Respiratory Failure Associated with Ascariasis in a Patient with Immunodeficiency. Case Rep Infect Dis. 2016;2016:4070561. doi: 10.1155/2016/4070561. Epub 2016 May 22. PMID: 27313919; PMCID: PMC4893448.
3. Alhajj M, Zubair M, Farhana A. Enzyme Linked Immunosorbent Assay. [Updated 2023 Apr 23]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922/>
4. Al-Tawfiq JA, Kim H, Memish ZA. Parasitic lung diseases. Eur Respir Rev. 2022 Nov 29;31(166):220093. doi: 10.1183/16000617.0093-2022. PMID: 36450370; PMCID: PMC9724914
5. Assad DX, Mascarenhas ECP, Normando AGC, Chardin H, Barra GB, Pratesi R, Nóbrega YKM, Acevedo AC, Guerra ENS. Correlation between salivary and serum CA15-3 concentrations in patients with breast cancer.

- Mol Clin Oncol. 2020 Aug;13(2):155-161. doi: 10.3892/mco.2020.2062. Epub 2020 Jun 4. PMID: 32714539; PMCID: PMC7366245.
6. Bonamico M, Tiberti C, Picarelli A, Mariani P, Rossi D, Cipolletta E, Greco M, Tola MD, Sabbatella L, Carabba B, Magliocca FM, Strisciuglio P, Di Mario U. Radioimmunoassay to detect antitransglutaminase autoantibodies is the most sensitive and specific screening method for celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 2001 May;96(5):1536-40. doi: 10.1111/j.1572-0241.2001.03754.x. PMID: 11374695.
  7. Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, Dodds KM, Coplen DE, Yuan JJ, Petros JA, Andriole GL. Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. *N Engl J Med.* 1991 Apr 25;324(17):1156-61. doi: 10.1056/NEJM199104253241702. Erratum in: *N Engl J Med* 1991 Oct 31;325(18):1324. PMID: 1707140.
  8. David MK, Leslie SW. Prostate Specific Antigen. [Updated 2022 Nov 10]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557495/>
  9. Demirci M, Unlü M, Fidan F, Kaya S. Eosinophilic pneumonia due to toxocariasis: an adult case report. *Turkiye Parazitoloj Derg.* 2012;36(4):258-9. doi: 10.5152/tpd.2012.61. PMID: 23339951
  10. Dimitrios N. Melegos, He Yu, Mala Ashok, Chun Wang, Frank Stanczyk, Eleftherios P. Diamandis, Prostate-Specific Antigen in Female Serum, a Potential New Marker of Androgen Excess, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Volume 82, Issue 3, 1 March 1997, Pages 777–780, <https://doi.org/10.1210/jcem.82.3.3792>
  11. Fedorova OS, Fedotova MM, Zvonareva OI, Mazeina SV, Kovshirina YV, Sokolova TS, Golovach EA, Kovshirina AE, Konovalova UV, Kolomeets IL, Gutor SS, Petrov VA, Hattendorf J, Ogorodova LM, Odermatt P. *Opisthorchis felinus* infection, risks, and morbidity in rural Western Siberia, Russian Federation. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020 Jun 29;14(6):e0008421. doi: 10.1371/journal.pntd.0008421. PMID: 32598389; PMCID: PMC7351239.
  12. Goldsmith SJ. Radioimmunoassay: review of basic principles. *Semin Nucl*



- Med. 1975 Apr;5(2):125-52. doi: 10.1016/s0001-2998(75)80028-6. PMID: 164695.
13. Halliez MC, Buret AG. Extra-intestinal and long term consequences of *Giardia duodenalis* infections. *World J Gastroenterol*. 2013 Dec 21;19(47):8974-85. doi: 10.3748/wjg.v19.i47.8974. PMID: 24379622; PMCID: PMC3870550.
  14. Hanh NTL, Lee YL, Lin CL, Chou CM, Cheng PC, Quang HH, Fan CK. Evidence for Asthma in the Lungs of Mice Inoculated with Different Doses of *Toxocara canis*. *Am J Trop Med Hyg*. 2020 Dec;103(6):2305-2314. doi: 10.4269/ajtmh.20-0484. Epub 2020 Sep 17. PMID: 32975177; PMCID: PMC7695083
  15. Haugen B, Karinshak SE, Mann VH, Popratiloff A, Loukas A, Brindley PJ, Smout MJ. Granulin Secreted by the Food-Borne Liver Fluke *Opisthorchis viverrini* Promotes Angiogenesis in Human Endothelial Cells. *Front Med (Lausanne)*. 2018 Feb 16;5:30. doi: 10.3389/fmed.2018.00030. PMID: 29503819; PMCID: PMC5820972.
  16. Jacquier P, Gottstein B, Stingelin Y, Eckert J. Immunodiagnosis of toxocarosis in humans: evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay kit. *J Clin Microbiol*. 1991 Sep;29(9):1831-5. doi: 10.1128/jcm.29.9.1831-1835.1991. PMID: 1774303; PMCID: PMC270219.
  17. Kanneganti K, Makker JS, Remy P. *Ascaris lumbricoides*: To Expect the Unexpected during a Routine Colonoscopy. *Case Rep Med*. 2013;2013:579464. doi: 10.1155/2013/579464. Epub 2013 Jun 11. PMID: 23853608; PMCID: PMC3693114.
  18. Karbysheva N, Nikonorova M, Matros O, Kiushkina I, Nemilostiva E, Choroshilova I, Gorobchenko A, Umbetova K, Volchkova E. Clinical polymorphism in patients with *Opisthorchis felinus* infection in the Western Siberia. *IDCases*. 2021 Mar 10;24:e01064. doi: 10.1016/j.idcr.2021.e01064. PMID: 33948435; PMCID: PMC8080446.
  19. Kilic E, Yazar S, Saraymen R, Ozbilge H. Serum malondialdehyde level in patients infected with *Ascaris lumbricoides*. *World J Gastroenterol*. 2003

- Oct;9(10):2332-4. doi: 10.3748/wjg.v9.i10.2332. PMID: 14562404; PMCID: PMC4656489.
- 20.Lamberton PH, Jourdan PM. Human Ascariasis: Diagnostics Update. *Curr Trop Med Rep*. 2015;2(4):189-200. doi: 10.1007/s40475-015-0064-9. Epub 2015 Oct 3. PMID: 26550552; PMCID: PMC4630244.
- 21.Mahadevarao Premnath S, Zubair M. Electrochemiluminescence Method. [Updated 2023 Jul 15]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK594228>
- 22.Maizels RM. *Toxocara canis*: molecular basis of immune recognition and evasion. *Vet Parasitol*. 2013 Apr 15;193(4):365-74. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.12.032. Epub 2012 Dec 20. PMID: 23351972; PMCID: PMC3611597.
- 23.Matteelli A, Saleri N. Respiratory Diseases. *Travel Medicine*. 2008:561–72. doi: 10.1016/B978-0-323-03453-1.10057-4. Epub 2009 May 15. PMCID: PMC7152085.
- 24.McSharry C, Xia Y, Holland CV, Kennedy MW. Natural immunity to *Ascaris lumbricoides* associated with immunoglobulin E antibody to ABA-1 allergen and inflammation indicators in children. *Infect Immun*. 1999 Feb;67(2):484-9. doi: 10.1128/IAI.67.2.484-489.1999. PMID: 9916049; PMCID: PMC96345.
- 25.Mordvinov VA, Ershov NI, Zaparina OG, Pakharukova MY. Genomics and proteomics of the liver fluke *Opisthorchis felinus*. *Vavilovskii Zhurnal Genet Selektzii*. 2020 Jul;24(4):383-390. doi: 10.18699/VJ20.44-o. PMID: 33659821; PMCID: PMC7716572.
- 26.Olshina MA, Sharon M. Mass Spectrometry: A Technique of Many Faces. *Q Rev Biophys*. 2016 Jan;49:e18. doi: 10.1017/S0033583516000160. Epub 2016 Nov 28. PMID: 28100928; PMCID: PMC5238952.
- 27.Osmekhina E, Neubauer A, Klinzing K, Myllyharju J, Neubauer P. Sandwich ELISA for quantitative detection of human collagen prolyl 4-hydroxylase. *Microb Cell Fact*. 2010 Jun 17;9:48. doi: 10.1186/1475-2859-

- 9-48. PMID: 20565744; PMCID: PMC2895579
- 28.Ozdemir O. Loeffler's syndrome: A type of eosinophilic pneumonia mimicking community-acquired pneumonia and asthma that arises from *Ascaris lumbricoides* in a child. *North Clin Istanbul*. 2020 Aug 5;7(5):506-507. doi: 10.14744/nci.2020.40121. PMID: 33163888; PMCID: PMC7603848
- 29.Pakharukova MY, Mordvinov VA. The liver fluke *Opisthorchis felinus*: biology, epidemiology and carcinogenic potential. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2016 Jan;110(1):28-36. doi: 10.1093/trstmh/trv085. PMID: 26740360
- 30.Pang B, Zhu Y, Lu L, Gu F, Chen H. The Applications and Features of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in the Analysis of Traditional Chinese Medicine. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2016;2016:3837270. doi: 10.1155/2016/3837270. Epub 2016 Nov 10. PMID: 27956918; PMCID: PMC5121459.
- 31.Park BM, Jeong SO, Park HS, Jung SS, Kim SY, Kim JO, Lee JE. Differences in the clinical and radiological characteristics of lung-involved toxocariasis between toxocariasis with eosinophilia and those without eosinophilia. *J Thorac Dis*. 2014 Dec;6(12):1757-64. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2014.12.24. PMID: 25589970; PMCID: PMC4283343.
- 32.Park KH, Kim YS, Kim SK, Choi NC, Kwon OY, Lim B, Park KJ. *Toxocara canis*-Associated Myelitis with Eosinophilic Pneumonia. *Exp Neurobiol*. 2016 Jun;25(3):139-42. doi: 10.5607/en.2016.25.3.139. Epub 2016 Jun 8. PMID: 27358582; PMCID: PMC4923358.
- 33.Portilho AI, Gimenes Lima G, De Gaspari E. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: An Adaptable Methodology to Study SARS-CoV-2 Humoral and Cellular Immune Responses. *J Clin Med*. 2022 Mar 9;11(6):1503. doi: 10.3390/jcm11061503. PMID: 35329828; PMCID: PMC8948777.
- 34.Qualizza R, Losappio LM, Furci F. A case of atopic dermatitis caused by *Ascaris lumbricoides* infection. *Clin Mol Allergy*. 2018 Apr 10;16:10. doi: 10.1186/s12948-018-0088-5. PMID: 29651227; PMCID: PMC5894144.

35. Ramamoorthy KG. Anaesthesia and Ascaris pneumonia (Loeffler's syndrome). *Indian J Anaesth.* 2015 Feb;59(2):125-6. doi: 10.4103/0019-5049.151379. PMID: 25788748; PMCID: PMC4357880.
36. Ranasuriya G, Mian A, Boujaoude Z, Tsigrelis C. Pulmonary toxocariasis: a case report and literature review. *Infection.* 2014 Jun;42(3):575-8. doi: 10.1007/s15010-014-0587-3. Epub 2014 Jan 23. PMID: 24452526.
37. Rappold BA. Review of the Use of Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry in Clinical Laboratories: Part II-Operations. *Ann Lab Med.* 2022 Sep 1;42(5):531-557. doi: 10.3343/alm.2022.42.5.531. PMID: 35470272; PMCID: PMC9057814.
38. R. D. Grange, J. P. Thompson, D. G. Lambert, Radioimmunoassay, enzyme and non-enzyme-based immunoassays, *BJA: British Journal of Anaesthesia*, Volume 112, Issue 2, February 2014, Pages 213–216, <https://doi.org/10.1093/bja/aet293>
39. Rogan M. Respiratory Infections, Acute. *International Encyclopedia of Public Health.* 2017:332–6. doi: 10.1016/B978-0-12-803678-5.00383-0. Epub 2016 Oct 24. PMCID: PMC7150086.
40. Rusli H, Putri RM, Alni A. Recent Developments of Liquid Chromatography Stationary Phases for Compound Separation: From Proteins to Small Organic Compounds. *Molecules.* 2022 Jan 28;27(3):907. doi: 10.3390/molecules27030907. PMID: 35164170; PMCID: PMC8840574.
41. Saleri N, Ryan ET. Respiratory Infections. *Travel Medicine.* 2019:527–37. doi: 10.1016/B978-0-323-54696-6.00059-8. Epub 2018 Nov 26. PMCID: PMC7151964
42. Sakamoto S, Putalun W, Vimolmangkang S, Phoolcharoen W, Shoyama Y, Tanaka H, Morimoto S. Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *J Nat Med.* 2018 Jan;72(1):32-42. doi: 10.1007/s11418-017-1144-z. Epub 2017 Nov 21. Erratum in: *J Nat Med.* 2018 Jan 5;: PMID: 29164507; PMCID: PMC5775980
43. Saltykova IV, Ogorodova LM, Ivanov VV, Bogdanov AO, Gereng EA,

- Perina EA, Brindley PJ, Sazonov AE. Carbonyl stress phenomena during chronic infection with *Opisthorchis felinus*. *Parasitol Int.* 2017 Aug;66(4):453-457. doi: 10.1016/j.parint.2016.01.002. Epub 2016 Jan 8. PMID: 26773869; PMCID: PMC4938777.
44. Santivanez S, Garcia HH. Pulmonary cystic echinococcosis. *Curr Opin Pulm Med.* 2010 May;16(3):257-61. doi: 10.1097/MCP.0b013e3283386282. PMID: 20216420; PMCID: PMC3362862.
45. Sarkar M, Pathania R, Jhobta A, Thakur BR, Chopra R. Cystic pulmonary hydatidosis. *Lung India.* 2016 Mar-Apr;33(2):179-91. doi: 10.4103/0970-2113.177449. PMID: 27051107; PMCID: PMC4797438.
46. Shah P, Kate AH, Nester N, Patole K, Leuppi JD, Chhajed PN. Parasitic infestation of lung: An unusual cause of interstitial pneumonitis. *Lung India.* 2016 Mar-Apr;33(2):222-4. doi: 10.4103/0970-2113.177456. PMID: 27051117; PMCID: PMC4797448.
47. Singh U, Garg N, Chopra V. Eosinophilic pleural effusion and giardiasis: A causal or a casual relationship? *Lung India.* 2013 Jan;30(1):69-71. doi: 10.4103/0970-2113.106179. PMID: 23661922; PMCID: PMC3644840.
48. Son BB, Kim-Hoa NT, Tuy NV, Phu NM, Nam-Anh ND. Loeffler's syndrome mimicking lung tumor and pneumonia in a child: A case report. *Respir Med Case Rep.* 2022 Mar 21;37:101638. doi: 10.1016/j.rmcr.2022.101638. PMID: 35342707; PMCID: PMC8943435.
49. Thapa B, Sapkota R, Kim M, Barnett SA, Sayami P. Surgery for parasitic lung infestations: roles in diagnosis and treatment. *J Thorac Dis.* 2018 Oct;10(Suppl 28):S3446-S3457. doi: 10.21037/jtd.2018.08.32. PMID: 30505532; PMCID: PMC6218367.
50. Thomas SN, French D, Jannetto PJ, Rappold BA, Clarke WA. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for clinical diagnostics. *Nat Rev Methods Primers.* 2022;2(1):96. doi: 10.1038/s43586-022-00175-x. Epub 2022 Dec 8. PMID: 36532107; PMCID: PMC9735147
51. Vijayan VK. Diagnosis of Pulmonary Parasitic Diseases. *Parasitic Diseases of the Lungs.* 2013 Jun 5:1-14. doi: 10.1007/978-3-642-37609-2\_1. PMCID:

- PMC7124114.
52. Vijayan VK. How to diagnose and manage common parasitic pneumonias. *Curr Opin Pulm Med.* 2007 May;13(3):218-24. doi: 10.1097/MCP.0b013e3280f31b58. PMID: 17414130.
53. Wang D, Stapleton HM. Analysis of thyroid hormones in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2010 Jul;397(5):1831-9. doi: 10.1007/s00216-010-3705-9. Epub 2010 May 1. PMID: 20437035; PMCID: PMC3082288.
54. Weatherhead JE, Porter P, Coffey A, Haydel D, Versteeg L, Zhan B, Gazzinelli Guimarães AC, Fujiwara R, Jaramillo AM, Bottazzi ME, Hotez PJ, Corry DB, Beaumier CM. *Ascaris Larval Infection and Lung Invasion Directly Induce Severe Allergic Airway Disease in Mice.* *Infect Immun.* 2018 Nov 20;86(12):e00533-18. doi: 10.1128/IAI.00533-18. PMID: 30249744; PMCID: PMC6246907.
55. Wunderink HF, Rozemeijer W, Wever PC, Verweij JJ, van Lieshout L. Foodborne trematodiasis and *Opisthorchis felinus* acquired in Italy. *Emerg Infect Dis.* 2014 Jan;20(1):154-5. doi: 10.3201/eid2001.130476. Erratum in: *Emerg Infect Dis.* 2014 Dec;20(12):2186. Rozemijer, Wouter [corrected to Rozemeijer, Wouter]. PMID: 24520562; PMCID: PMC3884715
56. <https://www.ibl-america.com/content/elisa/IB79811.pdf>