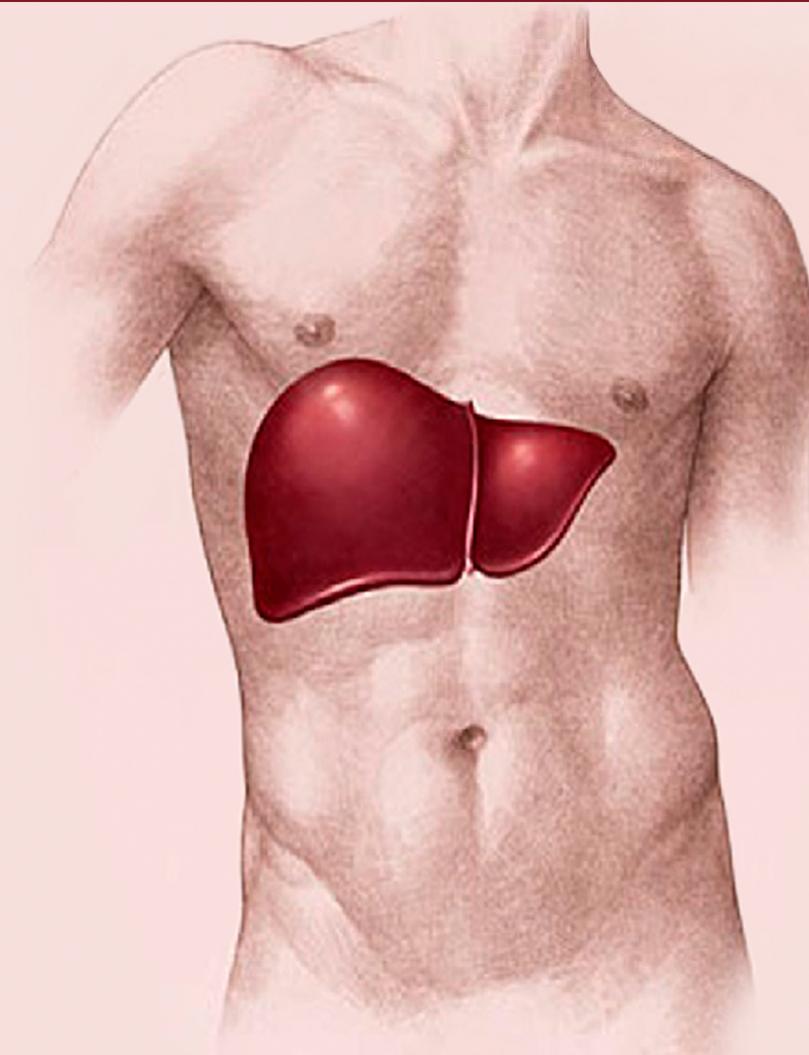


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГБОУ ВО БГМУ МИНЗДРАВА РОССИИ)

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ИММУНОДИАГНОСТИКИ И ПРОФИЛАКТИКИ РЕЦИДИВОВ ЭХИНОКОККОЗА

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ИММУНОДИАГНОСТИКИ И
ПРОФИЛАКТИКИ РЕЦИДИВОВ ЭХИНОКОККОЗА



УФА - 2019

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России)

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ИММУНОДИАГНОСТИКИ
И ПРОФИЛАКТИКИ РЕЦИДИВОВ ЭХИНОКОККОЗА

Монография

Уфа — 2019

УДК 616.995.121

ББК 55.177.4

Н 47

Рецензенты:

Сатаев В.У. – д.м.н., профессор кафедры детской хирургии
с курсом ИПО (sataev.valery@gmail.com)

Мерзликін Н.В. – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой
хирургических болезней с курсом травматологии и ортопедии
ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет»
Минздрава России (nikolai_merzlikin@mail.ru)

Н 47 **Некоторые аспекты иммунодиагностики и профилактики рецидивов эхинококкоза.** / М.А. Нартайлаков, А.С. Ибадильдин, М.И. Лукманов, Д.Ю. Кузьмин. — Уфа: ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, 2019. — 167 с.

ISBN 978-5-907209-02-2

Настоящая монография описывает современные данные об этиологии однокамерного эхинококкоза у человека и дает рекомендации по иммунодиагностике, профилактике рецидива заболевания с учетом международного опыта, адаптированного к национальной системе здравоохранения.

Рекомендовано в печать Координационным научно-методическим советом и утверждено решением редакционно-издательского совета ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России.

УДК 616.995.121

ББК 55.177.4

ISBN 978-5-907209-02-2

© М.А. Нартайлаков, А.С. Ибадильдин,
М.И. Лукманов, Д.Ю. Кузьмин, 2019

© ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, 2019

СОДЕРЖАНИЕ

Перечень сокращений, условных обозначений, символов	6
ВВЕДЕНИЕ	7
1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ ДИАГНОСТИКИ, ЛЕЧЕНИЯ ЭХИНОКОККОЗА И ПРОФИЛАКТИКИ ЕГО РЕЦИДИВА (обзор литературы)	10
1.1. Актуальность проблемы эхинококкоза в России	10
1.2. Проблема эхинококкоза в Республиках Казахстан и Башкортостан ..	12
1.3. Лечение эхинококкоза	12
1.4. Лечение рецидивов эхинококкоза	19
1.5. Профилактика рецидивов эхинококкоза	26
1.5.1. Современное представление об этиологии рецидивов эхинококкоза	26
1.5.2. Профилактика рецидивов эхинококкоза	29
2. МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ЭХИНОКОККОЗА	36
2.1. Инструментальные методы диагностики	36
2.2. Иммунодиагностика эхинококкоза	39
2.2.1. Антигены эхинококка	39
2.2.2. Индикация эхинококковых антигенов	45
2.2.3. Антитела при эхинококке	46
2.2.4. Выявление антител	49
2.2.5. Экспресс диагностика эхинококкоза	51
2.2.6. Методы получения иммуноглобулинов	53
2.2.7. Методы сенсibilизации эритроцитов	54
2.2.8. Морфофизиологические исследования кист	56
2.2.9. Молекулярно-генетические исследования	57
3. ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДИАГНОСТИКИ ЭХИНОКОККОЗА ПО ВЫЯВЛЕНИЮ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ В КРОВИ	61
3.1. Способ отделения жидкой фазы крови от клеток крови	61

3.2. Экспресс-диагностика с помощью реакции агглютинации в капиллярах	64
3.3. Повышение эффективности ИФА в диагностике эхинококкоза	69
4. СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ДИАГНОСТИКИ ЭХИНОКОККОЗА ПЕЧЕНИ, ОСЛОЖНЕННОГО ПЕРФОРАЦИЕЙ В ЖЕЛЧНЫЕ ПРОТОКИ	83
4.1. Получение гипериммунных эхинококковых кроличьих сывороток ..	84
4.1.1. Получение иммунной сыворотки путем последовательной иммунизации кроликов	84
4.1.2. Повышение активности иммунной сыворотки с использованием биоиммуносорбента из протосколексов эхинококковой цисты	88
4.2. Получение антительных эхинококковых ЭД	91
4.3. Оценка эффективности индикации эхинококковых антигенов для диагностики эхинококкоза, осложненного перфорацией в желчные протоки	92
5. МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭХИНОКОККОВЫХ КИСТ	96
5.1. Локализация, количество, размеры и фаза жизнедеятельности кист у больных первичным и рецидивным эхинококкозом печени	96
5.2. Характеристика морфофизиологии кист у больных эхинококкозом печени	98
5.3. Дифференциация рецидивных кист на основе молекулярно-генетического исследования гена <i>cox1</i>	102
6. ПРОФИЛАКТИКА РЕЦИДИВА ОДНОКАМЕРНОГО ЭХИНОКОККОЗА ПЕЧЕНИ	105
6.1. Химиопрофилактика рецидива эхинококкоза печени	105
6.2. Прогнозирование эффективности химиопрофилактики рецидива эхинококкоза печени	111
7. ЛЕЧЕНИЕ РЕЦИДИВОВ ОДНОКАМЕРНОГО ЭХИНОКОККОЗА ПЕЧЕНИ В БЛИЖАЙШИЕ И ОТДАЛЕННЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ	114
7.1. Частота рецидива эхинококкоза печени в зависимости от сроков обнаружения рецидива после хирургического лечения и особенностей течения первичного эхинококкоза	114

7.2. Хирургическое лечение рецидива эхинококкоза печени	117
8. МЕРОПРИЯТИЯ ПО УЛУЧШЕНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ РЕЦИДИВОВ ЭХИНОКОККОЗА ПЕЧЕНИ	122
8.1. Эффективность применения альбендазола для профилактики рецидива заболевания	122
8.2. Разработка нового раствора для обработки эхинококковой полости после эхинококкотомии	125
8.3. Изучение эффективности предлагаемого раствора в клинике	131
9. ОБОБЩЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	138
10. РЕКОМЕНДАЦИИ ДЛЯ ПРАКТИЧЕСКОГО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ	139
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	140

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ

As — антисыворотка

Ig A — иммуноглобулин А

Ig G — иммуноглобулин G

Ig M — иммуноглобулин M

Ag — антиген

АЛТ — Аланинаминотрансфераза

АБЗ — Альбендазол

АБЗ-СД — Альбендазол-сульфоксид

АБЗ-СН — Альбендазол-сульфон

АСТ — Аспаргатаминотрансфераза

At — антитело

ИФА — иммуноферментный анализ

КТ — Компьютерная томография

МРТ — Магнитно-резонансная томография

ОП — оптическая плотность

ПЭП — Первичный эхинококкоз печени

РА — реакция агглютинации

РБ — Республика Башкортостан

РКБ — Республиканская клиническая больница

РЭП — Рецидивный эхинококкоз печени

РИД — реакция иммунодиффузии

РИЭФ — реакция иммуноэлектрофореза

РЛА — реакция латекс-агглютинации

РПГА — реакция пассивной гемагглютинации

УЗИ — ультразвуковое исследование

ЭД — эритроцитарный диагностикум

ЭЖ — эхинококковая жидкость

ЭЭ - Эхинококкэктомия

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Одной из самых распространенных паразитарных инвазий печени, встречающихся в хирургической практике, является однокамерный эхинококкоз. Ежегодно в мире заболевает эхинококкозом 1-200 больных на 100 000 населения (около трех миллионов человек). По данным Роспотребнадзора Российской Федерации (2016) до настоящего времени эпидемиологическая ситуация по эхинококкозам в России остается сложной. Высокий показатель заболеваемости эхинококкозом населения регистрируется на Северном Кавказе, Сибири, Средней Азии и Южном Урале.

В Казахстане, где развито животноводство, эхинококкоз остается распространенным среди сельскохозяйственных животных и человека [15]. Согласно ветеринарной отчетности в РК степень зараженности животных составляет 25-67 %. По данным литературы в Казахстане имеется тенденция ежегодного роста эхинококкоза человека, начиная с 1989 года. Заболеваемость эхинококкозом в южных областях достигает до 12,5 на 100 тыс. населения, по городу Алматы 6,1 на 100 тыс. населения. Смертность людей от эхинококкоза составляет от 2,4 до 6,8 %, инвалидность до 8,7 %, рецидивы наблюдаются у 6,2 – 16,0 % больных. По частоте эхинококкоз в 50 – 73 % случаев поражает печень, которая является первым «фильтром» для онкосферы паразита.

В клиническом течении заболевания различают три стадии: бессимптомную, прогрессирующего роста и осложнений. Общеизвестно, что объем хирургического вмешательства и, в конечном счете, успех оперативного вмешательства во многом зависит от стадии заболевания. Чем раньше поставлен диагноз, тем выше эффективность хирургического лечения. Значительная часть осложнений и рецидивов связана с использованием в хирургии недостаточно эффективных растворов для обработки эхинококковой полости после эхинококкэктомии. А растворов, обладаю-

щих сколексоцидным, дезинфицирующим и противовоспалительным свойством одновременно, в настоящее время нет [3, 12, 17].

В эндемичных районах должно проводиться массовое профилактическое обследование населения на эхинококкоз, однако, высокая себестоимость и труднодоступность ряда инструментальных методов диагностики (УЗИ, компьютерная томография), не позволяют проводить такие обследования, особенно в сельских районах. Кроме того, в ранний период заболевания, часто при рецидивном эхинококкозе или в случае редкой локализации паразита эти методы неэффективны [3, 11].

В связи с особенностями патогенеза эхинококкоза, у многих больных развиваются осложнения [5, 7, 10]. При прорыве эхинококковой кисты в билиарное дерево, когда требуется срочное оперативное вмешательство, клинически поставить правильный диагноз чрезвычайно сложно, даже с помощью инструментальных методов).

Серологические методы диагностики эхинококкоза информативны и отличаются низкой себестоимостью [71, 122]. Однако, не редкость, когда эти реакции дают ложноположительный или ложноотрицательный результат. Во многом это зависит от активности и специфичности используемого эхинококкового антигена, иногда от самой реакции [57, 68, 72]. Изложенное свидетельствует об актуальности проблемы, необходимости разработки алгоритма серологической диагностики для своевременного выявления эхинококкоза печени особенно рецидивного, с наличием кист небольшого размера и формированием цистобилиарного свищей.

Это тяжелое заболевание может осложниться развитием рецидивных кист. Повторные хирургические вмешательства при эхинококкозе отличаются методически и технически значительной сложностью, а в ряде случаев (при множественных и многократных рецидивах) приводят к инвалидности и даже летальному исходу. Широкий диапазон частоты рецидивов (3-54 %) в разных лечебных учреждениях обусловлен множеством

факторов, в том числе патогенностью возбудителя, качеством профилактики и лечения.

До настоящего времени отсутствует единство мнений по вопросам, касающимся этиологии (метастатическая, имплантационная, резидуальная, реинвазивная) рецидива. Достоверного метода определения природы происхождения рецидивных кист на сегодняшний день еще не разработано. Установление же причины развития рецидива будет способствовать правильному выбору тактики хирургического лечения и эффективности профилактики благодаря «адресному» воздействию.

1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ ДИАГНОСТИКИ, ЛЕЧЕНИЯ ЭХИНОКОККОЗА И ПРОФИЛАКТИКИ ЕГО РЕЦИДИВА (обзор литературы)

1.1. Актуальность проблемы эхинококкоза в России

Среди населения мира широко распространен однокамерный (гидатидозный) эхинококкоз, чаще встречаясь в странах Средиземноморья, Средней Азии. Всемирная ежегодная заболеваемость эхинококкозом составляет около трех миллионов больных. Случаи заболевания эхинококкозом населения зарегистрированы в 63 субъектах Российской Федерации (РФ), наиболее эндемичны Дальневосточный, Северо-Кавказский и Уральский регионы, на долю которых приходится около 70 % всех больных (рисунок 1).

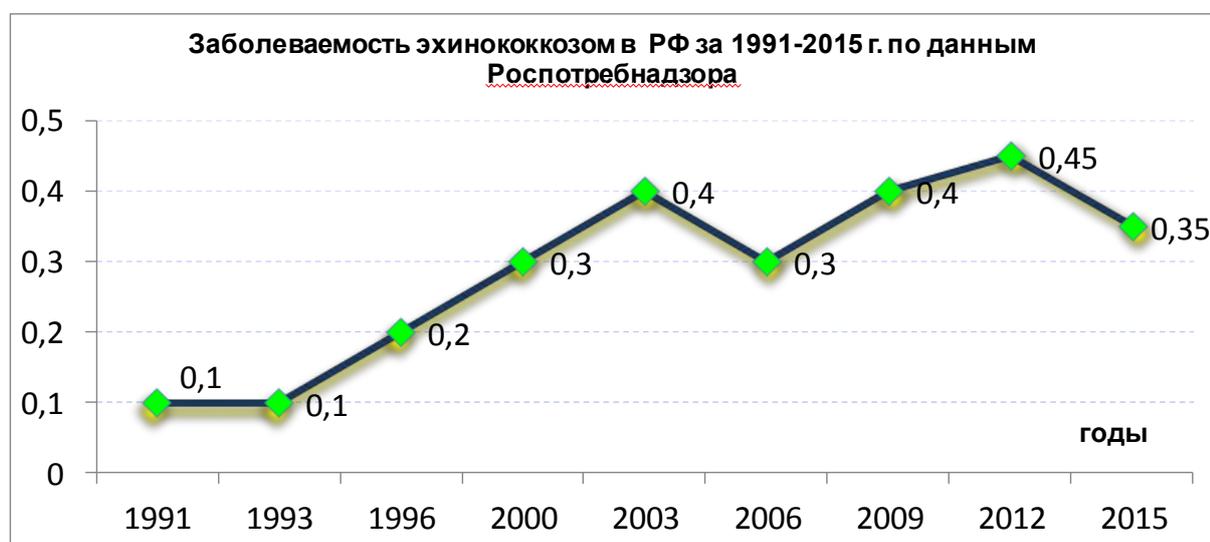


Рисунок 1 – Заболеваемость эхинококкозом в Российской Федерации за 1991 – 2015 годы по данным Роспотребнадзора

Болезнь все чаще стала встречаться в неэндемичных очагах, где врачи не знакомы или малознакомы с основными принципами диагностики эхинококкоза, что нередко приводит к позднему выявлению заболевания и ошибкам в лечении.

С 90-х годов прошлого века в РФ заболеваемость людей эхинококкозом стала чаще регистрироваться, в том числе и благодаря расширению возможностей инструментальной диагностики. По данным Роспотребнадзора в среднем по России заболеваемость эхинококкозом составляла в 1991 г. – 0,1 случай на 100 тыс. населения, 0,3 - в 2006 г., 0,4 - в 2010 г. и 0,3 - в 2015 г., а в ряде регионов было зарегистрировано случаев эхинококкоза в 3-5 раз больше, чем за 2010 год.

Причинами этого являются ухудшение санитарно-эпидемиологического контроля и диспансеризации в эндемичных районах, возросшая миграция населения. Значительно расширился ареал распространения эхинококкоза среди населения России в северном и восточном направлениях. Наибольший рост заболеваемости эхинококкозом населения наблюдается в Поволжье, Сибири, Средней Азии, на Южном Урале. Чаще стали регистрироваться случаи заболевания человека в Северном Кавказе, Закавказье и отдельных районах Восточной Азии.

Истинную распространенность эхинококкоза трудно оценить из-за высокой доли бессимптомных носителей, которые никогда не обращаются за медицинской помощью. Учитывая, что эпидемиология коррелирует с эпизоотологией, можно предполагать действительную инвазированность населения, по данным ветеринарных отчетов. Иммунологические тесты также не полно отражают показатель зараженности населения, поскольку при кистах 1-й фазы жизнедеятельности часто показывают отрицательный результат. Специфические антитела могут сохраняться в сыворотке крови после операции у больных эхинококкозом на протяжении 18 и более лет.

1.2. Проблема эхинококкоза в Республиках Казахстан и Башкортостан

Эхинококкоз — тяжелое паразитарное заболевание человека и животных, довольно широко распространенное во многих районах Республики Казахстан (РК) [15], существуют эндемичные районы, в которых основную роль в поддержании штамма паразита играют дикие животные, прежде всего лисы. Пораженность лис в некоторых эндемичных районах РК превышает 40 % [15]. В Казахстане основная роль в распространении эхинококкоза принадлежит собакам и распространенность его значительная. В некоторых районах Казахстана зараженность поселковых собак составляет 5 – 8 %, а приотарных до 23 % [15]. Республика Башкортостан также является эндемичной зоной для паразитарных заболеваний (эхинококкозы, альвеококкозы), особенно в районах Зауралья и Южного Урала [95, 109, 142].

1.3. Лечение эхинококкоза

Наиболее излюбленной локализацией эхинококкоза является печень. Это связано с путями заражения паразитом и анатомическими особенностями этого органа. По литературным данным, поражение печени встречается в 50 – 85 % случаев [109].

Хирургический метод является единственным в лечении эхинококкоза, но его результаты пока нельзя считать удовлетворительным из-за достаточно большой частоты послеоперационных осложнений, летальности и рецидивов заболевания. В связи с особенностями патогенеза, эхинококкоз диагностируется поздно, когда почти у половины больных развиваются осложнения. Среди многочисленных осложнений эхинококкоза печени наиболее часто встречаются нагноение содержимого кисты, билиарные осложнения и обызвествление стенок [104, 108]. В структуре осложнений особое место занимают билиарные осложнения, возникаю-

щие между паразитарной кистой и желчными путями печени. Согласно литературным данным, частота их возникновения составляет 5 – 18 % случаев [105, 110]. Такие осложнения как — нагноение, перфорация кист или спонтанная диссеминация паразита, отрицательно влияет на результаты хирургического лечения.

Хирургическое лечение эхинококкоза легких дает 13,3 % осложнений, 4,5 % летальности, 3,5 % рецидивов [106, 108]. Частота послеоперационной летальности колеблется от 1,4 % до 12,9 % [78, 103]. При других локализациях паразита рецидивы заболевания встречаются даже чаще, от 2 % до 22 % и 54 % [78, 105, 110].

В настоящее время, единственным радикальным способом лечения эхинококкоза и его рецидивов является пока хирургический. Он прошел большой путь не оправдавшихся надежд и ошибок от пункции кист, инъекций в кисты антисептиков, марсупиализации, «закрытой» эхинококкэктомии до капитонажа остаточной полости, идеальной эхинококкэктомии и анатомической резекции пораженных органов [101, 106, 109].

В хирургии эхинококкоза печени и легких до сих пор отсутствует единая методика удаления паразита и обработки остаточной полости. Наиболее часто применяемым хирургическим вмешательством является эхинококкэктомия.

Эхинококкэктомия выполняется открытым или закрытым (с вскрытием или без вскрытия кисты) путем. После этого возникает проблема устранения остаточной полости. Решается она по-разному – ушивание (после заполнения 0,85 % раствором хлорида натрия, раствором новокаина) наглухо, устранением или уменьшением после вворачивания краев свободной фиброзной капсулы, введением в полость сальника на ножке, ушиванием просвета кетгутовыми швами, склеиванием стенок медицинским клеем, полным или частичным иссечением фиброзной капсулы [84, 89, 97, 100, 101]. Учитывая опасность диссеминации зародышевых элементов, следует признать, радикальными лишь те способы удаления пара-

зита, которые не связаны с вскрытием просвета кисты [81, 88]. К этой же категории относится резекция или удаление пораженного органа с неповрежденной кистой, но показания к подобным операциям довольно ограничены и чаще используются варианты пособий, связанные с открытой эхинококкэктомией, ликвидацией остаточной полости или ее наружным дренированием.

Новым направлением в хирургии эхинококкоза является лапароскопическая эхинококкэктомия. Быстрое развитие эндовидеохирургических технологий позволяет значительно расширить перечень хирургических вмешательств, выполняемых малоинвазивным способом. Интерес к применению лапароскопической техники при эхинококкозе печени вызван тем, что традиционные вмешательства сопровождаются тяжелой операционной травмой и длительной реабилитацией пациентов [95, 109, 116].

Но у этой методики имеются строгие показания. Помимо размеров кист (до 10 см) и их доступной локализации (сегменты печени III, IV, V, VI, частично VII), важным в плане эффективной пункции и эвакуации содержимого гидатидной кисты является период жизнедеятельности паразита. Для лапароскопического лечения отбирали больных с эхинококкозом печени в первом периоде жизнедеятельности (живой паразит) по М.Ю. Гилевич и соавт. [46, 47]. Противопоказаниями к этой операции считали большие и гигантские размеры кист, внутripеченочное их расположение, поддиафрагмальную локализацию кист, рецидивный эхинококкоз, второй (мертвый паразит материнской гидатиды) и третий (осложненный эхинококкоз) периоды жизнедеятельности паразита.

Имеются также и ряд осложнений. Основным возможным осложнением лапароскопической эхинококкэктомии печени является истечение содержимого кисты в свободную брюшную полость. Обязательно подведение к зоне пункции эхинококковой кисты отсосной трубки. Перед пункцией зона операции должна быть обложена марлевыми салфетками, смоченными антипаразитарными препаратами. Если надежные пункци-

онные устройства отсутствуют, от лапароскопической операции следует воздержаться.

Важное значение имеет характер содержимого кисты. Сочетание УЗИ с КТ при до операционном обследовании позволяет отбирать больных с эхинококкозом в первой фазе жизнедеятельности паразита. Как известно, при этом в кисте нет дочерних пузырей, жидкость светлая и прозрачная. Максимальный диаметр кист не должен превышать 8-10 см, особенно на этапе освоения методики

Несмотря на достигнутые успехи в хирургическом лечении этой патологии, эхинококкоз, до настоящего времени, остается сложной проблемой. Подтверждением этому является большое число послеоперационных осложнений и значительная частота рецидивов заболевания, составляющая 3,3 – 54 % [49, 116].

В последнее время под сомнение было поставлено положение о том, что протосколексы являются основной причиной рецидивов [66, 67]. Полагают, что основными зародышевыми элементами, ответственными за рецидив эхинококкоза, следует считать, видимо, мелкие ацефалоцисты паразита, которые более устойчивы к воздействию неблагоприятных внешних факторов, чем свободные протосколексы. Различные подходы к оперативному лечению эхинококкоза объяснялись отношением к возможности присутствия в толще фиброзной капсулы зародышевых элементов эхинококка. Одни авторы находили в толще фиброзной капсулы зародышевые элементы в виде *заноз* или свободные протосколексы в полости капсулы, на основании чего рекомендовали удаление паразитарной кисты вместе с фиброзной капсулой [66, 67, 118]. Другие отрицали возможность нахождения протосколексов в ней и проводили менее травматичные операции с оставлением фиброзной капсулы. Однако рецидивы заболевания наблюдались независимо от типа проведенной операции.

В. И. Русаков и М. Ю. Гилевич провели комплексное исследование кутикулярной оболочки капсулы у 164 больных эхинококкозом различной

локализации на наличие зародышевых элементов эхинококкоза [67]. В результате проведенной работы, авторы пришли к выводу, что у живого паразита кутикулярная оболочка является непроницаемой для протосколексов, в то время как после гибели паразита происходит обсеменение полости фиброзной капсулы живыми протосколексами. На основании результатов своих исследований авторы делают вывод о том, что при локализации кист в периферических частях органа при погибшей кисте более целесообразно применение расширенных хирургических вмешательств с удалением фиброзной капсулы. Однако большинство авторов отмечают, что на частоту возникновения рецидивов эхинококкоза влияет не метод операции, а тщательность ее выполнения. Важной проблемой являются поиски способов эффективной антипаразитарной обработки остаточных полостей в печени при открытой эхинококкэктомии, поскольку применяющиеся методы химической санации обладают общеизвестными недостатками.

Под принципом антипаразитарности в хирургии эхинококкоза понимается комплекс мероприятий, проводимых во время операции с целью обезвреживания зародышевых элементов паразита (протосколексов, мелких дочерних кист) в материнской кисте, попавших на поверхность пораженного органа, соседние органы, в рану, на операционное белье и т.д.

Принцип антипаразитарности эхинококкэктомии предполагает применение во время операции как химических, так и физических воздействий с целью обезвреживания зародышевых элементов паразита. Необходимость обработки может возникнуть на любом этапе оперативного вмешательства. В особенности при перфорации кист с обсеменением органов и серозных полостей. По данным литературы, чаще всего рецидив гидатидной кисты или обсеменение серозных поверхностей органов возникает вследствие технических ошибок или трудностей в процессе оперативного вмешательства. Ю.В. Левин при анализе историй болезни 18 больных с рецидивами эхинококкоза установил, что у 11 из них, в про-

шлом, имел место спонтанный разрыв кисты, а у 7 вторичный эхинококкоз, обусловленный, по-видимому, обсеменением зародышевыми элементами паразита, в процессе оперативного вмешательства.

Для интраоперационного применения были испытаны сколексоцидные препараты: 10 %-йодоформно-глицериновая эмульсия, 5-10 % водные растворы формалина, 2,5 – 5 % растворы формалина в глицерине, 5 % настойка йода, эфир для наркоза, риванол в разведении 1/1000, различные антибиотики.

По действию на протосколексы и микроскопические ацефалоцисты эхинококковой кисты все средства антипаразитарной обработки можно подразделить на две основные группы: в основе первой группы находится химическое, фармакологическое воздействие, а второй – температурный фактор. Некоторые применяемые средства и способы для обработки полости органа после эхинококкэктомии имеют недостатки. Так, обработка полости формалином оказывает токсическое и рефлекторное, вагусное действие на детей, а сколексы эхинококка достаточно долго сохраняют жизнедеятельность. М.С.Galand et al. описал семь случаев шока после применения раствора формалина, приведших больных к смертельному исходу. Имеются также сведения о невысокой эффективности формалина, используемого в качестве сколексоцида. По данным Ю. А. Волоха [42], после обработки содержимого эхинококковой кисты 3 % раствором формалина в глицерине в течение 2 – 3 минут в 10 из 12 кист обнаружены живые протосколексы. Йод также недостаточно эффективен в качестве сколексоцидного препарата, кроме того, он обладает аллергическим действием. С целью его нейтрализации и устранения сенсibiliзирующего влияния применяют тиосульфат натрия. Одним из существенных недостатков химических средств, применяемых для обеззараживания зародышевых элементов эхинококка, является недостаточная их надежность, обусловленная снижением концентрации агента до неэффективности, вследствие их разведения тканевой жидкостью. Криовоздействие и дей-

ствие высокой температуры сопряжены с повреждением тканей больного [116]. Обработка остаточной полости фиброзной капсулы растворами антисептиков, нагретых до 60-70 градусов, предложенная Акматовым Б.А. имеет ряд существенных недостатков. Этот метод сопряжен с неудобством термостатирования и использования горячих растворов во время сложных полостных операций, особенно при множественных формах эхинококкоза, а также связан с возможностью ожогов органов и тканей оперируемого больного через тонкую фиброзную капсулу обезвреживаемых эхинококковых кист (в легких, головном мозгу), или при случайной разгерметизации системы для перфузии горячих растворов.

Низкочастотный УЗ пригоден для обеззараживания эхинококковых кист диаметром 12 – 15см, имеющих правильную округлую форму, часто встречающихся в легких. УЗ недостаточно эффективен при обработке остаточных полостей печени, что связано с большими размерами, неправильной конфигурацией при вскрытии рядом расположенных кист, в результате чего не всегда обеспечивается одно из основных условий губительного действия УЗ на зародышевые элементы паразита – полное перемешивание жидкой фазы под влиянием этого агента [17, 69, 101]. Еще одним ограничением для использования УЗ в хирургии эхинококкоза органов брюшной полости является неудобство подведения УЗ-волновода к гидатидной кисте при поддиафрагмальной локализации и глубоком внутриорганном расположении паразита.

В связи с этим, невозможно обрабатывать все стенки полости расфокусированными лучами лазера [121]. Использование рентгеновских и кварцевых лучей, УВЧ, СО₂-лазера для интраоперационного обезвреживания зародышевых элементов эхинококка не получили широкого применения из-за отсутствия экспериментального обоснования и дороговизны специального оборудования.

Т.о. хирургический метод является единственным в лечении эхинококкоза, но его результаты нельзя считать удовлетворительными из-за до-

статочной частоты послеоперационных осложнений, летальности и рецидивов заболевания. Во многом, высокий процент осложнений и рецидивов объясняется использованием неэффективных сколексоцидных препаратов для обработки остаточной полости эхинококковой цисты после эхинококкоэктомии. Необходим эффективный и надежный препарат, обладающий одновременно противопаразитарной и антибактериальной активностью.

1.4. Лечение рецидивов эхинококкоза

Основной метод лечения как первичного, так и рецидивного эхинококкоза печени – хирургический. Оперативное вмешательство в различных модификациях применяется более чем у 90 % всех больных эхинококкозом печени [35, 36, 229]. В то же время в практической медицине могут придерживаться подхода «Watch and Wait» (наблюдать и ждать) при неактивных малых эхинококковых кистах, поскольку 18 – 20 % из них могут оставаться стабильными в течение долгого времени без какого-либо лечения [203, 207, 212].

Этот подход опирается на наблюдении, что кисты при однокамерном эхинококкозе проходят неоднозначный путь развития в течение месяцев или лет и прогнозировать который пока еще не получается. Выжидательная тактика, например, рекомендуется для бессимптомных кист СЕЗb (по ВОЗ) [207]. Учитывается также тот факт, что при кистах печени менее 5 см, расположенных в глубине паренхимы традиционная оперативная техника сопряжена с большим риском развития осложнений.

Выбор показаний, характер и объём операции, способ обработки кисты, необходимость дренирования, способ ликвидации остаточной полости остаются предметом дискуссии [65, 78, 79, 161, 201]. Следует отметить, что ни при одном очаговом заболевании печени не было предложено такое количество различных видов операций, как при эхинококкозе печени. До середины 90-х годов преимущественно в лечении рецидива эхино-

коккоза печени (РЭП) в основном применяли традиционные хирургические вмешательства:

- одномоментное удаление эхинококковой кисты без вскрытия просвета кисты - идеальная эхинококкэктомия;
- эхинококкэктомию с ликвидацией полости кисты методом капитонажа - закрытая эхинококкэктомия;
- эхинококкэктомию с капитонажем или тампонадой полости кисты сальником и оставлением дренажа в ней - полужакрытая эхинококкэктомия;
- одномоментную эхинококкэктомию с частичным или тотальным иссечением фиброзной капсулы – перицистэктомию;
- резекцию печени вместе с эхинококковыми кистами.

В настоящее время продолжают использовать традиционные эхинококкэктомии с лапаротомией, а также применяют резекции печени, лапароскопические эхинококкэктомии и чрескожные пункционно-дренирующие методы [4, 116, 242, 243]. Традиционная эхинококкэктомия (с лапаротомией, со вскрытием полости кисты, последующим удалением оболочек и противопаразитарной обработкой капсулы) - самая распространенная в эндемичных по эхинококкозу регионах, доступная широкому кругу хирургов. Но по непосредственным и отдаленным результатам ее не все считают эффективной в отношении рецидивов [239, 240].

Мнение многих специалистов сходится к тому, что основным путем снижения частоты рецидивов эхинококковой болезни следует считать выполнение закрытой эхинококкэктомии, когда киста удаляется без её пункции и вскрытия [86, 123]. Открытую эхинококкэктомию при первичном эхинококкозе печени (ПЭП) выполняют в исключительных случаях, когда киста печени имеет центральную локализацию, либо при тяжелом состоянии больного, в старческом возрасте [214]. При закрытой эхинококкэктомии рецидив заболевания отмечен в 3 % наблюдений, а при открытой эхинококкэктомии — 18 % [81, 86, 123]. Частота послеоперационных

осложнений после традиционных операций составляет 6 – 80 %, а летальность 3 – 8 % [126, 205].

После обнаружения факта миграции зародышевых элементов в перикистозные ткани, хирурги стали пересматривать хирургическую тактику при эхинококкозе печени в пользу перицистэктомии [135]. Хотя перицистэктомия довольно сложна, все авторы отмечают значительное снижение количества послеоперационных осложнений. Перицистэктомию применяют при краевом расположении кист и отсутствии их контакта с крупными сосудисто-секреторными элементами [18, 19]. В ряде клиник количество перицистэктомии составляет 6 – 35 % от всех выполненных операций по поводу эхинококкоза печени [240].

Доказано, что традиционная эхинококкэктомия чаще сопровождается послеоперационными осложнениями (в том числе рецидивами заболевания), а радикальная (тотальная перицистэктомия или резекция печени) более эффективна в отношении профилактики рецидивов, но характеризуется большим числом интраоперационных осложнений [154, 186, 239].

Резекцию печени, выполненную без вылущивания кисты («идеальная» резекция), считают наиболее радикальной операцией, эффективной в отношении рецидивов и различных осложнений в послеоперационном периоде [6, 220, 241]. Анализ 478 публикаций о результатах лечения 1267 больных эхинококкозом печени, проведенный He Y. et al. (2015) показал, что после радикальных операций существенно ($p < 0,0001$) реже возникают рецидивы, чем после традиционной хирургии [174].

Резекция печени не так давно используется для хирургического лечения эхинококкоза, и показания к ней сужены из-за высокой послеоперационной летальности. В настоящее время летальность при выполнении обширных резекций печени по отводу эхинококкоза варьирует в пределах 2,4 – 10 % [6, 220]. Наблюдается определенная тенденция к предпочтению резекций в оперативном лечении эхинококкоза печени, как за рубежом, так и в России [135, 240, 241, 246]. Значение имеет то, что при анатомиче-

ской резекции печени отсутствует проблема остаточной полости, являющейся причиной многих осложнений в ближайшем и отдаленном послеоперационном периоде. Рецидивные кисты печени удаляют в основном с использованием резекционных вмешательств [163]. Резекции печени противопоказаны при локализации кисты в области кавальных и глиссоновых ворот (задние отделы VIII и IV сегментов) [19]. При интрапаренхимальных локализациях эхинококковых кист наиболее часто используемыми операциями являются закрытая эхинококкэктомия и оментопластика [206]. В то же время ряд авторов считают, что хирургическое вмешательство при эхинококкозе печени должно основываться на органосохраняющих принципах [62, 197], в том числе и потому, что нельзя исключить возможность резидуальных кист и необходимости повторной операции.

Перспективным является использование криохирургии для лечения очаговых поражений печени, в том числе при эхинококкозе [69]. Установлено, что криодеструкция ведет к гибели паразитарных элементов и предупреждает рецидивы [69].

Научные достижения последних лет изменили требования к выбору метода лечения больных эхинококкозом. Выбор доступа и типа операции теперь чаще осуществляют с учетом локализации и размеров кист, наличия осложнений [164, 247]. Для эхинококкоза печени свойственно многообразие локализации, размеров и поэтому не может быть универсального оперативного доступа. Наиболее часто применяют доступ по правому подреберью по С.П. Федорову [62, 103, 142]. Например, при локализации кист в VII – VIII сегментах, спаянных с диафрагмой и при больших размерах, реже стали применять торакальный доступ, чаще - абдоминальный в правом подреберье по Федорову. При локализации кист в зоне I, II, III сегментов чаще применяют верхнесрединный доступ [2, 142].

Нет полной ясности и в отношении тактики ликвидации остаточной полости после эхинококкэктомии. Капитонаж и тампонирование полости кисты раньше не редко применяли. Марсупиализацию в различных моди-

фикациях ряд авторов считали самым малотравматичным вмешательством. Этот подход в настоящее время не имеет широкого применения среди хирургов, что обусловлено рядом недостатков: медленной облитерацией остаточной полости; вероятностью развития кровотечения в раннем и отдаленном послеоперационном периоде; формированием желчных свищей; риском рецидива; вероятностью развития послеоперационной грыжи [101, 119].

В последнее десятилетие стали шире применять минимально инвазивные методы хирургического лечения эхинококкоза [36, 38, 76, 80]. Первые чрескожные операции по поводу эхинококкоза печени в России были успешно проведены в 1986 г. в г. Москве А.Н. Лотовым и независимо от него А.В. Гаврилиным. Несмотря на мнение, что эти вмешательства просты в исполнении, они могут дать серьезные интра- и послеоперационные осложнения (анафилактические реакции) [119]. Поэтому эти типы вмешательств ограничены критериями строгого отбора и выполняются в специализированных отделениях [40]. Абсолютным противопоказанием является локализация кист в VII и I сегментах, относительным - центральное расположение кисты, размер более 10 см, наличие дочерних пузырей, утолщенные и кальцинированные стенки [199, 214].

Показаниями для лапароскопической эхинококкэктомии являются: солитарные, небольшие и поверхностно расположенные кисты печени [179]. Осложненные и множественные кисты печени также отнесли к противопоказаниям лапароскопической эхинококкэктомии [35, 117]. Считается возможным и целесообразным применение миниинвазивных хирургических методов к наиболее тяжелой группе пожилых больных эхинококкозом, при сложной анатомической локализации [130, 144]. Их выполняют в два этапа: с предварительной чрескожной пункцией и противопаразитарной обработкой кисты с последующей лапароскопической эхинококкэктомией. Ряд авторов, проанализировав опыт проведения минимально инвазивных операций ряда ведущих клиник России, обозначили

их как метод выбора в лечении больных эхинококкозом [35, 86, 119, 134]. Однако, несмотря на преимущества чрескожных вмешательств, они еще далеки для широкого применения из-за опасных осложнений (например, анафилаксии) [194]. ВОЗ рекомендует в основу лечебной стратегии при эхинококкозе печени положить радикальные методы операций. В то же время ряд клиник относят традиционные радикальные методы (перицистэктомии, резекции) к целесообразным, лишь при выявлении экзогенной пролиферации кист и при массивном кальцинозе фиброзной капсулы [37, 229].

Исследования показывают, что частота рецидива болезни после чрескожных вмешательств и перицистэктомии практически одинаковы [254]. Но не все согласны с тем, что традиционное лапоротомное вмешательство у больных с эхинококкозом печени уступает по эффективности чрескожным методам и поэтому часто опытные хирурги предпочитают его [163, 220].

Есть мнение, что методы чрескожной эхинококкэктомии в сочетании с химиотерапией альбендазолом являются безопасными и эффективными для лечения неосложненного эхинококкоза печени [154, 188, 229, 244]. Например, пункционно-аспирационный метод (PAIR — puncture, aspiration, injection, reaspiration), разработанный Бен Амор и др., популярен в ряде клиник при лечении солитарных неосложненных кист [197, 208, 239]. Но при PAIR кисты типа CE2 и CE3b дают часто рецидивы [159]. Чрескожное дренирование используют даже при наличии дочерних пузырей [164]. Единственным противопоказанием к чрескожной эхинококкэктомии считают выход зародышевых элементов за пределы фиброзной капсулы (экзогенное почкование), поскольку нет возможности воздействовать на них гермицидом и это приводит к рецидиву болезни [36]. Как показывают обзоры литературы частота рецидива при чрескожной эхинококкэктомии зависит от фазы развития кисты [207]. К еще одной проблеме чрескожной эхинококкэктомии относят цистобилиарные свищи,

которые могут развиваться у 73 – 90 % пациентов с эхинококковыми кистами диаметром более 7,5 см [197, 216, 241].

Наблюдавшееся в первое время увлечение лапароскопической технологией при эхинококкозе печени за рубежом и в России снизилось. Обусловлено это недостатком опыта таких вмешательств, из-за строгого отбора контингента для таких операций, а также более частым развитием рецидивов [199, 229]. В то же время есть мнение, что лапароскопическая эхинококкэктомия печени, при соблюдении показаний, не уступает по ближайшим и отдаленным результатам традиционному лапаротомному вмешательству и дает небольшое число рецидивов [89, 177, 193, 198, 200].

К показаниям для применения видеоэндохирургической технологии относят неосложненные эхинококковые кисты печени в зонах хорошего обзора, не глубоко залегающие в паренхиме печени, среднего размера, с отсутствием признаков нагноения и прорыва [48, 56, 118].

Таким образом, на основании анализа литературы (обзоров и опубликованных результатов многочисленных исследований) выявлено, что в лечении ПЭП и РЭП [174, 203, 211, 229]:

- при малых (<5 см) солитарных кистах в фазах СЕ1, С3а, С4 и С5 (по ВОЗ), используется подход «Watch and Wait» («наблюдать и ждать») и, как правило, они хорошо поддаются химиотерапии (альбендазола с празиквантелем);
- средние и большие неосложненные кисты лечатся преимущественно сочетанием чрескожной эхинококкэктомии с до и после операционной химиотерапией;
- традиционное хирургическое вмешательство применяют при гигантских кистах (> 10 см), осложнениях и труднодоступных локализациях;
- при множественных кистах, подозрении на обсеменение зародышевыми элементами эхинококка, применяют радикальные операции.

Необходимо учитывать, что эхинококкэктомии, особенно рецидивных кист — это сложные оперативные вмешательства, поэтому опыт и квалификация хирурга имеют существенное значение [163, 175].

1.5. Профилактика рецидивов эхинококкоза

1.5.1. Современное представление об этиологии рецидивов эхинококкоза

Данные зарубежных и отечественных публикаций показывают, что среди хирургов нет единого мнения в определении этиологии рецидива эхинококкоза. В практическом здравоохранении рецидивом называют повторное развитие кист любой этиологии после оперативного лечения первичного эхинококкоза [22, 23].

Согласно литературных данных развитие рецидива эхинококкоза может быть связано с несколькими причинами [205]. По мнению T.N. Robinson и соавт. (2005), рецидив неизбежен у 3/4 пациентов через 41 ± 17 месяцев после удаления доминирующей кисты [230]. Возникновение рецидивов Акматов Б.А. (1988), Червинский А.А. (1990) связывают с несовершенством оперативного вмешательства (выбор антипаразитарного агента, способ обработки полости, метод операции и др.) [41, 129]. В то же время отмечают достаточно высокую частоту рецидивов, несмотря на радикализм применяемых операций [36, 37]. Есть работы демонстрирующие отсутствие прямой зависимости частоты рецидивов от тактико-технических аспектов операции [143]. Выявлена малая зависимость трансформации зародышевых элементов в новые кисты от возраста и пола пациента, факторов специфической и неспецифической защиты [24, 25]. Есть мнение, что на течение эхинококкоза влияют генетические факторы [27].

Существует несколько гипотез, объясняющих развитие послеоперационных рецидивных эхинококковых кист в организме человека.

Наибольшее значение в патогенезе рецидивов придают следующим фактам [23, 25, 87]:

- ларвоцисты эхинококка способны к экзогенному почкованию, при котором зародышевые элементы мигрируют через хитиновую оболочку и фиброзную капсулу в перикистозные ткани (метастазирование);
- протосколексы и микроацефалоцисты способны приживаться, попадая в ткани после операции или прорыва кисты (имплантация);
- доминирующая киста может подавлять рост других кист и после ее удаления начинается развитие резидуального рецидива;
- не исключается вероятность реинвазии из-за отсутствия устойчивого иммунитета к эхинококку.

В результате в организме человека могут развиваться метастатические (при миграции протосколексов), имплантационные (при диссеминации зародышевых элементов во время операции), реинвазивные (возникающие при повторном заражении), резидуальные (не распознанные из-за неравномерного развития кист при сочетанном и множественном эхинококкозе) по природе происхождения рецидивные кисты [23].

Доказательством способности протосколексов и микроацефалоцист к имплантационной приживаемости служат многочисленные клинические наблюдения: развитие кист в послеоперационном рубце, диссеминированные формы поражения после прорыва кист в брюшную и плевральную полости и др. [89]. Наиболее устойчивыми к химическому обеззараживанию и поэтому самым важным фактором в возникновении послеоперационных рецидивов заболевания считают микроацефалоцисты [25, 119]. Было установлено массовое формирование микроскопических ацефалоцист из герминативных клеток ножки протосколекса у эхинококка по типу альвеококка [25, 67]. Для интраоперационной обработки были разработаны высокоэффективные гермициды, губительные именно для ацефалоцист эхинококка. Наиболее надежными и пригодными для практического при-

менения оказались 80 – 100 % глицерин и 30 % раствор хлорида натрия [19, 120].

Есть мнение, что при эхинококкозе, в условиях соблюдения принципов апаразитарности и антипаразитарности хирургического вмешательства, ведущее значение в патогенезе рецидива болезни приобретает развитие мелких не диагностируемых резидуальных кист [40]. Одним из механизмов множественного поражения, а также развития резидуального рецидива эхинококкоза, является образование кист из зародышей материнской кисты при инфильтративном росте, экзогенная пролиферация зародышевых элементов встречается в 4,3 % наблюдений [67]. Много дискуссий по поводу возможности развития рецидивов из зародышевых элементов первичной кисты эхинококка, внедренных в фиброзную капсулу и перикистозную ткань. Убедительных доказательств выхода зародышевых элементов эхинококка за пределы фиброзной капсулы, что оправдывало бы применение радикальных перикистэктомий и резекций органа, пока нет. Об этом же свидетельствуют и результаты исследований, в которых на большом количестве материала показано, что частота рецидива одинакова как при закрытых эхинококкэктомиях, чрескожных вмешательствах, так и при применении перикистэктомий и резекций органа [195, 254]. В то же время обнаруживали жизнеспособные протосколексы, внедренные в фиброзную капсулу [50, 67]. Однако, обнаружение значительной частоты рецидивов эхинококкоза в удаленных от первичного очага сегментах органа (43,4 %) и даже поражение другой доли печени рецидивом (20 %) ставит под сомнение роль миграции зародышей через фиброзную капсулу [129, 220].

Исследования последних лет показывают, что рецидивы чаще наблюдаются при осложненном эхинококкозе, при мёртвых или нагноившихся кистах, когда деструкция кутикулярной оболочки создает условия для миграции зародышей в печень [18, 92, 113]. При первично-

множественном поражении эхинококкозом с диаметром кисты более 5 см, также возрастает риск развития рецидивов [92, 113].

На основании лабораторных и патоморфологических исследований было установлено, что при живом паразите кутикулярная оболочка является непроницаемой для протосколексов в полость фиброзной капсулы. Гибель материнской кисты приводит к разрушению кутикулярной оболочки и сопровождается обсеменением фиброзной капсулы и риском распространения зародышей гематогенным и лимфогенным путями.

Есть работы, в которых признают значительную роль повторного заражения в развитии рецидивов болезни [40]. В то же время есть мнение, что вероятность развития рецидива в связи с реинвазией эхинококка незначительна (0,04 %), поскольку степень реализации инвазии низка [24].

В хирургии эхинококкоза было выделено новое понятие - «поздние» рецидивы заболевания. Поздние рецидивы эхинококкоза отличаются от ранних рецидивов клинически более тяжелой формой заболевания преимущественно с мертвым паразитом (89,7 %) в различных стадиях постсмертных изменений средних и больших (43 %) размеров. Большая часть поздних рецидивов (82,9 %) диагностировалась в сроки 10-30 лет после первой операции [133]. Поздние рецидивы заболевания после хирургического лечения были диагностированы У.Ш. Хушвактовым (2012) у 32 % больных с рецидивами заболевания, чаще всего они локализовались в печени (63,3 %), брюшной полости (14,5 %), легких (2,6 %) [133]. Ранние рецидивы заболевания в сроки от 7 до 24 месяцев после операции имели размеры в среднем 4,8 см и соответствовали, как правило, СL-типу по классификации ВОЗ [90].

1.5.2. Профилактика рецидивов эхинококкоза

Проблема недостаточной эффективности профилактики рецидива эхинококкоза стоит перед здравоохранением не только России, но и других стран. Применение эффективных гермицидов, соблюдение техники

операции, использование совершенного инструментария не исключают возможности рецидива эхинококкоза [119]. Считается, что значительный вклад в частоту РЭП вносят такие причины, как: первично – множественное поражение, осложнения первичной кисты (разрыв с обсеменением, выход зародышевых элементов из-за нарушения целостности оболочки), неадекватное соблюдение принципов апаразитарности и антипаразитарности во время первичной операции [36]. До сих пор не разработаны прогностические критерии, определяющие полное излечение и отсутствие риска развития рецидива [170].

Предложено несколько способов деструктивного воздействия на внутреннюю поверхность кисты: дезэпителизация при помощи электрокоагуляции в режиме спрей, аргон-усиленной коагуляцией, криовоздействием, расфокусированным лучём лазера [108, 142]. Применение плазменных технологий при эхинококкэктомии позволило существенно улучшить результаты хирургического лечения эхинококкоза печени: послеоперационные осложнения снизились с 36,0 % до 11,5 %, рецидивы заболевания - с 15 % до 1,3 % [52, 95, 108, 109].

В то же время есть мнение, что физические методы дезэпителизации (электро- и аргон-усиленная коагуляция, лазерная деструкция, криодеструкция фиброзной капсулы) не обеспечивают равномерного воздействия по площади и глубине, сохраняя риск рецидива и повреждения прилежащих к стенке кисты сосудов и желчных протоков [115]. Кроме того, воздействие лазером требует специализированного и дорогого оборудования, что существенно сокращает перспективы их использования в общей хирургической практике.

Большинство из применяемых в хирургической практике средств для антипаразитарной обработки полости фиброзной капсулы обладают серьезными недостатками: высокой токсичностью, прижигающим и раздражающим действием на ткань печени [17, 19]. Наиболее пригодными для практического применения считают 0,04 % хлоргексидина биглюко-

ната, 80-100 % глицерин, 30 % раствор хлорида натрия, 3 % перекись водорода, 1-2 % раствор альбендазола в димексиде, различные масла (например, эфирное из растения *Myrtus communis*, персиковое масло) [173, 190, 222, 234]. Глицерин действует как в полости кисты, так и в зоне 8-12 мм за фиброзной капсулой, но только после 5-6 часов после экспозиции [1]. Обработка декасаном, декамектоксином показала хорошие результаты [9, 11, 92].

Доказано, что курсы специфических противопаразитарных препаратов строго обязательны для предупреждения рецидива болезни, даже после идеально выполненной операции. Эти положения закреплены в резолюции конгресса Ассоциации хирургов-гепатологов России и стран СНГ в 2014 г. Описано много схем медикаментозного воздействия на эхинококкоз. С момента внедрения химиотерапии в комплекс послеоперационной реабилитации частота рецидивов эхинококкоза сократилась [85, 129, 202]. По мнению ряда авторов эффективность профилактики рецидива увеличивается, если химиотерапию проводить не только после хирургического удаления, но и за 1-4 недели перед операцией [34, 152, 176, 231].

Для профилактики рецидива эхинококкоза используют препараты группы карбаматбензимидазолов [157, 249]. В то же время анализ 30-летних результатов химиотерапии эхинококкоза карбаматбензимидазолами в 6 клинических центрах 5 европейских стран (Италия, Болгария, Румыния, Греция, Турция) показал их невысокую эффективность: 40 % кист, считавшихся погибшими, через 2 года после лечения вновь становились активными [139, 248]. В настоящее время еще нет единства во мнениях по таким вопросам, как дозы, схемы, длительность химиолечения и химио-профилактики. Ведутся исследования эффективности комбинированной медикаментозной терапии (альбендазола с празиквантелом или в сочетании с нитазоксанидом) [215, 228, 232, 248].

Наиболее эффективным и общепринятым препаратом, используемым для профилактики рецидивов эхинококкоза, признан альбендазол

[26, 131, 155, 221, 232]. Его стали применять для лечения в 1983 году. Доказано, что этот препарат вызывает гибель протосколексов материнской кисты [189], но не полностью эффективен в искоренении зародышей дочерних кист [231]. Внутрикистозная концентрация альбендазол-сульфоксида существенно отличается в зависимости от локализации, фазы жизнедеятельности кисты и у разных индивидуумов [192, 209].

Основной механизм действия альбендазола на гельминтов обусловлен ингибированием полимеризации бета-тубулина, и последующей деструкцией цитоплазматических микроканалцев в клетках их кишечного тракта [73]. Этот препарат изменяет течение биохимических процессов, подавляет утилизацию глюкозы, блокирует передвижение секреторных гранул и других органелл в мышечных клетках червей. Альбендазол вызывает дегенеративные изменения в кистах [171, 172, 176, 207]. По рекомендации Всемирной организации здравоохранения, для снижения опасности развития вторичного эхинококкоза необходимо назначение альбендазола до операции, а также в течение 2 последующих лет. Результаты химиотерапии они оценивали по картине УЗИ (ВОЗ, 1983 г.) как:

- успешное (значительное уменьшение размеров);
- благоприятное (уменьшение размеров);
- безуспешное (отсутствие изменений в кистах).

Эксперименты Morris et al. на лабораторных моделях показали, что в дозе 10 мг/кг в течение недели этот препарат эффективно подавляет рост кисты [202]. Обычно больным рекомендуют принимать альбендазол по схеме, предложенной Horton (1989) и одобренной ВОЗ (по 10-15 мг/кг веса в сутки в три курса лечения по 28 дней с перерывами на 14 дней) [73, 116]. В такой дозе препарат не оказывал токсического влияния на печень у взрослых пациентов [26, 202].

В то же время исследования показывают, что альбендазол не имеет абсолютной эффективности, и после прекращения приема препарата у ча-

сти пациентов развивается рецидив (например, поэтому Минздрав Канады не рекомендует его использовать) [125, 207, 241]. Как показывают опубликованные обзоры литературы, химиотерапия полностью эффективна в 10-58 % случаев, приводит к улучшению - у 10-51 %, неэффективна у 13-37 % пациентов, вызывает дегенеративные изменения в кисте в 40-74 % случаев [124, 196]. В то же время доказано, что альбендазол-сульфоксид в дозе 200 мкг/мл обладает 100 % сколицидной активностью в пробирке [235]. Неудачи лечения от эхинококкоза человека альбендазолом отнесли к его низкой растворимости и плохой скорости абсорбции, что приводит к невысокому уровню препарата в плазме крови человека [73, 235].

Альбендазол (АБЗ) в печени у человека быстро (достигая максимальной концентрации через 2-5 часов) превращается в первичный метаболит альбендазол-сульфоксид (АБЗ-СД), обладающий антигельминтной активностью против цестод и нематод (свиного цепня, эхинококка, альвеококка, трихинеллы и других). Одним из основных ферментов, катализирующих этот процесс, является цитохром СYP3A4. В нем также участвуют флавиновая монооксигеназа (FMO3), цитохромы СYP1A1, СYP2C19. АБЗ-СД под действием ферментов в клетках печени метаболизируется в альбендазол-сульфон (АБЗ-СН). На этом этапе биотрансформации принимает участие цитохром P450 – СYP1A2 [206]. АБЗ-СН затем трансформируется в два гидроксированных метаболита: 2-гидроксипропилсульфон и 3-гидроксипропилсульфон.

Семейство цитохромов P450 СYP1A метаболизирует полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), где важную роль выполняют СYP1A1 и СYP1A2. Гены, кодирующие их, локализованы в хромосоме 15 у человека. Экспрессию обоих генов контролирует один и тот же регуляторный комплекс [45, 73, 137, 181]. Цитохромы, в том числе СYP3A4, СYP2C19, СYP1A участвуют в биотрансформации лекарств и гормонов [45, 153]. Корреляция аллелей генов цитохромов P450 с особенностями метаболизма лекарств стала очевидной в связи с появлением в последнее

десятилетие в литературе новых доказательств [45, 73]. Например, разработан высокоэффективный алгоритм выбора дозы варфарина на основе тестирования полиморфизма гена CYP2C19, одобренный в 2007 году комитетом FDA (Food & Drug Administration, USA).

Генетическое разнообразие людей, обусловленное полиморфизмом аллелей генов, определяет индивидуальные особенности метаболизма лекарств. Поэтому, у некоторых больных отсутствует терапевтический эффект лечения или развиваются побочные реакции. Исследования в области генетического контроля метаболизма лекарств привели к развитию нового научного направления персонализированной медицины – фармакогенетики. Например, было установлено, что гены, кодирующие синтез цитохромов P450, имеют полиморфные варианты, влияющие на их активность и индуцибельность. Аллели почти всех генов цитохромов, в зависимости от влияния на метаболизм лекарственных средств, подразделяются на фенотипические группы [45, 73]:

- «экстенсивные» (extensive metabolizers, EM) – с нормальной скоростью метаболизма. Как правило, это гомозиготы «дикого» типа;
- «быстрые» (ultraextensive metabolizers, UM) – с повышенной активностью биотрансформации. UM – гомозиготы при аутосомно-рецессивном типе и гетерозиготы при аутосомно-доминантном типе наследования;
- «медленные» (poor metabolizers, PM) – со сниженной скоростью метаболизма.

У «медленных» метаболитов, в отличие от «быстрых» и «экстенсивных», наблюдается значительно более длительный период выведения и часто кумулятивный эффект. Присутствие «быстрого» аллеля в генотипе человека приводит к повышению активности цитохромов и ускорению биотрансформации, соответственно, к низкой терапевтической эффективности общепринятой дозы препарата.

Об особенностях экспрессии генов, контролирующей биотрансформацию альбендазола, опубликованы единичные работы. Выявлено, что этот препарат является индуктором микросомальной монооксигеназной системы, главным компонентом которой служит цитохром P450 [107]. Монооксигеназная система гепатоцитов – ключевое звено процесса детоксикации ксенобиотиков, в том числе лекарственных препаратов, в организме человека. Установлено, что в метаболизме альбендазола участвуют флавиносодержащие монооксигеназы (FMO) и цитохромы P450: CYP3A4, CYP2D6, CYP2C19, CYP2E1, CYP1A2 [206, 225]. Эти же ферменты принимают участие в биотрансформации более чем 60 % лекарственных препаратов, кофеина, некоторых гормонов [153].

2. МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ЭХИНОКОККОЗА

2.1. Инструментальные методы диагностики

Предложено множество клинических классификаций эхинококкоза печени [23, 96, 111]. В клиническом течении заболевания различают: 1) бессимптомную стадию; 2) стадию прогрессирующего роста паразита; 3) стадию осложнения.

Первая, бессимптомная стадия встречается в начале заболевания, когда размеры паразита обычно невелики. Чаще всего эта стадия эхинококкоза диагностируется в процессе профилактического осмотра с помощью УЗИ. Это простой и достаточно информативный способ, с помощью которого было решено большинство вопросов топической диагностики эхинококкоза брюшной полости, забрюшинного пространства и мягких тканей [21, 24, 30, 32].

Рентгенологические методы нашли широкое применение в диагностике эхинококкоза легких (рисунок 2), печени, почек, костей, осложненного эхинококкоза печени, в частности нагноившегося, при локализации кист в верхних сегментах печени. Рентгено-диагностика рецидивов эхинококкоза имеет свои особенности, связанные с ранее перенесенными хирургическими вмешательствами.

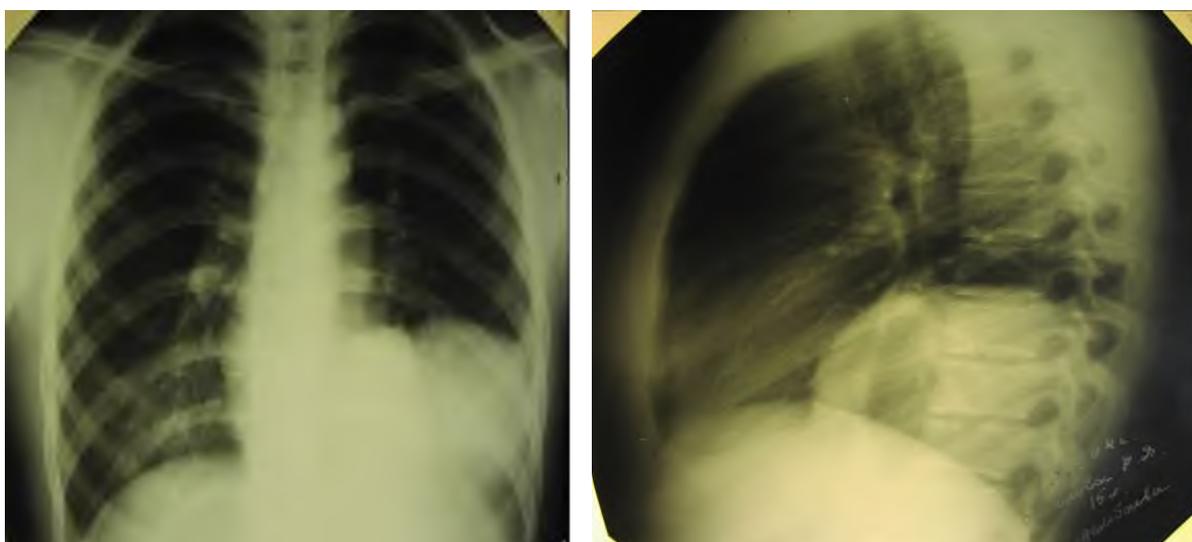


Рисунок 2 — Рентгенограмма при эхинококкозе легких

Искусственный пневмоторокс, пневмоперитонеум, торакоскопия, лапароскопия часто используют в диагностике первичного эхинококкоза, но у больных с рецидивами заболевания имеются ряд противопоказаний к их применению. Внутривенная холецистохолангиография, селективная гепатоангиография, интраоперационная холангиография, фистулография позволяют уточнить характер и локализацию рецидивных кист. До недавнего времени достаточно информативным методом исследования при первичном эхинококкозе печени считали радиоизотопное гепатосканирование, однако, значение метода из-за морфологических изменений паренхимы печени, в результате ранее перенесенной операции в диагностике рецидивов заболевания весьма ограничено.

Во многом улучшение диагностики объемных образований печени, связано с внедрением в практику новых инструментальных методов исследований — компьютерной и магнитнорезонансной томографии. Разрешающая способность способов составляет несколько мм, поэтому четкая визуализация структуры объемных образований позволяет проводить не только топическую, но и дифференциальную диагностику между непаразитарными и паразитарными кистами, доброкачественными и злокачественными первичными и вторичными новообразованиями [69]. Однако, по данным Альперовича Б.И. [13, 14], при использовании этих способов возникают определенные трудности в диагностике рецидивов и осложненных форм заболевания.

В последнее время в арсенале инструментальных методов исследования эхинококковых кист органов брюшной полости все шире применяются УЗИ и КТ (рисунок 3А). УЗИ является доступным, высокоинформативным методом диагностики, который позволяет установить диагноз в 85-97 % случаев и проводить длительное динамическое наблюдение за функцией и состоянием гепатобилиарной системы.

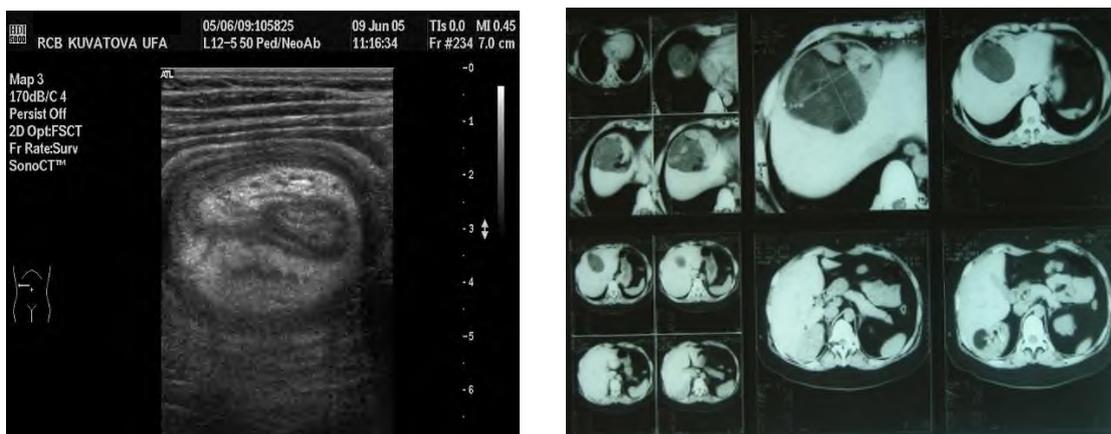


Рисунок 3 А — УЗИ и КТ при рецидивном эхинококкозе печени

УЗИ печени и КТ дают возможность более точного определения локализации эхинококковой кисты, стадии развития, количества кист, изменения в паразитарной кисте и наличия осложнений.

Использование инструментальных методов с высокой чувствительностью достигает 95 % (УЗИ, КТ, ЭРХПГ), что позволяет четко определить локализацию очага и топографические соотношения с прилегающими структурами (рисунок 4). Ошибки при УЗ-диагностике эхинококкоза имеют место в 5 – 7,4 % наблюдений, главным образом при начальных стадиях развития паразита и после его гибели. При сочетании нескольких методов — УЗИ, КТ, серологических реакций точность диагностики эхинококкоза по данным авторов повышается до 90 – 94 % [95, 109, 142].

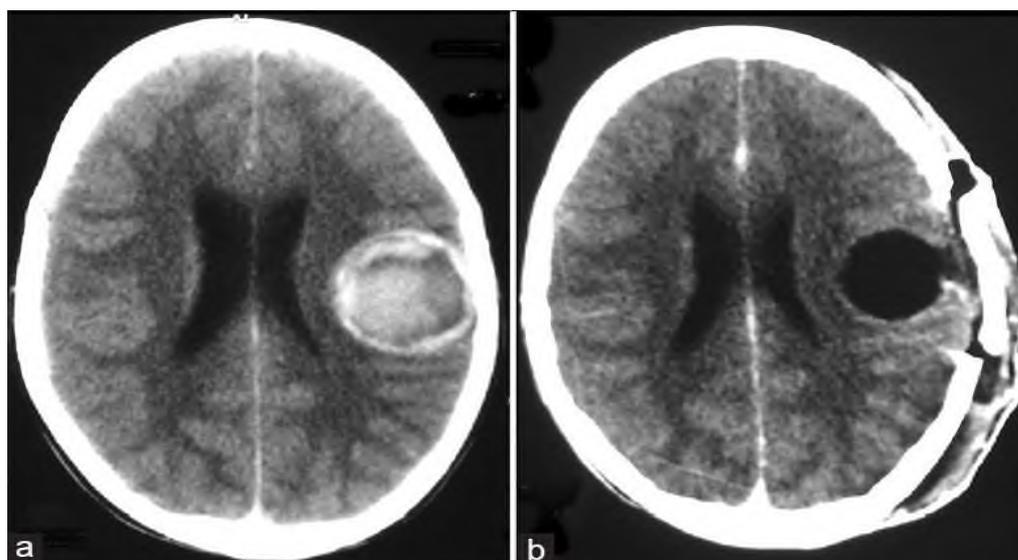


Рисунок 4 — КТ головного мозга до и после удаления эхинококковой кисты

По данным некоторых авторов своевременная диагностика первичного и рецидивного эхинококкоза должна состоять из ряда диагностических методов, включающих УЗИ, рентгенологическое исследование и ИФА с эхинококковым антигеном, а оперированные больные должны находиться под диспансерным наблюдением в течение минимум 5 лет с ежегодным серологическим контролем [60, 82, 108, 151, 197].

Редкая локализация эхинококкоза встречается в 2 – 3 % случаев. Диагностика таких форм эхинококкоза только с помощью инструментальных методов чрезвычайно сложна. Поэтому ценность иммунологических методов диагностики эхинококкоза определяется не только трудностями его клинического распознавания, но и перспективностью его раннего выявления.

Несмотря на большое количество иммунологических реакций, пока нет метода, в полной мере удовлетворяющих клиницистов по сочетанию специфичности и чувствительности. Поэтому исследования в области иммунодиагностики эхинококкоза должны быть направлены на оптимизацию и стандартизацию иммунологических методов.

2.2. Иммунодиагностика эхинококкоза

2.2.1. Антигены эхинококка

В любой реакции применяют антиген (Аг), выделенный из эхинококковой кисты. От активности и специфичности используемого эхинококкового антигена зависит эффективность иммунодиагностики эхинококкоза. Все три основных элемента эхинококковой кисты – эхинококковая жидкость (ЭЖ), протосколексы и оболочки цисты изучали в качестве Аг. Фракции, выделенные из оболочек эхинококковой кисты, оказались плохим антигенным материалом, чувствительность реакция прямой гемагглютинации (РПГА), реакция иммунодиффузии (РИД) и других реакций с ними была низкой [122].

Более активными антигенами являются препараты, выделенные из протосколексов [29]. РИД с этим Аг дает, по мнению авторов, лучшие результаты, чем с ЭЖ. Наиболее активные специфические эхинококковые антигены в протосколексах М.в. 30 и 67 КД [91, 112].

Многие исследователи указывают на высокую активность ЭЖ в серологических реакциях [91, 112]. Одни авторы связывают вариабельность антигенных свойств с природой хозяина паразита, другие – со степенью зрелости и развития цист. Е.А.Совина и соавт. изучали активность основных антигенов эхинококка (В и 5) в РПГА из цист, выделенных от человека, овцы, осла, верблюда, крупного рогатого скота (к.р.с.), песчанок. Была выявлена наибольшая активность этих антигенов в ЭЖ из цист, паразитирующих в печени овец.

Цельная ЭЖ, по мнению J.Kagan, M.Agosin 1968, представляет собой смесь субстанций, часть которых относится к хозяину, другая часть – к метаболитам паразита. Белки хозяина имеются не только в ЭЖ, но и в мембранах, протосколексах [112]. При иммунологических тестах в диагностике эхинококкоза Аг хозяина являются балластом, за счет которых нередко можно наблюдать ложноположительные результаты.

По данным А.И Збарского и соавт., наиболее активные в антигенном отношении антигены с молекулярным весом от 100 до 300 КД, на долю которых приходится от 40 до 60 % белков ЭЖ. Основными антигенами паразита являются Аг-В с М.В.-400 КД и Аг-5-150 КД. При обработке В-Аг 2 МЕ, он распадается на субъединицы МВ – 39 КД, а под влиянием додецилсульфата – на субъединицы 56 и 66 КД. Было ими обнаружено, что В-Аг термолабилен и разрушается при 70°С или 100°С без какого-либо уменьшения антигенной активности 5-Аг разрушали до субъединиц МВ 10-20 КД. S.E. Maddisson et al. отмечают, что Аг, обнаруженный ими в свободном виде в ЭЖ, очень похож на субъединицы 5Аг.

В-Аг нашли и в других цестодах, поэтому он не может считаться специфичным для эхинококка, в отличие от 5-Аг, который, по мнению ав-

торов, является специфичным для эхинококка. Некоторые авторы отмечают, что Аг 5 так же как и Аг В все-таки не являются специфичными антигенами для эхинококка. Тем не менее, это основные антигены эхинококка и диагностика, в основном, ориентируется на выявление антител к этим антигенам. Ложноотрицательные результаты вероятны при отсутствии в сыворотках больных эхинококкозом антител к основным антигенам. Это возможно, т.к. оказывается, не во всех образцах ЭЖ от больных людей эхинококкозом выявляются эхинококковые антигены в реакции иммуноэлектрофореза (РИЭФ) против гипериммунной сыворотки кролика к ЭЖ из цисты от человека. РИЭФ тест невысокой чувствительности, но абсолютной специфичности. Отсутствовали, именно, основные антигены или их было немного, ниже порога чувствительности РИЭФ, потому что основные антигены составляют значительную часть от всех белков в ЭЖ и поэтому в гипериммунной сыворотке кролика, конечно, присутствовали антитела к основным антигенам. С помощью иммунофлюоресцирующих сывороток, В-Аг обнаружили в паренхиме и в стенках выводных протоках сколексов.

Этот Аг синтезируется сколексами и выводится в полость цисты через осморегуляторную систему. 5 Аг присутствует в кутикулярной мембране, в покровных слоях сколексов и в субстанциях, содержащихся в выводковых капсулах. Barbieri M. et al. сравнивали чувствительность и специфичность в ИФА Аг 5, Аг В иммуноочищенных из ЭЖ, синтетических пептидов- GU4 и Аг с М.В. 65 КД являющиеся субъединицами Аг В, а также субъединицу Аг 5 с М.В. 89-122 КД. ИФА с Аг В и Аг 5 показала более высокую чувствительность (77 % и 74 % соответственно), чем со всем набором пептидов. С ЭЖ чувствительность составила всего 71 %. С Аг М.В. 65 КД чувствительность была в 3 – 4 раза выше, чем с Аг М.В. 89 – 122 КД или с GU4, однако и специфичность была на 30 % ниже. Все сыворотки, реагирующие с пептидом 89 – 122 КД и GU4 также реагировали с Аг 65 КД. Дополнительное использование с Аг В и Аг М.В.

89 – 122 КД повышает чувствительность реакции до 82 %, однако специфичность оставалась на уровне 86 %. Для повышения эффективности диагностики эхинококкоза авторы предлагают комбинированное использование разных эхинококковых антигенов, включая синтетические пептиды. В будущем авторы предполагают синтезировать новые пептиды, которые реагировали бы с сыворотками больных эхинококкозом, дающие ложноотрицательные результаты.

Все гетерогенные антигены, перекрестно реагирующие с антигенными субстанциями хозяина, принято разделять на две группы. К первой относят субстанции хозяина, попавшие во внутренние среды гельминта (контаминирующие), ко второй – антигенные компоненты паразита, которые имеют одинаковое строение с какими-то тканевыми субстанциями хозяина (эклипсивные).

В ЭЖ найдены такие сравнительно крупные белковые молекулы хозяина такие как IgG. Концентрация их составляла 1,3-13мг/мл, а альбуминов хозяина – 3-34мг/мл [85, 86]. Только в 15 из 18 случаев V.M.Varela-Dias, E.A.Coltorti нашли в ЭЖ IgG. Авторы предполагают, что белковые молекулы могут проникать сквозь оболочку цисты лишь при наличии в ней каких-либо повреждений. E.A.Coltorti, V.M.Varela-Dias отмечают, что такие повреждения могут самоустраняться. Результатом этого может быть также уменьшение или же прекращение выхода паразитарных Ag в ткани хозяина. Антигенная стимуляция уменьшается или же прекращается совсем и титр антител падает. Доказательством такого предположения, видимо, могут служить результаты G.A.Conder et al.: у инвазированных овец антитела, выявляемые с помощью РИД и РИЭФ, могут появляться, а затем исчезать совсем.

Помимо сывороточных компонентов в ЭЖ находили и органоспецифические Ag хозяина. В эхинококковой цисте, паразитирующей в печени хомяка и крысы, J.Kagan et al., обнаружили печеночные Ag хозяина. Авторы отмечают, что за счет этих Ag возможны ложноположительные

результаты реакций. Неспецифические результаты в серологических реакциях при использовании ЭЖ часто наблюдают при изучении сывороток больных различными коллагенозами. Титр РПГА от 1:50 до 1:100 наблюдали у 49 % таких больных, а у 3 из 129 больных титр реакции был выше 1:400. Наибольшее количество неспецифических результатов наблюдали у больных с циррозом печени и с нефрозом. Авторы отмечают, что неспецифические результаты реакций наблюдаются с сыворотками больных, у которых в крови присутствуют аутоантитела, перекрестно реагирующие с неспецифическими компонентами, присутствующими в ЭЖ. При эхинококкозе находили аутоантитела к антигенам большого комплекса гистосовместимости, мускулатуры желудка, эритроцитам.

В эхинококковой цисте обнаружены Аг системы Р. J.Cameron, J.Staveley в 20 из 25 образцов ЭЖ нашли Р Аг. Отсутствовал он лишь в тех цистах, где отсутствовали протосколексы. Этот Аг относится к мукополисахаридам. Присутствие большого количества Р-субстанции в эхинококковых цистах подтвердила Л.П.Свириденко.

T.Hrzenjak, J.Enrlich и T.Hrzenjak et al. показали, что этот Аг в большом количестве содержится и в других гельминтах, и к тому же он обладает иммунологической активностью. У лиц не имеющих антител к Р Аг, после внутрикожного введения небольшого количества ЭЖ (реакция Кацони) появляются антитела к этому антигену. Представляет интерес то, что анти-Р антитела обнаруживали и у больных злокачественными новообразованиями.

Гельминты, особенно близкородственные, имеют много общих Аг, что также может влиять на специфичность иммунологических реакций. В РИД и РИЭФ J. Bignet et al. находили общие Аг с *E.granulosus* у *T. Saginatus*, *T.spiralis*, *O.volvus*. Н.Е.Баллад — у *S.Bovis*. Н.А.Мунтян [91] — у *T.hydatigena*, Л.М.Коновалова [68] — у *S. Cellulosae*, A.Capron et al — у *H.nana*. R.T. Wagner — у *H.diminuta*, *Mesoncestoides corti*.

М.А.Раззаков [112] — у *Fasciola hepatica*. Особенно много общих Аг у *E.granulosus* и *E.multilocularis*.

Ложноположительные результаты иммунологических реакций, в которых в качестве Аг использовали ЭЖ, были получены также с сыворотками больных тенидиозом, филяриатозом, трихинеллезом, аскаридозом, лейшманиозом, токсоплазмозом, цистециркозом [112]. *T.Saginata* имеет достаточно много общих антигенов с эхинококком. У 6 из 13 животных больных тенидиозом обнаруживали антитела к ЭЖ. *T.solium* также имеет достаточно много общих компонентов у 7 из 22 больных цистециркозом людей результаты серологического обследования дали ложноположительный результат [112].

Используя моноспецифические сыворотки к В и 5 Аг в реакции радиоиммунодифузии по Манчини, P.Musiani et al. определяли содержание этих основных Аг в ЭЖ из цист, паразитирующих в печени и легких свиней, овец, человека, быка. Концентрация обоих Аг была наибольшей в овечьей и человеческой ЭЖ (0,0051-0,0089 мг\мл – В Аг и 0,053- 0,088 мг\мл – 5 Аг).

Чувствительность РПГА, РИЭФ и ВИЭФ при использовании очищенных Аг (В и 5) не возрастает. Так, чувствительность РПГА с ЭЖ была 89,3 %, с В Аг — 89,3 %, а с 5 Аг — 80,0 %. Специфичность реакции возрастала: ложноположительные результаты были получены в 9,5 %, 4,7 % и 2,3 % при использовании ЭЖ, Аг В и 5 соответственно.

Эхинококковые цисты могут стареть и обызвествляться. По уровню холестерина в цисте при ее изучении *in vitro* судят о ее старении. Количество холестерина возрастает с увеличением дегенеративных процессов в кисте. Сообщается о снижении титров антител при гибели цисты. В 21 % случаев при исследовании эхинококковых цист с помощью R- графии, УЗИ, КТ были найдены кальцифицированные цисты. В 12 % были кальцифицированы внутренние слои цист, а в 4,5 % была множественная кальцификация с очагами [117].

Т.о., в результате многочисленных исследований установлена сложность антигенной структуры эхинококка. Кроме видоспецифических, основными антигенами эхинококка являются В и 5 антигены, обнаружены также гетерогенные компоненты, общие с антигенами других гельминтов и белками хозяина паразита.

2.2.2. Индикация эхинококковых антигенов

В случае отрицательных результатах реакций по выявлению антител индикация эхинококковых антигенов — значительно повышает эффективность диагностики эхинококкоза. У большинства больных с отрицательными результатами на антитела в ИФА находили в крови эхинококковый антиген. В крови больных эхинококкозом людей эхинококковый антиген находили и другие. В.Gottstein et al. [170] с помощью ИФА у 40 % больных нашел эхинококковый антиген в концентрации 355 – 580 нг\мл. Чувствительность метода составляла 270 нг\мл. При исследовании 9 сывороток крови прооперированных больных у 4 был обнаружен антиген до операции.

P.S.Craig считает, что при удачной операции концентрация эхинококковых антигенов в крови постепенно должна снижаться. Е.С.Лейкина у 21 больного эхинококкозом из 120 в РИД и РНАТ находила эхинококковый антиген. Автор полагает, что эхинококковый антиген в крови больных появляется в результате нарушения целостности оболочки паразита.

Некоторые авторы предлагают при наличии цист в легком неясной этиологии проводить пункцию и исследовать содержимое цисты на присутствие эхинококкового антигена. Особенно сложно поставить диагноз в случае атипичной локализации эхинококка при отсутствии противоэхинококковых антител. Редкая форма эхинококкоза встречается в 2 – 3 % случаев или 10 случаев на 100000 населения в эндемичных районах. Однако, пункция может привести к развитию анафилактического шока или рецидиву эхинококкоза.

Кроме того, имеется исследование Рехтмана А.Г. с соавт., которые использовали РПГА для индикации термостабильных эхинококковых антигенов в смывах бронхов при осложненных формах эхинококкоза легких. В этих случаях, при прорывах паразитарных кист в бронхиальное дерево были обнаружены эхинококковые антигены. В моче у трети больных эхинококкозом почек обнаруживается эхинококковый антиген и элементы паразита в моче. Angulo J.C. et al. у 9,5 % больных эхинококкозом почек находили эхинококковый антиген в моче. По мнению авторов, проводивших исследование, применение этой методики значительно расширяют возможности в выявлении эхинококкоза. Индикация эхинококковых антигенов или их праймеров с помощью ИФА или ПЦР — удобная форма проведения также эпидемиологических исследований по эхинококкозу. В ПЦР обычно изучают праймеры выделенные из митохондрий паразитов. Всего известно 10 генотипов *E.granulosis* [147, 187, 209].

Т.о. серологическая диагностика эхинококкоза должна быть комплексной, направленной на выявление всех антител к специфическим антигенам (основным и не основным) и индикацию эхинококкового антигена. Известные подходы в серологической диагностике не могут в полной мере удовлетворить практическое здравоохранение.

2.2.3. Антитела при эхинококкозе

У больных эхинококкозом основной активностью в серологических реакциях обладают антитела класса G. IgG1 и IgG4 - основные антитела при эхинококкозе [255]. Причем, первые антитела выявляются одинаково часто в ИФА в группе больных с проявлением заболевания (85 %) и без (77 %). IgG4 выявляются в 71 % случаев в группе с симптомной формой эхинококкоза и в 23 % с бессимптомной. Некоторые авторы отмечают, что IgG4 является маркером клинического проявления заболевания.

Антитела класса M появляются сразу же после удаления эхинококковой цисты, сохранение активности этих антител в течение длительного

времени обычно указывает на рецидив заболевания [9, 24, 28, 33]. Наличие цист с поврежденной оболочкой проявляется повышенной активностью Ig M антител, а при локализации эхинококковых цист в легких – IgA. У овец больных эхинококкозом уровень антител очень низкий. У больных людей противопаразитарная активность значительно выше.

Средний уровень общего IgD у больных эхинококкозом обычно не выше, чем у здоровых [28]. Общий уровень IgE значительно повышен при всех гельминтозах и эхинококкозе, в частности. Обнаружена прямая корреляция между общими и специфическими IgE [33].

Четкую корреляцию между весом сформировавшихся цист и титром РПГА нашел S.Pauluzzi. Чем больше вес паразита, тем выше титр РПГА. Е.С.Лейкина считает, что антитела можно обнаружить в крови в тот период, когда эхинококковая циста достигает размеров 1x1,5см. В этот период титр антител низкий. В фазе роста и формирования сколексов титры реакции наиболее высоки.

По данным В.И.Зорихиной и Г.З.Фатхулиной, в ИФА при наличии единичных эхинококковых цист в печени 2 – 5 см средний геометрический титр реакции равен 1:512. Если цисты более крупные 16-18см средний геометрический титр равен 1:2560.

Изучая иммунный ответ при эхинококкозе легких у больных людей, Т.Todorov et al. отмечали, что число эхинококковых цист оказывает существенное влияние на интенсивность иммунного ответа. Значительное влияние оказывают изменения в самих кистах и прилегающей легочной ткани. Иммунный ответ был слабым или вообще отсутствовал, если эхинококковую кисту окружала плотная фиброзная капсула. При нагноении эхинококковой кисты или фиброзной капсулы, а также в случаях, когда воспалительный процесс захватывал прилегающую легочную ткань, титр антител достигал высоких значений.

В иммуноблотинге S.E.Maddison et al. нашли, что антитела к антигенам М.В. 8 КД имеются у 91 % больных эхинококкозом печени и у 39 %

больных альвеококкозом. Такая же чувствительность по Аг 8 КД получена и другими авторами, но специфичность составила 82 %. Вероятно, с этим же антигеном, но описанном как антиген 10 КД у других авторов, чувствительность в иммуноблотинге при эхинококкозе составила 86,6 %, в 8 % случаев отмечался ложноположительные результаты с сыворотками больных цистоцеркозом. Эта же реакция с суммарной ЭЖ у 52 больных показала чувствительность — 92,3 %, специфичность — 97 %. Антитела к антигенным комплексам с М.В. 52 – 62 КД выявлялись у 87 % больных эхинококкозом. К этим антигенам были обнаружены антитела также у больных другими гельминтозами (цистоцеркозом, амебиазом, шистоматозом, фасциолезом, филяриозом). К антигенному комплексу с М.В. 14 – 40 КД — у 19 % таких больных, а к антигенному комплексу с М.В. 52 – 62 КД — у 78 % (наименее специфичные белки). В Аг взаимодействовал только с одной сывороткой крови больного цистоцеркозом (из 150 исследуемых проб). К В Аг, по данным P.R.Nira et al., 95,5 % больных имеют антитела. По данным A.Jacopa et al. к В Аг выявляются антитела у 48,4 %, к 5 Аг — у 3,1 %, а к В и 5 Аг одновременно — у 21,9 % больных эхинококкозом. У 26,6 % больных не обнаружены антитела ни к одному из этих антигенов. У 77 % больных эхинококкозом они выявили антитела к субъединицам 5 Аг.

Т. о., при эхинококкозе обнаруживаются антитела всех классов. Как и при инфекционном заболевании наиболее активны в начале заболевания IgM. Наивысшая активность антител при эхинококкозе наблюдается к антигенам В, 5 Аг и с М.В. 8 КД. К некоторым антигенам эхинококка: 14 – 40 КД и 52 – 62 КД, нередко обнаруживают антитела у больных другими гельминтозами. Размер и состояние эхинококковой цисты оказывает значительное влияние на иммунный ответ организма. В фазе формирования сколексов титры антител наиболее высоки.

2.2.4. Выявление антител

1. Реакция связывания комплимента.

РСК для диагностики эхинококкоза впервые предложена G. Ghedini. Чувствительность ее, по данным различных авторов, колебалась от 36 % до 93 %.

Так, R.C.Mahajan et al. сравнивали реакцию Кацони и РСК. Первая реакция оказалась более чувствительной – 71,9 % против 65,6 %. Специфичность РСК составила 81,1 %, а реакция Кацони 83,9 %.

C.M.Bradstreet сопоставила диагностическую ценность РСК и реакции Кацони при обследовании 101 больного эхинококкозом. Чувствительность обоих методов оказалась близкой: РСК — 68 %, реакции Кацони — 66 %. Специфичность РСК несколько выше (84 %), чем реакции Кацони (79,8 %).

Сравнивали различные модификации РСК: микрометод в пластинках и способ постановки реакции в пробирках, с использованием в качестве Аг – ЭЖ или экстракт из сколексов. Лучшая чувствительность получена с ЭЖ: в пластинках – 74,0 %, в пробирках – 72,0 %, с антигеном из сколексов чувствительность соответственно равнялась – 66,0 % и 68,7 %. Специфичность реакции во всех случаях была одинаковая – 97,9 %. У T.Todorov et al. специфичность РСК при обследовании 252 неэхинококковых больных была ниже и равнялась 88,5 %.

2. Реакция пассивной гемагглютинации (РПГА).

Чувствительность РПГА у различных авторов неодинакова: от 52 % до 100 %. Широкому распространению РПГА мешало использование нативных эритроцитов. Фиксированные и сенсibilизированные эритроциты хранятся несколько месяцев. Фиксацию чаще всего проводят формалином. Часть авторов указывают на лучшую чувствительность ИФМ при сравнении ее с РПГА [148, 149, 150]. Некоторые авторы отмечают, что РПГА более чувствительный тест.

3. Иммуноферментный анализ (ИФА).

Одними из первых применили ИФА при эхинококкозе F.Sorice et al. Чувствительность реакции составляла 96,7 %. Обычно в качестве метки в ИФА используют пероксидазу хрена. Сравнивалась ИФА с пероксидазным и авидинбиотиновым конъюгатами. Чувствительность второго варианта была выше – 92,3 %, а первого – 65,4 %. Но специфичность оказалась лучше у второго варианта. У Matossian et al. чувствительность ИФА оказалась ниже – 80 %. A.Jasona et. al. сравнивали эффективность ИФА при использовании ЭЖ в двух модификациях: в пробирках и микропластинках. В обоих случаях при использовании полуочищенного Аг чувствительность ИФА возрастала, в первом случае с 59,3 % до 67,7 %, во втором с 45,5 до 72,5 %. Авторы проводили сравнение чувствительности ИФА и РИД. Лучшим оказался последний метод – 70,3 %, ИФА – 63,7 %. Специфичность ИФА составила 84,6 %.

У F.Sorice et al. из 32 больных активным эхинококкозом ИФА была положительной в 90,6 % случаев, ВИЭФ – в 75,0 %. Среди ранее болевших эхинококкозом тесты были положительными соответственно в 80 % и 40 % случаев. Активность антител, выявляемая в ИФА, сохраняется достаточно долго, и после лечения.

B.S.Dottorini et al. сравнивали РПГА, ИФА, РСК, РЛА с ЭЖ, сколексным антигеном и фракциями из этих антигенов. Лучшая чувствительность была в РПГА с фракциями из ЭЖ – 100 %, в ИФА – 98,2 %, РСК – 71,1 %, РЛА – 57,6 %. Специфичность с этим антигеном у первых 2-х реакций и РСК – 100 %, а РЛА – 98,8 %. Со сколексным антигеном лучшей также была РПГА. Чувствительность реакции – 84,2 %, специфичность – 100 %. При сравнении РПГА с ЭД из ЭЖ и с ЭД из прогретой при 110°C в течении 10 мин. ЭЖ, получена равная чувствительность, но специфичность второго диагностикума была выше на 4 %.

Чувствительность и специфичность серологической диагностики зависит не только от используемого антигена, но и от применяемой серологической реакции. Лучшими реакциями в диагностике эхинококкоза

являются РПГА и ИФА. Все изучаемые серологические реакции — ИФА, РИФ, РСК, РИД, РПГА, РЛА, иммуноблотинг могут давать ложноположительный результат реакции. Однако, нередко эти реакции могут давать и ложноотрицательный результат.

2.2.5. Экспресс – диагностика эхинококкоза

Наиболее важной тенденцией в диагностической медицине за последнее время является уменьшение доли анализов, проводимых в центральных клинических лабораториях. В последние 15 лет наблюдается тенденция к разработке тестов, которые позволяли бы проводить анализ на дому без участия врача. Такая “домашняя” и простая в использовании тест- система необходима, прежде всего, для диагностики эхинококкоза в отдаленных животноводческих районах, где высока вероятность заражения эхинококкозом и нет серологической лаборатории. Обычно в экспресс-тестах используется иммуноферментный, иммунохроматографический или агглютинационный подход.

Реакция агглютинации известна уже давно и детально описана в литературе. Агглютинационные тесты можно использовать для определения, как антител, так и антигена в зависимости от того, какой реагент связывается с твердой фазой. Эти тесты очень хорошо подходят как для самодиагноза, так и для лабораторий при кабинете врача, поскольку они очень просты и не требуют специального оборудования. Существует вариант агглютинационного теста в капиллярах.

Наиболее часто используемый, в настоящее время, метод в экспресс-диагностике — иммунохроматографический. Тест-система обычно представляет собой полоску из пористого материала, на одном конце которой находятся частицы цветного коллоида, чаще всего золота, sensibilized гибридными антителами против исследуемых молекул, а на другом конце — гибридные антитела, зафиксированные на полоске к тем же исследуемым молекулам, но к их другим эпитопам. На конец по-

лоски с коллоидом, наносятся 1 – 2 капли изучаемой пробы. Если в пробе присутствуют исследуемые молекулы вещества, они свяжутся с антителами, фиксированными на коллоиде. Затем этот же конец полоски опускается в изотонический раствор хлористого натрия. По капиллярам полоски раствор начинает подниматься, захватывая частицы коллоида. С током жидкости частицы коллоида достигают места фиксации на полоске вторых антител и, взаимодействуя с молекулами вещества, также фиксируются на этом же месте. Скопление на полоске достаточного количества частиц цветного коллоида приводит к появлению на белом фоне полоски цветного пятна, хорошо видимого невооруженным глазом, что оценивается как положительный результат. При отсутствии этого пятна результат реакции отрицательный.

Метод ферментативной иммунохроматографии. В этом методе используется конъюгат фермента с определяемым веществом и специфические антитела против последнего. Определенный объем пробы смешивают с раствором, содержащим конъюгат пероксидаза-гаптен и ферментный реагент (глюкозооксидаза). Глюкозооксидаза при окислении глюкозы генерирует пероксид водорода — субстрат пероксидазы, в результате чего отпадает необходимость включать в состав наборов нестабильные пероксидные реагенты. Сухую полоску фильтровальной бумаги с иммобилизованными на ней антителами против определяемого вещества помещают в раствор пробы и других реагентов. Реагирующие вещества под действием капиллярных сил поднимаются по полоске вверх. Глюкозооксидаза распределяется по длине полоски равномерно, а высота подъема определяемого вещества и конъюгата зависит от их относительных концентраций. Чем выше — тем больше концентрация вещества. После инкубации в течение нескольких минут полоску переносят в проявляющий раствор, состоящий из глюкозы и хромогенного индикатора. В ходе ферментативной реакции образуется окрашенная зона, высота которой пропорциональна концентрации определяемого вещества в пробе. Здесь конъюгат исполь-

зуется только в качестве маркера для определения длины пробега определяемого вещества по полоске.

Для диагностики в кабинете врача применяется также так называемый иммуноанализ с самоудерживанием. Основой этого метода являются несмешивающиеся растворы реагентов, расположенные слоями и обеспечивающие последовательное проведение реакций и отделение связанных реагентов от несвязанных. В пробирке самый верхний слой содержит связанные с антителами гранулы, предварительно смешанные с ферментным конъюгатом. Гранулы диаметром несколько микрометров позволяют значительно ускорить реакцию антиген-антитело по сравнению с гранулами больших размеров. Реакцию начинают, вводя пробу в анализатор в верхний слой. После инкубации для обеспечения специфического связывания пробирку недолго центрифугируют, заставляя гранулы пройти через несмешивающийся с водой слой. На этой стадии от гранул отделяется несвязавшийся конъюгат. Далее гранулы попадают в нижний слой, содержащий проявляющий для данной метки раствор. Появление цвета наблюдается только в нижней части пробирки. Интенсивность окраски можно оценить визуально или с помощью специального колориметра. Стадия центрифугирования занимает не более минуты, а все необходимые для анализа реагенты находятся уже в пробирке. В нее добавляют только изучаемую пробу. Если центрифугирование нежелательно, то для разделения можно использовать намагниченные гранулы и магнитное поле [186].

2.2.6. Методы получения иммуноглобулинов

Иммунные сыворотки получали путем иммунизации кроликов породы «Шиншила» весом 2500-3000 гр. по N. Harboe, A. Ingild. 0,5 мл раствора соответствующего антигена в концентрации 30-40 мг/мл смешивали с 0,5 мл неполного адьюванта Фрейнда. Смесь вводили внутрикожно в область лопаток в 0, 14, 28, 42 дни. На 15 день после последнего дня иммунизации брали кровь из ушной вены.

Суммарный иммуноглобулин из иммунных сывороток извлекали при помощи этанола по методу E.J. Cohn. Для этого сыворотку разводили тремя объемами дистиллированной воды (pH 7,2 - 7,4) и охлаждали до 0оС. Затем добавляли охлажденный до 0оС этанол до конечной концентрации 20 %, перемешивали и охлаждали до минус 50С. Выпавший осадок, содержащий иммуноглобулины, отделяли при помощи центрифугирования на холоду при 3000 об/мин в течение 30 минут, растворяли в 0,9 %-ном растворе натрия хлорида и лиофилизировали.

Выделение «чистых» Ат с помощью иммуносорбентов проводили по методу А.Б. Жебруна. Использовали CN-Br активированную сефарозу Иммуносорбент в количестве трех – пяти мл вносили в колонку диаметром 2,5 см и промывали 0,85 %-ным раствором натрия хлорида, содержащим 0,15 М фосфатную буферную систему (pH 7,2). В колонку заливали 4-5 мл иммунной сыворотки крови, затем промывали 0,85 %-ным раствором натрия хлорида, содержащим 0,15 М фосфатную буферную систему (pH 7,2). Антитела элюировали 0,1 М раствором глициновой буферной системой (pH 3,0). Элюат собирали, нейтрализовали 0,5 М раствором гидроксида натрия. Проводили диализ элюированных фракций с высоким титром антител против 0,9 %-ного раствора натрия хлорида, содержащего 0,15 М фосфатную буферную систему (pH 7,2) и подвергали лиофилизации.

2.2.7. Методы сенсibilизации эритроцитов

В работе использовали формализированные эритроциты барана по R.Weinbach и по L. Csizmes в модификации П. И. Меньшова и М. Ф. Шмутера.

Сенсibilизацию танизированных эритроцитов по модифицированному методу S.V.Boyden производили путем смешивания равных объемов 5 %-ной взвеси эритроцитов и 0,05 % раствора танина (pH 7,2). Смесь встряхивали и выдерживали в течение 15 минут при температуре 37оС,

затем трижды отмывали 0,9 %-ным раствором натрия хлорида (рН 6,4) и ресуспендировали до 5 %-ной концентрации в этом же растворе. После этого к взвеси танализованных эритроцитов добавляли равный объем раствора сенситина, приготовленного на 0,9 %-ном растворе натрия хлорида (рН 6,4). Смесь встряхивали и выдерживали в течение одного часа в водяной бане при температуре 45°C, периодически перемешивая. Затем эритроциты трижды отмывали 0,9 %-ным раствором натрия хлорида (рН 7,2), содержащим твин-80 в конечной концентрации 1:50000 и ресуспендировали в таком же растворе до 10 %-ной взвеси.

Сенсибилизацию эритроцитов при помощи амидола. К 1 объему фиксированных эритроцитов и одному объему раствора сенситина добавляли один объем 0,4 %-ного водного свежеприготовленного раствора амидола. Смесь встряхивали и выдерживали в течение 30 минут в водяной бане при температуре 54°C, периодически перемешивая. Затем эритроциты трижды отмывали 0,9 %-ным раствором натрия хлорида (рН 7,2), содержащим твин-80 в конечной концентрации 1:50000, и ресуспендировали в таком же растворе до 10 %-ной взвеси.

Сенсибилизация эритроцитов при помощи хлорида хрома по модифицированному методу J.H. Jandl, R.L.Simmons. Смешивали равные объемы 20 %-ной взвеси эритроцитов, вместо 50 % как в оригинале, раствора сенситина и 0,5 %-ного водного раствора хлорида хрома. Смесь встряхивали и выдерживали в течение пяти минут при комнатной температуре, периодически перемешивая. Затем эритроциты трижды отмывали 0,9 %-ным раствором натрия хлорида (рН 7,2), содержащим твин-80 в конечной концентрации 1:50000, и ресуспендировали в таком же растворе до 10 %-ной взвеси.

Сенсибилизацию эритроцитов при помощи риванола В.А.Шамардин и Б.В.Каральник проводили следующим образом: смешивали два объема 5 %-ной взвеси эритроцитов, один объем раствора сенситина и один объем 0,02 %-ного раствора риванола. Смесь встряхивали и выдерживали в

течение двух часов в водяной бане при температуре 45оС, периодически перемешивая. Затем эритроциты трижды отмывали 0,9 %-ным раствором натрия хлорида (рН 7,2), содержащим 0,1 % желатина, и ресуспендировали в таком же растворе до 10 %-ной взвеси.

2.3. Морфофизиологические исследования

Эхинококковых кист

Соблюдая асептику, из эхинококкового пузыря стерильной пипеткой собирали протосколексы. Затем каплю исследуемого материала помещали на предметное стекло, добавляли каплю раствора Люголя (в качестве красителя) и покрывали покровным стеклом. Показатель плодоносности вычисляли путем расчета количества фертильных кист, содержащих протосколексы в пузырьной жидкости, к общему числу исследуемых кист (в %).

Жизнеспособность исследовали стандартным методом путем окрашивания 0,1 % эозином [189, 231]. Жизнеспособные протосколексы не окрашивались. Определение моторики жизнеспособных протосколексов проводили следующим образом: на предметное стекло с лункой (диаметром 20 мм) помещали 1 каплю осадка пузырьной жидкости, 3 капли активизирующего раствора (80 % глицерина). После чего исследовали под микроскопом (согласно рекомендациям Журавец А.К., 2004; Аничкин В.В. и др., 2013). Жизнеспособные протосколексы под действием активизирующего раствора становились подвижными, выворачивались и визуально выглядели как эвагинированные. Нежизнеспособные протосколексы под действием глицерина оставались неподвижными и со временем разрушались (то есть не имели инвазионной способности). Протосколексы рассматривали под световым микроскопом «Биолам» при увеличении $\times 400$ ($\times 10$ – окуляр, $\times 40$ – объектив), $\times 900$, $\times 1500$ на предметном стекле.

Подсчитывали долю (в %) эвагинированных и инвагинированных к общему числу протосколексов.

Состояние жизнеспособности также определяли по наличию известковых телец в протосколексах, при увеличении $\times 1000$ ($\times 10$ – окуляр, $\times 100$ – объектив) под микроскопом «Биолам». Показатель жизнеспособности подсчитывали путем нахождения процентного соотношения живых протосколексов к их общему числу.

2.4. Молекулярно-генетические исследования

ЭХИНОКОККОВЫХ КИСТ

Материалом для молекулярно-генетических исследований служили образцы ДНК, выделенные из клеток герминативной оболочки и протосколексов.

*Выделение ДНК из клеток *E. granulosus**

Соскабливали содержимое из внутренней поверхности оболочки эхинококкового пузыря, затем замораживали жидким азотом и растирали в фарфоровой ступке. Полученный материал суспендировали в 1 мл буфера TE (10 мМ трис-основание, pH=7,4 и 1мМ ЭДТА, pH=8,0). ДНК выделяли с протеиназой К. Для этого к 200 мкл взвеси из клеток добавляли лизирующий буфер (100 мМ NaCl; 50 мМ трис-HCl, pH= 8,0; 50 мМ ЭДТА, pH 8,0; 1 % SDS) 300 мкл и 500 мкг протеиназы К на пробу. Пробу инкубировали в течение 10 часов при температуре 56°C. Депротенинизацию и осаждение ДНК проводили стандартным фенол-хлороформным методом Sambrook J. et al., 1987 [233]. ДНК осаждали 96° этанолом, инкубировали при температуре -20°C в течение 15 минут и центрифугировали при 10 000 об/мин 10 минут. Осадок ДНК промывали 70° этанолом, затем просушивали его на воздухе и растворяли в деионизированной воде.

Генотипирование эхинококковых пузырей

В качестве маркера использовали фрагмент митохондриального гена *cox1*, кодирующего субъединицу 1 фермента цитохром-с-оксидазы *E. granulosus* [158]. Для получения фрагментов гена *cox1* применили метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК [31, 158, 183, 213]. ПЦР проводили на четырехканальном термоциклере «Терцик» научно-производственной фирмы «ДНК-Технология» (Москва). Использовали праймеры синтезированные в НПФ «Литех», ООО НПФ «Синтол» (Россия):

№1: 5'-TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT-3' (прямой);

5'-TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG-3' (обратный) [118] и №2:

5' TGTGTTGATTTTGCCTGG 3' (прямой);

5' GCCACCACAAACCAAGTATC 3' (обратный) [31].

Установили режим работы термоциклера: 1 цикл предварительной денатурации при температуре 94°C в течение 3 мин; 35 циклов с параметрами: денатурация при температуре 94°C в течение 30 сек, отжиг праймеров при температуре 52°C в течение 30 сек, элонгация цепи при температуре 72°C в течение 30 сек; финальная инкубация 1 цикл при температуре 72°C в течение 10 мин; хранение при температуре 16°C.

Продукты ПЦР амплификации анализировали электрофоретическим разделением смеси в 10 % ПААГ, после окрашивания бромистым этидием и визуализацией в УФ-свете на трансиллюминаторе ("Vilber Lourmat" ТСП-20М). В качестве маркера молекулярных масс использовали фрагменты ДНК плазмиды рUC 19/MSpI («СибЭнзим», Россия).

На четвертом этапе исследований провели анализ полиморфизма гена *CYP1A2* у больных эхинококкозом печени.

Молекулярно-генетическое исследование полиморфизма

гена CYP1A2 у больных эхинококкозом печени

В качестве объекта для молекулярно-генетических исследований использовали образцы ДНК, полученные из цельной периферической ве-

нозной крови больных эхинококкозом печени методом фенольно-хлороформной экстракции, описанным Mathew С.С. [253].

Выделение ДНК. 3 мл крови набирали в пробирку с консервантом тщательно перемешивали и переливали в центрифужный стакан на 100 мл, затем добавляли 50 мл охлажденного лизирующего буфера, содержащего 320 мМ сахарозы, 1 % раствор тритона X-100, 5мМ MgCl₂, 10мМ трисНСl (рН = 7,6). Смесь центрифугировали 20 мин. при 4 000 об/мин. К осадку добавляли 8 мл 25 мМ ЭДТА (рН=8,0) и суспензировали. К суспензии добавляли 0,8 мл 10 % SDS и протеиназу К (в концентрации — 10 мг/мл). Смесь помещали в термостат на 12 часов при температуре 38°С. Экстракцию ДНК осуществляли в следующем порядке: для депротеинизации к лизату приливали 0,5 мл 5М перхлората натрия и 8 мл фенола, насыщенного 1М трисНСl до рН = 7,8. Смесь центрифугировали при 3000 об./мин. в течение 10 мин. Отбирали водную фазу, содержащую ДНК, РНК и не денатурированные белки. Отобранную фазу обрабатывали смесью фенол-хлороформа (1:1), а затем — хлороформом. Препараты осаждали двумя объемами 96 % этанола. Образовавшийся осадок ДНК растворяли в 1,5 мл деионизированной Н₂О. Раствор хранили при температуре -20°С.

Геномное типирование

Полученную ДНК использовали для исследования полиморфизма 1 интрона *1F(C-163A) гена CYP1A2 (rs762551), локализованного в 15 хромосоме (15q22-qter) [97, 141, 179]. Применили метод ПЦР-ПДФ анализа (полиморфизма длин рестрикционных фрагментов продуктов полимеразной цепной реакции синтеза ДНК) в стандартных условиях [219]. Для амплификации маркерного фрагмента применяли локуспецифические олигонуклеотидные праймеры с температурой отжига 57°С:

5' TGAGGCTCCTTTCCAGCTCTCA3' (прямой)

5'AGAAGCTTGTGGCCGAGAAGG3' (обратный).

После амплификации ПЦР-продукты подвергали гидролизу эндонуклеазой AраI. Для этого 5 мкл амплификата смешивали с 5 ед фермента в буфере, согласно инструкциям производителей («Сибэнзим», Новосибирск) в течение 12 часов. Фрагменты ДНК разделяли электрофоретически в 7 – 8 % ПААГ, окрашивали раствором бромида этидия и анализировали на трансиллюминаторе. При обнаружении фрагментов ДНК размером 265 пн диагностировали генотип CYP1A2F1*A/A (AA) — «быстрого» метаболизера альбендазол-сульфоксида; при выявлении фрагментов длиной 265, 211 и 54 пн — генотип CYP1A2F1*A/C (AC) — с фенотипом «нормального» (поскольку наследование признака аутосомно-доминантное); и при обнаружении фрагментов ДНК размерами 211 и 54 пн — генотип CYP1A2F1*C/C (CC) — с фенотипом «нормального» метаболизера. Обнаружение генотипа CYP1A2F1*A/A позволяет выявить слабую эффективность химиотерапии альбендазолом и соответственно — развитие рецидива эхинококкоза печени после лечения (рисунок 5).



Рисунок 5 — ПЦР-ПДРФ продукты гена CYP1A2F1: дорожки 3, 5 — пациентов с генотипом AA; дорожка 4 — AC; дорожки 1, 2 — CC

3. ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДИАГНОСТИКИ ЭХИНОКОККОЗА ПО ВЫЯВЛЕНИЮ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ В КРОВИ

3.1. Способ отделения жидкой фазы крови от клеток крови

Для исследования крови ее забор производят в зависимости от требуемого количества или из пальца (до 0,1мл), или из крупных сосудов (1,0 и более мл). Для серологических методов исследования необходима жидкая фаза крови (сыворотка или плазма). Т.к. отделение жидкой фазы от клеток в небольшом объеме крови (0,1мл) невозможно, то и забор крови для такого исследования проводят из крупных сосудов.

Общеизвестно отделение жидкой фазы крови от клеток крови путем забора ее из крупных сосудов (1,0 и более мл), выдерживания при комнатной температуре до 1 часа, с последующим центрифугированием в течение 10 – 15мин. Используют надсадок. При таком заборе крови сосуды травмируются. Многократное введение иглы в сосуд (исследование крови на антитела или биохимический анализ при эхинококкозе) может привести к образованию мелких рубцов в месте травмирования сосудов. Существует также способ отделения жидкой фазы крови от клеток крови в небольшом объеме путем добавления в небольшую порцию крови десятикратного объема растворителя, содержащего антикоагулянт, выдерживанием смеси в холодильнике несколько часов (ночь) и удалением клеток крови центрифугированием. Используется надсадок.

Для такого способа необходимо выдерживать исследуемую пробу несколько часов (ночь) в холодильнике, требуются также антикоагулянты.

Отработан способ отделения жидкой фазы крови от клеток крови, позволяющий использовать небольшую порцию крови до 0,1мл, взятой из пальца. Это упрощает и ускоряет исследование крови на эхинококкоз без

использования центрифуги, антикоагулянтов и без травмирования крупных сосудов больных.

Если взятую из пальца кровь поместить на край полоски фильтрованной бумаги с размером капилляров меньше чем размер клеток крови и этот же край полоски, свободный от крови, поместить в 0,85 % раствор хлористого натрия, то согласно капиллярным свойствам фильтрованной бумаги, в ней будет происходить движение раствора к сухому концу полоски. Сливаясь с пятном крови, раствор будет вымывать жидкую фазу крови, продолжая движение по капиллярам, а клетки крови, имеющие больший диаметр, чем капилляры, будут зафиксированы на месте. Через несколько минут полоска полностью смачивается. Все белки крови (иммуноглобулины в том числе) смещаются в часть полоски выше (по ходу движения жидкости) пятна (эритроцитов) крови. Ее вырезают и помещают в небольшой объем 0,85 % раствора хлористого натрия. Жидкая фаза быстро диффундирует в раствор. Через несколько минут можно исследовать разбавленную сыворотку крови. Способ поясняется следующим примером: взятая из пальца кровь больного эхинококкозом печени в объеме 0,1мл заливают на край полоски 1,5 – 6,0см плотного ватмана, отступив от конца полоски 0,5 см так, чтобы кровяное пятно перекрывало полоску по ширине. Этот же край полоски опускают в пробирку с 0,85 % раствором хлористого натрия и объемом 0,5 мл. Уровень раствора должен быть не выше нижнего края кровяного пятна. Через 15 – 30 мин, после того как полоска полностью намокнет, ее вынимают, вырезают участок выше (по ходу движения жидкости) эритроцитарного пятна и помещают в 0,85 % раствор хлористого натрия объемом 0,5 мл. Выдерживают 5 мин., легко встряхивая. Затем производят забор раствора, который содержит белки жидкой фазы крови (в разведении 1:10).

Для определения антител в крови с помощью современных серологических реакций (РПГА, ИФА и др.) использует сыворотку или плазму крови в разведении. Для РПГА при выявлении антиэхинококковых анти-

тел используют сыворотку крови в разведении 1:100. Полученная таким образом сыворотка крови (1:10) разводилась до концентрации 1:100.

Для сравнения использовали известный способ отделения жидкой фазы крови от клеток крови – забор 5,0 мл крови из локтевой вены, выдерживали ее в пробирке при комнатной температуре 1,0 час, центрифугировали 15 мин. При 3000 об\мин, 0,1 мл надосадка (сыворотка крови) разводили в 100 раз 0,85 % раствором хлористого натрия. Результаты опытов, каждый из которых проводили 4 раза, приведены в таблице 1.

Таблица 1 — Активность антител в РПГА у больного эхинококкозом в крови при отделения жидкой фазы крови от клеток крови, взятой из вены и из пальца.

Эритроцитарный диагностикум	Среднегеометрический титр антител в РПГА при исследовании жидкой фазы крови, полученной	
	из вены	из пальца
эхинококковый	28600 + 1,0	23200 + 1,0
описторхозный	<100	<100

Видно, что в том и другом случаях титры выявляемых в РПГА противоэхинококковых антител фактически одинаковы. Вместе с тем, специфичность реакции сохраняется независимо от способа отделения жидкой фазы крови от клеток крови, т.к. с описторхозным эритроцитарным диагностикумом РПГА была во всех случаях отрицательной.

Таким образом, разработанный способ получения жидкой фазы крови из небольшого количества крови (0,05 – 0,1мл), взятой из пальца без использования антикоагулянтов и центрифуги, прост, без травматических повреждений крупных сосудов обследуемых.

3.2. Экспресс-диагностика с помощью реакции агглютинации в капиллярах

Известные экспресс-агглютинационные тесты просты, не требуют никакого оборудования. Однако по чувствительности они уступают иммуноферментным методам анализа, так как в них сигнал не усиливается.

В известных способах реакцию агглютинации в капиллярах проводят с сывороткой крови, наслаивая на нее раствор, иногда взвесь антигена или смешивая сыворотку с диагностикумом с размером капилляров значительно (более чем в 500 раз) превышающим размер носителя серологически активного вещества. Учет реакции осуществляют по появлению или отсутствию агглютинационного кольца или осадка в нижней части капилляра. Для всех экспресс-агглютинационных тестов в капиллярах обязательное условие - количество антигена или носителя серологически активного вещества было достаточным для визуального определения агглютината. Усиление сигнала как, например, в ИФА нет.

Разработана реакция агглютинации с усилением сигнала и повышением чувствительности реакции агглютинации в капиллярах. Принцип реакции в следующем: реакцию ставят с эхинококковым диагностикумом и для исследований берут кровь. Размер (диаметр) капилляров не должен превышать размер диагностикума (эритроцитарный, латексный или др.) в 1,5 – 4,0 раза. В место его нахождения вводят небольшое количество исследуемой крови. А затем этот же конец капилляров помещают в 0,85 % раствор хлорида натрия. Отрицательное капиллярное давление приводит к движению содержимого капилляров к другому, свободному концу капилляров, что хорошо видно по перемещению эритроцитов исследуемой крови- результат реакции отрицательный. Если в крови есть антитела к эхинококковому антигену, образуются агглютинаты, которые забивают капилляры скоплением агрегированных клеток и блокируют движение эритроцитов исследуемой крови по капиллярам – результат реакции по-

ложительный. В – реакции применяемый диагностикум используется в небольшом количестве и для его агглютинации требуется также небольшое количество антител, агглютинаты не видны невооруженным глазом, но хорошо прослеживается движение эритроцитов исследуемой крови по капиллярам. Это и есть своеобразное усиление сигнала, чувствительность реакции, следовательно, выше обычной реакции агглютинации.

Для работы брали полоску материала, состоящего из капилляров известного диаметра (фильтровальная бумага "Sartorius") 5,0 x 0,5 см, размер капилляров которой не превышал размер носителя эхинококкового антигенного диагностикума — (частицы латекса 1 μm) в 1,5 – 4,0 раза. На бумажную полоску, отступив от ее края 1,5 см, наносили латексный эхинококковый диагностикум (0,025 мл, 0,5 %). Ближе к этому же краю полоски вносили 0,025 мл цельной исследуемой крови. Сразу же свободный от крови край бумажной полоски опускали в 0,85 % раствор хлорида натрия. И наблюдали за перемещением эритроцитов исследуемой крови. Капля крови сначала сливалась с каплей диагностикума, продвигалась на 1,5-2,0 см и затем (визуализация по эритроцитам) останавливалась. Движение жидкой фазы (раствор 0,85 % хлорида натрия и сыворотка крови) продолжалось до другого конца полоски. Реакция положительная. В крови есть антитела к эхинококковому антигену. В случае если движение эритроцитов продолжается до другого конца полоски, реакция считалась отрицательной.

Однако четкости в результатах реакции не было. Иногда, с заведомо эхинококковой сывороткой больного и положительной в РПГА, основная масса эритроцитов крови задерживалась, но какая-то часть эритроцитов крови по краю полоски бумажки продолжала движение к другому концу капилляров. Такие результаты трудно было оценить. Связано это, видимо, с качеством материала. В фильтровальной бумаге диаметр капилляров неодинаков и колебания его значительные. К сожалению, подходящего материала с известным размером капилляров у нас не было.

В выборе подходящего материала для изготовления капилляров мы остановились на сефадексе. Известно, что хранится он в сухом виде, при добавлении воды гранулы сефадекса разбухают (всасывают жидкость) приобретая шаровидную форму. Количество поглощенной жидкости зависит от марки сефадекса. Чем больше цифра (от 10 до 200), тем больший объем жидкости поглощается, тем крупнее зерна влажного сефадекса.

Исходный размер гранул сухого сефадекса также разный и наименьший у сефадекса “superfine” 10 – 40μм. Мы выбрали сефадек “superfine” G-25. При максимальном насыщении жидкостью гранулы такого сефадекса увеличиваются в 1,5 – 2 раза. Сефадек G-25 выбран и потому, чтобы иммуноглобулины исследуемой сыворотки крови, имеющие вес более 150 КД, не проникали в гранулы сефадекса. В использовании сефадекса G-25 есть еще один плюс. Первая порция жидкости, попадающая в емкость с сефадексом состоит из жидкой фракции крови разбавленной 0,85 % раствором хлорида натрия. Сефадек вбирает в себя жидкость и молекулы, не превышающие молекулярный вес 5 КД. Но иммуноглобулины (М.в. 150 КД) остаются в капиллярном пространстве, где, собственно, и проходит реакция. В результате, диагностикум смешивается с первой волной жидкой фазы крови, в которой искусственно повышена концентрация исследуемых иммуноглобулинов. И это также должно повышать чувствительность теста.

Если поместить некоторое количество сухого сефадекса в емкость, например, в неширокую трубку, а затем добавить немного воды, гранулы сефадекса разбухают, тесно соприкасаясь, друг с другом. Между ними образуются щели, определенного размера, которые зависят от размера гранул. Причем, большие и небольшие гранулы распределяются между собой равномерно и поэтому размер капилляров будет примерно одинаковым. Более того, капилляры (пространство между гранулами сефадекса) имеют извитую форму и путь продвижения частиц будет значительно большим, чем высота слоя сефадекса, поэтому вероятность столкновения

и образования агрегатов должна быть выше, чувствительность реакции от этого также должна возрастать. Однако если ввести сефадекс в стеклянную трубку, закрыть один конец фильтровальной бумагой, чтобы он не высыпался и опустить этот конец в воду, сначала будем наблюдать относительно быстрое движение воды по капилляру вверх, затем движение становится медленнее и через некоторое время совсем прекратится. Гранулы сефадекса сама по себе представляют собой сеть очень мелких капилляров, т.к. сефадекс- это зернистый гель из поперечно сшитых молекул декстрана. Изменяя количество поперечных сшивок, получают гели различной степени пористости. Известно также, что чем меньше диаметр капилляра, тем выше поднимается жидкость по капилляру. Поэтому “всасывающая” способность каждой гранулы сефадекса весьма велика. Набухающие гранулы увеличиваются при ограниченном пространстве, но поскольку стенки трубки жесткие, внутреннее давление среды растет. Гранулы сефадекса сначала шаровидной формы под давлением начинают заполнять щели между гранулами, приобретая форму близкую к форме пенто- или секстаэдра, капиллярное пространство уменьшается и совсем исчезает, давление продолжает расти, поры гранул сефадекса сдавливаются и перекрывают их. Отрицательное капиллярное давление становится меньше давления создаваемого разбухшими гранулами сефадекса, движение жидкости прекращается. Но, если стенки трубки мягкие (например, резиновые) внутреннее давление передается на стенки раздвигает их, капиллярное пространство остается свободным. Причем, размер капилляров напрямую зависит от мягкости стенок трубки. Мы можем менять этот размер при использовании известного сефадекса, от исходного (пространство между влажными зернами сефадекса без внутреннего давления) до минимального (размера носителя серологически активного вещества).

Мы использовали резиновую трубку из мягкой и прозрачной резины (диаметр 2,5 мм, длина 1,5 – 2,0 см). Засыпали в нее сефадекс G-25, закрывали концы трубки небольшим количеством ваты, в один конец вно-

сили эхинококковый ЭД (0,025 мл, 0,2 %), сразу же вставляли в два конца трубки свернутый небольшой отрезок фильтровальной бумаги (н.2, длиной 2 см). На нее, отступив от края 1,0 см, наносили 0,025 мл цельной исследуемой крови. Сразу же нижнюю часть этой же полоски опускали в 0,85 % раствор хлорида натрия. И наблюдали за перемещением красного пятна крови (эритроцитов). Красное пятно смещается в сторону трубки, затем над красным пятном появляется полоска желтого цвета (плазма крови), которая опережает движение эритроцитов. Первой в трубку смещается жидкая фаза крови, затем эритроциты исследуемой крови. Если в пробе есть антитела к ЭД, образуются агглютинаты, блокирующие движение эритроцитов и красное пятно (визуализация по эритроцитам) останавливается. Движение жидкой фазы (раствор хлорида натрия и белки крови) продолжается до другого конца трубки и затем переходит на другую полоску фильтровальной бумаги. Реакция положительная. Если эритроциты продолжают движение и выходят на контрольную полоску фильтровальной бумаги, результат реакции отрицательный.

Были приготовлены 26 тест-систем и проверены с сыворотками 12 доноров и 24 больных эхинококкозом (с противозехинококковыми антителами в крови, результаты в РПГА положительные). Реакцию латекс-агглютинации (РЛА) ставили в пробирках с коммерческим диагностикумом. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 — Сравнительная эффективность разработанной реакции агглютинации в капиллярах с известными (РПГА, реакция латекс-агглютинации)

Больные эхинококкозом, доноры (количество)	Количество больных с положительным результатом в		
	РПГА	РЛА	реакции агглютинация в капиллярах
Больные 24 чел	20 (83,3 %)	18 (75 %)	20 (83,3 %)
Доноры 12 чел.	1 (8,3 %)	1 (8,3 %)	1 (8,3 %)

Во всех случаях результаты в РПГА совпали с результатами по экспресс-тесту. Чувствительность РЛА была ниже. Специфичность тестов была одинаковой.

Т.о. разработан принципиально новый экспресс-тест по индикации антител в крови. Реакцию проводят с эхинококковым диагностикумом и для исследований берут кровь. Размер (диаметр) капилляров не превышает размер диагностикума (эритроцитарный, латексный или др.) в 1,5 – 4,0 раза. При положительном результате реакции — блокируется движение эритроцитов исследуемой крови по капиллярам. При отрицательном — хорошее движение эритроцитов по капиллярам продолжается до другого конца капилляров. Учет результатов простой, не требует специального оборудования и навыков работы.

3.3. Повышение эффективности ИФА в диагностике эхинококкоза

С целью приготовления ИФА тест-системы для диагностики эхинококкоза в качестве антигена чаще всего применяют ЭЖ. Известно, что ЭЖ представляет собой смесь собственно паразитарных антигенов, часть из которых являются общими и для других паразитов, и антигенов хозяина, прежде всего сывороточных компонентов. Неспецифические результаты реакции при использовании такого сенситина связывают с антигенами хозяина и гетерогенными антигенами паразита. Убрать их из ЭЖ и оставить только специфические антигены эхинококка сложно. Иногда используют полуочищенную ЭЖ, однако, в процессе получения такого антигена с удалением неспецифических компонентов удаляются и специфические антигены паразита, прежде всего так называемые неосновные антигены эхинококка, которых в ЭЖ мало, некоторых очень мало. Основных антигенов в ЭЖ значительно больше, чем каких-либо других специфических компонентов и, даже при разведении исходной ЭЖ, их вполне достаточно

для выявления антител. Важным условием в приготовлении чувствительных эхинококковых тест-систем является присутствие в сенситине всей специфической и разнообразной мозаики эхинококковых антигенов, и не менее важно, чтобы количество этих антигенов было достаточным для выявления антител к ним у больных эхинококкозом. Известно, что каждый организм реагирует на одни и те же антигены совсем неоднозначно. У значительной части больных эхинококкозом выявляются антитела к основным антигенам, у некоторых по данным Barbieri M. et al. некоторые сыворотки не реагируют с основным эхинококковым антигеном (Аг 4), но реагируют с эхинококковым пептидом М.В. 89-122 КД. Поэтому, в тест-системе должен быть представлен как можно более полный ассортимент специфических эхинококковых антигенов. Иногда в приготовлении ИФА тест-систем применяют не ЭЖ, а искусственные основные (4 и 5) эхинококковые антигены. Специфичность ИФА с такими тест-системами высокая, но чувствительность недостаточная. Отчасти потому, что не у всех больных эхинококкозом есть антитела к основным антигенам паразита.

Нашей задачей было повысить специфичность и чувствительность эхинококковых ИФА тест-систем при использовании в качестве сенситина — ЭЖ. Чувствительность тест-систем в диагностике эхинококкоза должна иметь, видимо, приоритетное значение, пусть иногда в ущерб специфичности. Подобно диагностике ВИЧ, когда положительные результаты в первичных тестах (ИФА) выявляются все больные ВИЧ 1,2 плюс какая-то часть других больных (ложноположительный результат). Но с помощью вторичного, подтверждающего теста (иммуоблотинг) ставится окончательный и верный диагноз больным ВИЧ 1,2. Основная задача в диагностике ВИЧ 1,2 и также эхинококкоза — не пропустить больного и своевременно поставить диагноз. Ведь успех оперативного лечения больных эхинококкозом во многом зависит от стадии заболевания. Чем раньше выставлен диагноз, тем эффективнее лечение.

Для приготовления диагностических тест-систем на эхинококкоз лучшим источником антигена является ЭЖ из печени овцы. Известно, что концентрация белков в ЭЖ может колебаться значительно, что, в основном, зависит от зрелости цисты. Желательным является использование ЭЖ из плодоносных цист, т.к. в такой ЭЖ количество паразитарных антигенов выше. Выбор сенсibiliзирующей дозы каждой серии ЭЖ осуществляется отдельно. В ИФА при использовании ЭЖ в качестве сенси-тина, кроме положительных у больных эхинококкозом встречаются и ложноположительные результаты у других больных. Расчет сенсibiliзирующей концентрации ЭЖ и степень разведения исследуемых сывороток крови определяют по формуле, в которой учитывается количество положительных и ложноположительных результатов. Эти параметры должны быть такими, чтобы чувствительность ИФА была наивысшей при наименьших показателях неспецифичности.

Для приготовления ИФА тест-системы проводили забор ЭЖ из плодоносных эхинококковых цист, паразитирующих в печени овец. Сенсibiliзирующее разведение ЭЖ для приготовления ИФА тест-систем обычно составляет 1:160, а используемое разведение сывороток крови — 1:50.

В процессе работы по определению сравнительной чувствительности разных реакций в диагностике эхинококкоза 41 больного эхинококкозом у четверых, результаты ИФА оказались отрицательными (чувствительность 90,2 %). Причиной этому могло быть: 1) полное отсутствие каких-либо специфических антител; 2) противоэхинококковые антитела присутствуют, но к неосновным антигенам эхинококка и в недостаточном для выявления в ИФА количестве (низкая концентрация этих антигенов в ЭЖ); 3) есть специфические антитела к основным антигенам, но их мало и недостаточно в используемом разведении (1:50) и объеме (100 мкл) сыворотки. Логично было для выявления антител к неосновным антигенам повысить их концентрацию путем использования для сенсibiliзации менее

разбавленную ЭЖ. «Емкость» всех антигенов ЭЖ и самое важное не основных увеличивается, что повышает вероятность выявления антител к ним. Однако, только в двух случаях (сыв. № 6 и 7) из четырех оптическая плотность (ОП) в ИФА превысила диагностический уровень. Видно, что ОП растет с увеличением концентрации сенситина и фактически не зависит от используемого разведения исследуемых сывороток. Особенно это хорошо видно на примере сыв. №7. ОП с уровня ниже диагностического при использовании ЭЖ в разведении (1:160) до очень высоких значений (2,456), результат, который можно оценить как резко положительный. Однако, в двух других случаях (сыв. № 2 и 5) ОП в ИФА фактически не изменилась при повышении концентрации сенситина. Причиной этому мог быть третий вышеназванный вариант. Для его подтверждения необходимо было повысить концентрацию исследуемых сывороток. Количество специфических антител в лунке планшета, которых недостаточно при разведении сывороток 1:50, будет больше и ОП в ИФА превысит диагностический уровень.

Из таблицы 3 видно, что так и получилось. ОП с сыв. № 2 и 5 превысила диагностический уровень, причем антитела выявляются при использовании относительно высокой концентрации сывороток (разведение 1:10). При повышении концентрации ЭЖ и сыворотки также меняется чувствительность ИФА у больных эхинококкозом с положительными результатами реакции. В табл.3 представлены образцы четырех сывороток (1, 3, 4, 8). С сыв. № 1 – такое увеличение концентрации только незначительно повышает чувствительность ИФА, при изменении же концентрации ЭЖ такого эффекта не наблюдалось. С сыв. № 3 и 4 чувствительность ИФА повышается значительно и зависит только от повышения концентрации сывороток и совсем не зависит от изменения концентрации ЭЖ. Чувствительность ИФА с сыв. № 8 зависит от концентрации ЭЖ и сыворотки.

Таким образом, увеличение концентрации ЭЖ в процессе приготовления ИФА тест-системы и исследуемых сывороток крови, позволяет повысить выявляемость больных эхинококкозом до 100 %.

Однако, по таблице 3, видно, что в некоторых случаях ОП ИФА с неспецифическими сенситинами (из *T.saginata*, печени и сыворотки овцы) при увеличении концентрации изучаемых сывороток растет, поэтому логично было предположить, что увеличение концентрации ЭЖ и исследуемых сывороток, может привести к увеличению ложноположительных результатов в ИФА.

Таблица 3 — Зависимость сенсibiliзирующей концентрации ЭЖ и разведения сывороток крови на результаты ИФА у некоторых (8 из 41) больных эхинококкозом.

Сыворотки крови больных и их разведения	Оптическая плотность, определяемая в ИФА с сенситином									
	Эхинококковая жидкость в разведении						<i>T.saginata</i>	Сыворотка овцы	Печень овцы	
	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160				
1	1:10	1,291	1,211	1,093	1,150	1,212	0,895	0,600	0,406	0,465
	1:25	1,204	1,155	1,174	1,268	1,097	0,911	0,400	0,380	0,266
	1:50	1,042	1,054	1,123	1,021	1,027	0,959	0,304	0,338	0,210
2	1:10	0,704	0,742	0,716	0,602	0,425	0,414	0,120	0,110	0,092
	1:25	0,122	0,139	0,132	0,119	0,132	0,124	0,099	0,150	0,101
	1:50	0,097	0,110	0,098	0,102	0,114	0,085	0,091	0,070	0,090
3	1:10	1,720	1,690	1,653	1,607	1,507	1,470	0,222	0,187	0,121
	1:25	1,292	1,232	1,071	0,989	0,918	0,884	0,153	0,120	0,077
	1:50	0,689	0,673	0,645	0,599	0,584	0,589	0,154	0,085	0,066
4	1:10	1,964	1,901	1,891	1,889	1,802	1,601	0,595	0,460	0,071
	1:25	1,380	1,253	1,150	1,090	1,047	0,900	0,473	0,340	0,078
	1:50	0,986	0,977	0,916	0,870	0,872	0,701	0,260	0,148	0,064
5	1:10	0,571	0,513	0,561	0,591	0,490	0,414	0,121	0,098	0,099
	1:25	0,122	0,139	0,132	0,119	0,132	0,124	0,089	0,101	0,121
	1:50	0,097	0,110	0,098	0,102	0,114	0,085	0,083	0,088	0,079
6	1:10	0,712	0,683	0,640	0,590	0,412	0,321	0,292	0,342	0,138
	1:25	0,672	0,551	0,470	0,429	0,301	0,250	0,152	0,256	0,111
	1:50	0,579	0,502	0,421	0,320	0,254	0,101	0,145	0,155	0,089
7	1:10	2,249	1,423	0,976	0,520	0,424	0,212	0,620	0,376	0,311
	1:25	2,450	1,430	1,120	0,499	0,390	0,270	0,590	0,324	0,289
	1:50	2,365	1,490	1,010	0,480	0,360	0,199	0,580	0,332	0,350
8	1:10	1,838	1,552	1,342	1,129	1,173	0,860	0,691	0,771	0,266
	1:25	1,141	1,001	1,076	0,970	0,898	0,785	0,658	0,628	0,288
	1:50	0,997	0,899	0,955	0,812	0,799	0,740	0,640	0,690	0,233

При исследовании 104 контрольных сывороток больных с различными заболеваниями в ИФА при использовании рассчитанного разведения ЭЖ в качестве сенситина — 1:160 и исследуемых сывороток — 1:50 с ЭЖ (1 и 2 серии) результаты были положительными в 11 случаях (специфичность 89,4 %), с повышенной концентрацией сенситина (ЭЖ-1:5) и сывороток (1:10) в 18 (специфичность 82,6 %) (таблица 4).

Таблица 4 — Результат ИФА с сыворотками доноров.

№ сыворотки	Разведение сыворотки	Оптическая плотность при разведении ЭЖ		
		1:2	1:10	1:50
2	1:10	1,808	1,587	1,522
	1:50	1,075	0,827	0,794
4	1:10	2,063	1,773	1,635
	1:50	0,890	0,806	0,765
7	1:10	1,248	1,137	1,169
	1:50	0,559	0,536	0,417
9	1:10	0,631	0,421	0,463
	1:50	0,284	0,299	0,267
12	1:10	0,646	0,595	0,572
	1:50	0,384	0,350	0,356
18	1:10	0,783	0,660	0,501
	1:50	0,325	0,280	0,267
19	1:10	1,248	1,137	1,169
	1:50	0,352	0,343	0,374
28	1:10	0,687	0,659	0,612
	1:50	0,326	0,301	0,309
32	1:10	2,656	2,262	2,088
	1:50	2,012	2,093	1,926
34	1:10	1,036	0,978	0,925
	1:50	0,462	0,412	0,393
54	1:10	1,088	0,957	1,085
	1:50	0,594	0,530	0,513
76	1:10	1,749	1,162	1,124
	1:50	0,520	0,492	0,369
80	1:10	0,946	0,521	0,494
	1:50	0,201	0,175	0,173
81	1:10	0,630	0,635	0,590
	1:50	0,312	0,320	0,326
84	1:10	0,908	0,890	0,895
	1:50	0,390	0,397	0,350
88	1:10	0,576	0,520	0,512
	1:50	0,214	0,241	0,247
90	1:10	1,692	1,193	1,135
	1:50	0,460	0,510	0,384
104	1:10	0,746	0,730	0,760
	1:50	0,780	0,712	0,701

При увеличении сенсibiliзирующей концентраций ЭЖ и сыворотки в рабочей лунке повышается не только общее количество всех специфических антигенов и антител, но в той же мере и неспецифических. Рост ОП в ИФА зависел в подавляющем числе случаев от повышения концентрации исследуемых сывороток. Только в двух случаях отмечалось увеличение ОП при повышении сенсibiliзирующей дозы ЭЖ. Значит неспецифических компонентов в ЭЖ, за счет которых наблюдались ложноположительные результаты в ИФА, было достаточным и при разведении ЭЖ 1:160, а специфических антител иногда явно не хватало.

Известно, что неспецифические результаты серологических реакций в диагностике эхинококкоз часто являются следствием проявления активности общих с эхинококком антигенов других паразитов (прежде всего *T.saginata*) и компонентов хозяина паразита (сывороточных и тканевых). Логично было для повышения специфичности реакции убрать антитела к этим антигенам путем истощения. Предполагалось, что после этого все неспецифические результаты исчезнут. Предварительно провели исследование ложноположительных сывороток в ИФА с этими сенситинами (таблица 5).

Сенсibiliзирующая концентрация антигенов была заведомо завышенной (200 мкг/мл). В 9 из 18 случаев результат был положительный с *T.saginata*, лишь в одном с сывороткой овцы и ни одного положительного результата с печенью хозяина паразита.

Таблица 5 — Сыворотки доноров с ложноположительными результатами в ИФА.

№ сыв-ки	Результаты ИФА при использовании сенситина							Результаты ИФА с ЭЖ 1 после истощения антигеном	
	ЭЖ 1	ЭЖ 2	T.sag.	Сыв. овцы	Печень овцы	Цистицер.	Трихинелл.	T.sag. **	Сыв. овцы
2	1,808	1,837	0,371	0,142	0,090	0,618	0,525	-	-
4	1,069	0,835	0,462	0,242	0,095	0,374	0,827	0,201	-
7	1,104	0,735	0,323	0,220	0,100	-	-	-	-
9	0,631	1,012	0,332	0,168	0,151	-	-	0,241	-
12	0,646	1,045	0,413	0,192	0,173	-	-	0,236	-
18	0,783	1,162	0,221	0,117	0,084	-	-	-	-
19	1,248	1,414	0,439	0,222	0,123	-	-	-	-
28	0,687	0,975	0,159	0,124	0,083	0,338	0,536	-	-
32	2,656	1,263	0,168	0,096	0,073	0,556	0,560	-	-
34	1,036	1,633	0,626	0,125	0,074	-	-	0,153	-
54	1,088	1,241	0,252	0,110	0,080	0,579	0,552	-	-
76	1,749	1,522	0,512	0,266	0,196	-	-	0,243	-
80	0,946	1,124	0,311	0,138	0,117	-	-	-	-
81	0,630	1,141	0,559	0,122	0,143	-	-	0,222	-
84	0,908	2,108	0,841	0,303	0,200	-	-	0,189	-
88	0,576	0,713	0,358	0,148	0,175	-	-	0,365	-
90	1,692	1,662	0,398	0,111	0,131	0,787	0,723	-	-
104	0,746	2,398	0,771	1,563	0,237	-	-	0,117	0,771
Сыворотки больных эхинококкозом									
9	2,197	2,390	0,976	-	-	0,768	0,723	2,099	-
10	1,921	1,829	0,389	-	-	0,572	0,482	1,878	-
Примечания:									
1)*- постановка ИФА с этими антигенами проводилась не со всеми сыворотками.									
2)**- истощались не все сыворотки.									

Проводили истощение неспецифических антител в этих сыворотках водно-солевым экстрактом *T.saginatae* и сывороткой овцы. В качестве контроля использовали 9 и 10 сыворотки больных эхинококкозом. ОП в ИФА до истощения и ОП после истощения сывороток антигеном *T.saginatae* была фактически одинаковой, несмотря на то, что в 9 сыворотке антител к общим с *T.saginatae* антигенам было достаточно много (ОП=0,976). Видимо, из-за того, что суммарная активность противоэхинококковых антител при разведении сыворотки 1:10, превышает общую активность реагирующих с ними специфических эхинококковых антиге-

нов, поэтому удаление из реакции части неспецифических антител к *T.saginata* не снижает ОП в ИФА.

Проводили истощение только тех сывороток, с которыми отмечали положительный результат в ИФА с *T.saginata*. Неспецифические антитела после истощения антигеном *T.saginata* полностью удаляются. Результаты ИФА с ЭЖ после истощения становятся отрицательными, специфичность повысилась до 91,3 %. С сывороточным антигеном лишь одна сыворотка (н.104) была положительной. Ее истощение сывороточным антигеном лишь несколько снизило величину ОП в ИФА с ЭЖ (возможно количество используемого антигена было недостаточным). С тканевым антигеном печени все результаты были отрицательными. В ИФА с цистцеркозным и трихинеллезным антигенами некоторые сыворотки также давали положительный результат. Однако, истощение этими антигенами перекрестно реагирующих антител было неполным и хуже чем с антигеном *T.saginata*.

Однако, оставшиеся 9 сывороток из 18 не реагировали ни с паразитарными ни с тканевыми антигенами. Тогда за счет каких компонентов, присутствующих в ЭЖ, ИФА была положительной? Мы обратили внимание, на разную активность изучаемых сывороток в ИФА с разными сериями ЭЖ (см. таблицу 5). В двух случаях ОП фактически была одинаковой. В четырех активность с 1 серией ЭЖ была выше, а в одиннадцати со 2 серией. Такое возможно лишь в том случае, если антигенный состав ЭЖ 1 и 2 серий различается значительно. ЭЖ — это продукт жизнедеятельности паразита и общее количество всех специфических антигенов ЭЖ может различаться от серии к серии, но их количественное соотношение и качественный состав остается примерно одинаковым, как, основное, свойство постоянства любого живого организма. Качественный и количественный состав ЭЖ может меняться и значительно, но только за счет неспецифических сывороточных и тканевых антигенов хозяина паразита. Эти антигенные компоненты можно не учитывать, т.к. как видно из таб-

лицы 5, лишь одна сыворотка прореагировала с сывороточным антигеном овцы и ни одна с тканевым антигеном.

Какие-то другие антигены были причиной ложных результатов реакции. Мы предположили, что это может быть загрязняющая ЭЖ микрофлора. Она может попадать в ЭЖ в процессе ее сбора в убойном цехе (технология этого процесса позволяла предположить возможным такой вариант) или забор уже инфицированной ЭЖ из цисты.

ЭЖ прекрасная питательная среда для микрофлоры с сывороточными и паразитарными белками. Попав в небольшом количестве, она может быстро размножаться. Технология сбора ЭЖ для приготовления диагностических тест-систем следующая: в убойном цехе отбирается печень и легкие животных пораженные эхинококком; место прокола цисты обрабатывается спиртом; в процессе забора ЭЖ определяют ее пригодность по прозрачности, если ЭЖ прозрачная или немного опалесцирует, ее собирают в чистую емкость, если ЭЖ мутная ее выливают, шприц опаласкивают 0,85 % раствором хлорида натрия и продолжают сбор ЭЖ. После сбора достаточного количества ЭЖ в лаборатории ее фильтруют или центрифугируют для удаления протосколексов; надосадов консервируют азидом натрия и ЭЖ помещают в холодильник 4°C. С момента начала забора ЭЖ до консервирования проходит несколько часов, время достаточное для размножения микрофлоры.

Для приготовления любых тест-систем обязательным условием забора ЭЖ является ее прозрачность, т.к. непрозрачная, иногда очень мутная ЭЖ, может свидетельствовать о загрязнении ее микрофлорой. Такая ЭЖ бракуется. Используется обычно прозрачная или немного опалесцирующая ЭЖ. Но это визуальная характеристика ЭЖ. Однако, известно, что прозрачность раствора не является гарантией того, что он не загрязнен микрофлорой. Тем более, свойством "мутить" питательную среду, что можно определить визуально, обладают бактерии S-формы, а при размножении бактерий R-формы питательная среда долго остается прозрач-

ной. Мутность питательной среды зависит не только от свойств микроорганизмов, но и от их количества. Можно обозначить несколько вариантов попадания микрофлоры в ЭЖ: из инфицированной цисты, визуально ЭЖ прозрачная или опалесцирующая; в процессе забора ЭЖ в убойном цехе — из окружающей среды; из бракованной цисты- ЭЖ выливается, шприц опаласкивается, но на стенках шприца остается микрофлора из этой цисты, в процессе дальнейшего забора ЭЖ она попадает в общую серию ЭЖ.

Для подтверждения гипотезы о том, что причиной ложноположительных результатов в ИФА является использование в качестве сенситива бактериально загрязненной ЭЖ, мы провели опыт по истощению сывороток взвесью различной микрофлорой. К исследуемой сыворотке крови 1:10 добавляли равный объем микробной взвеси (концентрация 2×10^9 мк/мл) в контроле — к исследуемой сыворотке 1:10 добавляли равный объем 0,85 % раствора хлорида натрия. Результаты представлены в таблице 6.

Видно, что полное истощение антител наблюдалось с той же серией ЭЖ, которая применялась для сенсibilизации лунок планшет. Только при истощении листериями и стафилококками наблюдалось некоторое снижение ОП. Другая микрофлора не удаляет неспецифические антитела. Но листерии, стафилококки и энтерококки, которые не использовали для истощения, имеют общие антигены. Видимо, причиной ложноположительных результатов является другая микрофлора, не использованная в опыте.

Таблица 6 — Результаты истощения микрофлорой ложноположительных и эхинококковой сывороток.

Микрофлора и антиген	ОП в ИФА после истощения сывороток			
	Ложноположительных №			Эхинококковой № 9
	2	4	104	
Стафилок.эпид.	0,908	0,974	0,503	1,842
Листерии	1,309	0,905	0,670	1,825
Бруцеллы	1,360	1,370	0,621	1,808
Шигеллы	1,326	1,341	0,690	1,876
Сальмонеллы	1,399	1,389	0,675	1,854
Трепонемы пал.	1,388	1,376	0,693	1,863
Антропоиды	1,405	1,409	0,610	1,811
Киш.палочка	1,344	1,396	0,698	1,876
Иерсинии энт.	1,301	1,341	0,610	1,901
Иерсинии псевд.	1,352	1,390	0,631	1,853
ЭЖ	0,148	0,174	0,09	0,120
Результаты ИФА без истощения (контроль)				
	1,315	1,351	0,602	1,806

Применили другой подход. Пораженную эхинококком печень и легкие от овцы привезли в лабораторию. Для удаления микрофлоры с поверхности органов их тщательно промыли проточной, затем дистиллированной водой. Забор ЭЖ из цист проводили в стерильном боксе. Место прокола цисты тщательно обрабатывали спиртом. Для каждой цисты использовали одноразовый шприц и стерильную пробирку. Провели забор ЭЖ из 14 цист (диаметром от 2 до 4 см). Во всех случаях ЭЖ была прозрачной, иногда с небольшой опалесценцией. Проводили посев содержимого каждой цисты на мясо-пептонный агар. В шести случаях была высеяна микрофлора (не идентифицированные кокки). В пяти — колонии были единичными, в одном отмечался сплошной рост. С этими шестью сериями ЭЖ поставили ИФА, проверили четыре ложноположительные и две эхинококковые сыворотки. Немаловажно, что все образцы ЭЖ взяты из органов одного животного, поэтому антигенные компоненты хозяина, присутствующие в ЭЖ не могли влиять на результаты ИФА (таблица 7).

Таблица 7 — Результаты в ИФА ложноположительных и эхинококковых сывороток при использовании разных серий ЭЖ.

№ сыворотки	ОП в ИФА при использовании в качестве сенситива ЭЖ №					
	1	2	4	5	9	14
9 эхин.	1,790	1,701	1,502	1,830	1,710	1,820
10 эхин.	1,670	1,550	1,320	1,750	1,540	1,630
2	0,345	0,308	1,001	0,512	0,377	0,669
32	0,245	0,324	0,824	0,369	0,354	0,348
51	0,402	0,480	1,362	0,627	0,530	1,228
54	0,451	0,456	1,220	0,586	0,503	0,803

Видно, что значения ОП меняются существенно и неодинаково для ложноположительных сывороток. Для сыворотки № 32 наименьшее значение ОП отмечено при использовании ЭЖ № 1, а наибольшее с ЭЖ № 4, с другими сериями ЭЖ оно было примерно одинаковым. Для 2, 51 и 54 сывороток с ЭЖ сер. 1, 2, 5, 9 оно было фактически равным, но с 4 и 14 сериями эти показатели были наивысшими.

Для эхинококковых сывороток значения ОП со всеми сериями ЭЖ фактически не отличались. Несколько меньшие показатели ОП отмечены с ЭЖ № 4, но с ней ложноположительные сыворотки дают наивысшие значения. Эти результаты подтверждают предположение о том, что эхинококковые и ложноположительные сыворотки взаимодействуют с разными антигенами, присутствующими в ЭЖ.

В дальнейшем все полученные образцы ЭЖ в стерильных условиях собрали в одну емкость. Часть ЭЖ законсервировали азидом натрия для sensibilization лунок, а другую оставили при комнатной температуре на 2 дня. Через 2 дня незаконсервированная ЭЖ сильно помутнела - результат размножения микрофлоры обнаруженной в ЭЖ. Ее отцентрифугировали при 3000 об/мин 20 мин.

Полученный осадок дважды отмыли 0,85 % раствором хлорида натрия в том же режиме и довели концентрацию по стандарту мутности до 2 млрд/мл. Эту взвесь использовали для истощения ложноположительных и эхинококковых сывороток. Результаты представлены в таблице 8.

Таблица 8 — Результаты ИФА с ложноположительными и эхинококковыми сыворотками после истощения бактериальной взвесью.

ЭЖ №	Микрофлора	ОП в ИФА при истощении сывороток					
		9 эхин.	10 эхин.	2	32	51	54
1	Стафил.эпид.	1,945	1,785	0,545	0,569	0,707	0,620
	Стрептококк	1,901	1,815	0,703	0,524	1,062	0,730
	Листерии	1,917	1,852	0,638	0,490	0,926	0,750
	Выдел.микр.	1,874	1,807	0,249	0,231	0,272	0,260
	Контроль	1,936	1,806	0,931	0,598	1,219	0,798
2	Стафил.эпид.	1,961	1,850	0,882	1,576	0,988	1,201
	Стрептококк	1,840	1,909	0,984	1,593	1,060	0,890
	Листерии	1,896	1,789	0,640	1,561	0,753	0,920
	Выдел.микр.	1,769	1,740	1,096	1,525	0,503	1,040
	Контроль	1,875	1,830	1,095	1,616	1,150	1,121

С ЭЖ 1 в ИФА, после истощения выделенной микробной культурой, значения ОП снижаются до уровня ниже диагностического со всеми ложноположительными сыворотками, а с эхинококковыми сыворотками остаются такими же, что является абсолютным доказательством участия выделенной микрофлоры цист в ложноположительных результатах ИФА (специфичность повысилась до 95,1 %). С ЭЖ 2 только с сывороткой 2 при использовании для истощения листерий отмечается некоторое снижение значений ОП, и с 51 сывороткой при истощении листериями и выделенной микрофлорой. Значения ОП с эхинококковыми сыворотками без истощения или с истощением фактически не меняются. Интересно, что значение ОП для ЭЖ 2 с сывороткой 32, не реагирующей на истощение, более высокое, чем с ЭЖ 1. Видимо, в ЭЖ 2 присутствуют другие антигенные компоненты (возможно бактериальные) отличающиеся от выделенной микрофлоры, но антитела к которым присутствуют в этих сыворотках.

Таким образом, ЭЖ может быть загрязнена микрофлорой, попавшей в паразитарную цисту *in vivo*. Причиной неспецифических результатов в ИФА могут быть антигены эхинококка общие с *T.saginata* и микрофлора ЭЖ. Специфичность ИФА можно повысить истощением исследуемых сывороток экстрактом *T.saginata* и микрофлорой, выделенной из ЭЖ и используемой в качестве сенситина для ИФА.

4. СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ДИАГНОСТИКИ ЭХИНОКОККОЗА ПЕЧЕНИ, ОСЛОЖНЕННОГО ПЕРФОРАЦИЕЙ В ЖЕЛЧНЫЕ ПРОТОКИ

Своевременная диагностика осложненного перфорацией в желчные протоки эхинококкоза печени имеет существенное значение, т.к. от этого зависит тактика оперативного вмешательства и, в конечном итоге, успех операции.

Даже использование современных инструментальных методов обследования больных (УЗИ, компьютерная томография) не позволяет точно диагностировать это осложнение. Нельзя также провести дифференциальную диагностику осложненного перфорацией и не осложненного эхинококкоза по определению сывороточных антиэхинококковых антител. Микроскопия порции С желчи больного также малоэффективна и может дать положительный результат только в первые часы или дни после перфорации и то только при наличии плодоносной цисты (при наличии дочерних клеток). Перспективным для диагностики осложненной перфорацией эхинококкоза представляется индикация эхинококковых антигенов. Ранее индикация эхинококковых антигенов проводилась только при осложненном перфорацией эхинококкозе легких (в бронхиальных смывах) и почек (в моче). Работ по индикации эхинококкового антигена в желчи при осложненном перфорацией в желчные протоки эхинококкозе печени, в доступной литературе, нами не обнаружено.

Простым, но в тоже время эффективным методом индикации эхинококковых антигенов (как свободных, так и в составе иммунных комплексов) является РПГА с использованием антительных ЭД. Однако, ранее при получении антительных эхинококковых ЭД применялись сыворотки крови людей больных эхинококкозом. Попытки же получить антительные эхинококковые ЭД из кроличьих иммунных сывороток (даже при наличии высоких титров антител – 1:25600) оказались безуспешными.

Поэтому нами была поставлена задача - разработать способы получения кроличьих иммунных сывороток, пригодных для получения эффективных эхинококковых антительных ЭД и использовать это в практической медицине.

4.1. Получение гипериммунных эхинококковых кроличьих сывороток

Нами было предложено и апробировано два метода получения иммунных кроличьих сывороток: путем последовательной иммунизации кроликов эхинококковой жидкостью, полученной из паразитов различной локализации от разных видов животных (эхинококкоз печени овцы и эхинококкоз легких КРС) и с использованием биоиммуносорбента из протосколексов эхинококковой цисты.

4.1.1. Получение иммунной сыворотки путем последовательной иммунизации кроликов

Наши неоднократные попытки приготовить эхинококковый антительный ЭД из антиэхинококковой сыворотки кролика были безуспешны, хотя титр антиэхинококковых антител, выявляемых в РПГА был достаточно высоким (до 1:25600). Известно, что эхинококковая жидкость является смесью паразитарных антигенов и антигенов хозяина паразита (сывороточные и тканевые), причем вторые являются достаточно мощными иммуногенами. Поэтому у кролика, иммунизированного эхинококковой жидкостью, появляются антитела и к тем, и к другим антигенам. Из такой антисыворотки с высокой активностью антител разной специфичности приготовить антительный ЭД невозможно.

Эти антитела в процессе сенсibilизации эритроцитов конкурируют с антиэхинококковыми антителами, что ведет к уменьшению числа противоэхинококковых антител на поверхности эритроцитов.

Общеизвестны основы иммунитета - любое чужеродное живому организму вещество к антигенным детерминантам этого вещества появляются иммунокомпетентные клетки и через 6 – 7 дней В-лимфоциты начинают продуцировать антитела. Интенсивность синтеза антител не одинаковая, она зависит от многих факторов (иммуногенность, повторность введения и т.д.). Иммунокомпетентные клетки одной специфичности могут сохраняться долгое время (иногда несколько лет). На повторное введение антигена реакция иммунной системы происходит значительно быстрее и мощнее, т.к. иммунокомпетентные клетки данной специфичности находятся в организме и готовы к встрече с этим антигеном, это известный феномен “иммунологической памяти”.

Схема экспериментов состояла в следующем: если ввести кролику в первых сериях иммунизации эхинококковую жидкость из эхинококковой кисты печени овцы, а через определенное время, когда антитела ко всем компонентам эхинококковой жидкости (паразитарным и непаразитарным) исчезнут, ввести эхинококковую жидкость из эхинококковой кисты легкого крупного рогатого скота, то у кролика появятся антитела, прежде всего к тем антигенам, которые уже были в его организме и контактировали с его иммунной системой, т.е. к общим антигенам первой и второй серии эхинококковой жидкости, а это и есть собственно паразитарные антигены. Сывороточные и тканевые антигены овцы и крупного рогатого скота - разной специфичности, поэтому “клетки памяти” иммунной системы, появившиеся на введение сывороточных и тканевых (печеночных) компонентов овцы, не будут задействованы при повторном введении сывороточных и тканевых (легочных) антигенов крупного рогатого скота.

Была отработана схема получения такой специфичной антиэхинококковой кроличьей сыворотки, из которой мы смогли приготовить анти-ЭД.

Провели последовательную иммунизацию кроликов ЭЖ, полученную из эхинококковой кисты печени овцы и ЭЖ, полученной из эхинококковой кисты легких крупного рогатого скота по следующей схеме. В первой серии иммунизации 6 кроликам 4 раза с интервалом 10 – 12 дней вводили ЭЖ, полученной из эхинококковой кисты печени овцы, подкожно, в концентрации 20 мг/мл (1,0 мл) с адьювантом Фрейнда. Вторую серию иммунизации проводили через 4-5 месяцев путем однократного введения ЭЖ внутримышечно, в концентрации 20 мг/мл, 1,0 мл, полученной из эхинококка легких КРС. Определение активности (титра) антител проводили при помощи РПГА с антигенным эхинококковым ЭД в сыворотке крови иммунизированных кроликов. Кровь для исследования брали до начала иммунизации, через 12 дней после первой серии иммунизации, за 10 минут до второй серии иммунизации и через 4-5 дней после второй серии иммунизации. Результаты исследования приведены в таблице 9.

Таблица 9 — Динамика титра антител к эхинококковым и тканевым антигенам при последовательной иммунизации кроликов эхинококковой жидкостью от овцы и крупного рогатого скота с разной локализацией паразита.

Иммунизация	Эхинококковая жидкость	Средний геометрический титр в РПГА с ЭД из антигенов		
		Титр неспецифических антител сыворотки овцы и печени овцы	Титр неспецифических антител сыворотки к.р.с. и легкого к.р.с.	Титр специфических антител эхинококка очищенного от тканевых компонентов
Первая серия иммунизации, 4 инъекции	Из эхинококковой кисты печени овцы	14200 + 1,2 1254 + 1,1	320 + 1,1 180 + 1,1	25600 + 1,2
До второй реиммунизации		<100	<100	512+1,1
Вторая реиммунизация, 1 инъекция	Из эхинококковой кисты легкого к.р.с.	<100 <100	240 + 1,2 <100	12800 + 1,2

Как видно, после первой серии иммунизации титр антител, специфичных к эхинококковому антигену, был всего в 1,80 раза больше, чем титр антител к тканевым антигенам, после второй же серии иммунизации титр антител к эхинококковым антигенам превышал титр антител к тканевым антигенам уже в 51,67 раза.

Во второй серии иммунизации мы использовали антиген, специфичность которого по эхинококковому компоненту не различалась с антигеном, использованным в первой серии иммунизации, а тканевые компоненты в этих антигенах были различные (ввиду различной локализации эхинококка и видового различия хозяев паразита).

Поэтому в соответствии с феноменом «иммунологической памяти» антительный ответ на эхинококковые антигены шел по типу вторичного иммунного ответа (более короткий латентный период, более высокий титр и авидность антител) – на 4 — 5-ый день уже определялись высокие титры антиэхинококковых антител. Антительный ответ на тканевые антигены крупного рогатого скота после второй серии иммунизации развивался по типу первичного иммунного ответа и поэтому на 4 — 5-ый день титр этих антител был еще очень низким, а повторной стимуляции выработки антител к тканевым антигенам овцы не было, что, по-видимому, обусловлено малым содержанием в использованных ЭЖ перекрестных (между крупным рогатым скотом и овцой) антигенов.

Таким образом, использование схемы последовательной иммунизации кроликов ЭЖ, полученной при различной локализации эхинококка у хозяев, относящихся к разным биологическим видам, позволило получить иммунную сыворотку с высоким содержанием антител, специфичных к эхинококковым антигенам, и низким содержанием антител, специфичных к тканевым антигенам.

4.1.2. Повышение активности иммунной сыворотки с использованием биоиммуносорбента из протосколексов эхинококковой цисты

Существуют различные способы повышения специфичности и активности иммунной сыворотки. Иногда применяют в качестве иммуносорбента формализированную микробную взвесь. Однако, несмотря на формализацию, в элюате могут присутствовать кислоторастворимые компоненты биомассы, экстрагируемые в процессе элюции антител с иммуносорбента, что существенно затрудняет приготовление иммуноглобулиновых диагностических препаратов и снижает их специфичность. Для этой же цели мы использовали протосколексы паразита. Ранее такой способ получения специфических противоэхинококковых антител не применялся.

Отрабатывали режим получения элюата противоэхинококковых антител из протосколексов. Поставленная задача приготовления такого иммуносорбента решалась путем предварительной обработки паразитарной массы кислым буфером и последующего отмывания иммуносорбента буфером с нейтральным значением рН без формализации биоиммуносорбента.

Исходили из того, что в кислом растворе после обработки протосколексов белок должен отсутствовать, т.к. его присутствие в элюате может существенно снижать специфичность иммуноглобулинового реагента. Применяли одно-, двух-, трех-, четырех-, шести-, восьми кратное отмывание протосколексов по 30 сек. и 1, 2, 4, 8 мин. Объем протосколексов в каждом случае составлял 1,0 мл, объем отмывающего буфера - 10,0 мл. После отмывания в каждую пробирку заливали по 2,0 мл кислого буфера, выдерживали 5 мин., центрифугировали 5 мин. При 3000 об/мин. Проводили забор надосадка и определяли белок по Лоури. Результаты исследования приведены в таблице 10.

Как видно, 6-8-кратное отмывание биомассы протосколексов приводит к полному исчезновению белка из надосадка. Поэтому в дальнейшем был использован следующий режим подготовки протосколексов для их использования в качестве иммуносорбента. В пробирку с осадком уби-

тых протосколексов *E.granulosus* объемом 1,0 мл вносили HCl-глициновый буфер (pH-2,3) в объеме 20,0 мл. Осадок встряхивали и оставляли при комнатной температуре в течение 8 минут. Затем центрифугировали 10 минут при 3000 об/мин. Надосадоk сливали. Эту операцию повторяли шесть раз. Затем осадок дочерних клеток паразита отмывали центрифугированием (10 минут при 3000 об/мин) трижды 0,85 % раствором NaCl с фосфатным буфером pH-7,2; 0,1M в смеси. После этого осадок из протосколексов *E.granulosus* готов к использованию в качестве иммуносорбента.

Таблица 10 — Эффективность различных режимов обработки протосколексов кислым буфером.

Количество повторов	Количество белка в надосадоке (мг/мл) после отмывания протосколексов при выдерживании их в кислом буфере в течение				
	30 сек.	1 мин.	2 мин.	4 мин.	8 мин.
Один	0,82	0,81	0,71	0,42	0,22
Два	0,63	0,59	0,32	0,08	0,20
Три	0,21	0,36	0,13	0,11	0,10
Четыре	0,24	0,19	0,18	*	*
Шесть	0,27	0,29	0,01	*	*
Восемь	0,28	0,14	*	*	*
Примечание — * Белок не выявлен					

Формалинизацию протосколексов проводили в следующем режиме: к 10 % взвеси отмытых протосколексов добавляли такой же объем 7 % раствора формальдегида (pH-7,2). Смесь перемешивали каждый час. Через сутки протосколексы трижды отмывали забуференным 0,85 % раствором хлорида натрия (pH-7,2). Формализированные протосколексы хранили в виде 10 % взвеси.

Далее провели сравнение эффективности использования в качестве иммуносорбента протосколексов без предварительной обработки формалином или кислым буфером, обработанных формалином и обработанных кислым буфером. Антитела получали «пробирочным» методом по следующей схеме:

К осадку протосколексов *E.granulosus* (1,0 мл) добавляли по 1,0 мл глобулина (pH-7,2). После 30-40 минут экспозиции при комнатной темпе-

ратуре сколексы отделяли центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 минут и трижды промывали 0,85 % раствором NaCl. Элюцию антител проводили HCl-глициновым буфером (pH-2,3) в объеме 1,0 мл. Сколексы отделяли центрифугированием при этих же режимах при 3000 об/мин в течение 10 минут. Элюат нейтрализовали раствором нейтральным буфером (6,8-7,2).

Результаты опытов, каждый из которых проводили 4 раза, приведены в таблице 11.

Таблица 11 — Анализ элюатов.

Результаты исследования элюата, полученного при использовании в качестве иммуносорбента					
Протосколексов, не обработанных формалином и кислым буфером		Протосколексов, обработанных формалином		Протосколексов, обработанных кислым буфером	
1	2	1	2	1	2
0,42 + 0,2	140,0 + 1,1	0,32 + 0,3	150,0+ 1,1	0,01 + 0,004	170,0 + 1,1
Примечания:					
1. Концентрация белка, мг/мл					
2. Обратный среднегеометрический титр антител и его среднегеометрическая ошибка					

Содержание белка в элюатах определяли по методу Лоури, титр антител к эхинококковому антигену – в РПГА с использованием антигенного эхинококкового ЭД.

Как видно, при отсутствии достоверного различия титров противоэхинококковых антител в исследуемых пробах элюаты, полученные без обработки протосколексов кислым буфером или с обработкой формалином, не специфичны, т.к. кроме противоэхинококковых антител содержат значительное количество кислоторастворимых белков.

Количество белка без обработки сколексов формалином было существенно больше, чем с предварительной обработкой кислым буфером — в 42 раза (0,42:0,01), формализация дочерних клеток *E.granulosus* также фактически не предотвращает экстрагирование кислоторастворимых белков, их оказалось больше в 32 раза (0,32:0,01). Кроме того, такие элюаты содержат, кроме кислоторастворимых белков и антител, иммунные комплексы (антитела, связанные кислоторастворимыми антигенами).

Далее нами была изучена возможность получения антительных эхинококковых ЭД из всех трех элюатов.

4.2. Получение антительных эхинококковых ЭД

При получении антительных эхинококковых ЭД в качестве сенситинов использовали иммунную кроличью сыворотку, полученную путем последовательной иммунизации кроликов (см. раздел 4.1.1), и препараты иммуноглобулинов (элюаты), полученные, как описано в разделе 4.1.2. В качестве конъюгирующего агента при сенсibilизации ФЭБ использовали амидол. Для выбора оптимального сенсibilизирующего разведения ФЭБ нагружали различными дозами использованных иммуноглобулиновых препаратов. Эффективность полученных антительных эхинококковых ЭД проверяли в РПГА (таблица 12).

В качестве агглютинирующего агента использовали ЭЖ. Каждый опыт повторяли 4 раза. Результаты приведены в таблице 12. За ОСД принимали минимальную концентрацию сенситина, при которой отмечена агглютинация максимальным разведением ЭЖ.

Таблица 12 — Чувствительность антительных эхинококковых ЭД.

Разведение иммунной сыворотки*	Обратный среднегеометрический титр и его средняя квадратическая ошибка агглютинирующего разведения ЭЖ	Разведения элюатов	Обратный среднегеометрический титр и его средняя квадратическая ошибка агглютинирующего разведения ЭЖ при использовании элюата		
			I	II	III
1:20	СпАгг	исходный	Отр	Отр	54100+1,0
1:40	СпАгг	1:2	Отр.	Отр	58000+1,0
1:60	39200+1,0	1:4	Отр.	Отр	48000+1,0
1:80	32000+1,0	1:8	Отр.	Отр	25000+1,1
Примечания:					
1. * Иммунная сыворотка, полученная путем последовательной иммунизации.					
2. I элюат получен с использованием необработанных протосколексов.					
3. II элюат получен с использованием протосколексов, обработанных формалином.					
4. III элюат получен с использованием протосколексов, обработанных кислым буфером.					

Как видно из приведенных данных, при использовании в качестве сенситинов элюатов 1 и 2 нам не удалось получить антительные эхинококковые ЭД. Диагностикумы не агглютинировались ЭЖ даже в концентрации 1 мг/мл. При использовании в качестве сенситинов иммунной сыворотки, полученной последовательной иммунизацией кроликов, и элюата 3 нами получены чувствительные антительные эхинококковые ЭД, которые агглютинировались ЭЖ (3 серия), разведенной 1:39200 и 1:54100. Эти ЭД использовались в дальнейшей работе.

4.3. Оценка эффективности индикации эхинококковых антигенов для диагностики эхинококкоза, осложненного перфорацией в желчные протоки

Известно, что после прорыва эхинококковой цисты в желчные протоки и ее опорожнения паразит еще в течение долгого времени (несколько недель) продолжает экскретировать специфические антигены. Это дает возможность их выявления в желчи в течение длительного времени после перфорации эхинококка в желчные протоки.

С целью определения возможности индикации эхинококковых антигенов в желчи больных было обследовано 7 больных с эхинококкозом печени, осложненным перфорацией в желчные протоки, и 11 больных с неосложненным эхинококкозом печени. Обследование проводилось до оперативного лечения. Впоследствии диагнозы были подтверждены при оперативном вмешательстве.

Индикацию эхинококковых антигенов проводили в порции С желчи больных при помощи РПГА с антительным эхинококковым ЭД, полученным как описано в разделе 4.2.

Желчь перед исследованием обрабатывали по следующей методике. Предварительно желчь больного (порция С) центрифугировали в пробирке в течение 20 минут при 3000 об/мин для удаления клеток и сгустков крови. Затем надосадок сливали и к 6,0 мл надосадка добавляли 4,0 мл 96° этилового спирта. Оставляли при комнатной температуре на 30 минут.

После этого пробу центрифугировали 20 минут при 3000 об/мин., надоса- док выливали, а осадок растворяли в 1,0 мл 0,85 % раствора хлорида натрия (в 4 раз меньшем первоначального объёма желчи, для повышения концентрации эхинококкового антигена в пробе). Постановку РПГА с ан- тительным эритроцитарным диагностикумом осуществляли обычным способом.

Поскольку основные антигены эхинококка являются белками, кото- рые хорошо осаждаются 40 % этиловым спиртом и растворяются в 0,85 % растворе хлорида натрия, при использованном способе обработки желчи эхинококковые антигены (при их наличии) перейдут в исследуемую про- бу.

Параллельно с серологическим исследованием все порции желчи были исследованы при помощи микроскопии по описанной в разделе «Материалы и методы» методике. Сравнивали эффективность диагности- ки осложненного эхинококкоза печени с помощью микроскопии желчи и разработанных способов. Всего было обследовано и прооперировано 18 больных эхинококкозом печени с подозрением на перфорацию в желчные протоки. До операции желчь больных (порция С) исследовалась с целью выявления осложнения эхинококкоза печени перфорацией в желчные протоки. Осадок желчи, после центрифугирования при 3000 об/мин в те- чение 30 минут, микроскопировали с целью выявления сколексов парази- та и исследовали по описанному выше методу в РПГА с антительным эхинококковым ЭД.

Диагноз «Эхинококкоз печени» был подтвержден у всех больных. Только у 7 больных был установлен диагноз «осложненный эхинококкоз печени перфорацией в желчные протоки». Результаты представлены в табл. 6. Видно, что из 7 таких больных только у одного при микроскопи- ровании порции С желчи были обнаружены единичные дочерние клетки эхинококка. У всех 7 больных в желчи был обнаружен эхинококковый ан- тиген до оперативного вмешательства. Титры РПГА с антительным ЭД колебались от 1:32 до 1:2048. Ни у одного больного с неосложненным эхинококкозом печени эхинококковый антиген в желчи не обнаружили

(табл.13). Только у одного больного в желчи были обнаружены протосколексы паразита.

Таблица 13 — Сравнительная эффективность диагностики осложненного перфорацией в желчные протоки эхинококкоза печени.

Количество больных с хирургическим диагнозом осложненный и неосложненный эхинококкоз	Количество выявленных больных с осложнением методом	
	микроскопирования	индикации антигена в желчи
7 больных (осложненный)	1	7
11 больных (неосложненный)	0	0

Пример 1. Б-й Б. 63 г. Поступил 8.07.97 г. в экстренном порядке через 15 дней от момента заболевания, с жалобами: на боли в правом подреберье, понижение аппетита, слабость, повышение температуры тела до 38-39⁰С. Состояние больного при поступлении средней тяжести. Пульс-86 уд. в мин, АД — 130/90 мм.рт.ст., ОАК: Нв-138 г/л, эр-4,3 x 10¹²/л, лейкоц.- 6,4 x 10⁹/л, билирубин- 12,3 мкмоль/л. УЗИ - эхинококковая киста печени (нагноившаяся?). В РПГА обнаружены противоэхинококковые антитела, в титре — 1:3200. При микроскопии желчи порции С — элементы эхинококка не обнаружены. Индикация эхинококкового антигена с помощью РПГА в данной порции желчи дала положительный результат (1:128).

После предоперационной подготовки 11.07.97 г. произведена операция: Эхинококкэктомия печени. На операции: эхинококковая киста правой доли печени размером 10x15 см., в полости кисты обнаружен желчный свищ, который был ушит. Послеоперационный период протекал гладко. На 11 сутки больной выписан в удовлетворительном состоянии.

Пример 2. Б-я К. 24 г. Поступила 10.05.97 г. в экстренном порядке, через 48 ч. от начала заболевания с клиникой острого холецистита. Ранее 2 – 3 года назад отмечала подобные приступы, но не обследовалась. При поступлении состояние средней тяжести. АД – 120/80 мм.рт.ст., пульс – 88 уд. в мин., ОАК Нв-118 г/л, эр.-3,8 x10¹²/л, лейкоц.- 13,2 x10⁹/л, билирубин общий – 47,84 мкмоль/л, прямой – 22,66 мкмоль/л, не прямой — 25,18 мкмоль/л. Консервативная терапия в течение трех суток — без

эффекта. Результаты УЗИ -эхинококковая киста левой доли печени. Калькулезный холецистит. Холедох — 12,9 мм. Титр антител в сыворотке крови в РПГА — 1:12800. Исследование порции С желчи: микроскопия — элементов эхинококка не обнаружено, титр эхинококкового антигена в РПГА — 1:32. Диагноз: эхинококкоз печени, осложненный перфорацией в желчные протоки, калькулезный холецистит, механическая желтуха. В срочном порядке 15.05.97 г. произведена операция — Эхинококкэктомия. Холецистэктомия, папилосфинктеропластика. Дренажирование по Пиковскому. Во время операции в полости эхинококковой кисты обнаружен желчный свищ, который был ушит. В желчном пузыре найдены обрывки кутикулярной оболочки паразита, что подтверждено гистологически. Послеоперационный период протекал гладко. На 14 сутки больная выписана в удовлетворительном состоянии.

Т.о., разработан простой, специфичный и чувствительный способ диагностики осложненного перфорацией в желчные протоки эхинококкоза печени по индикации эхинококкового антигена в порции С желчи больных с помощью антительного эритроцитарного диагностикума в РПГА. Своевременная диагностика такого осложнения позволяет повысить эффективность оперативного лечения больных.

5. МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭХИНОКОККОВЫХ КИСТ

5.1. Локализация, количество, размеры и фаза жизнедеятельности кист у больных первичным и рецидивным эхинококкозом печени

Проведенный анализ показал, что эхинококковые кисты чаще локализовались в правой доле печени (74,6 %), чем в левой (4,7 %), что согласуется с данными литературы. Обе доли печени были поражены в 6,0 % случаев, сочетанные формы поражения были у 14,7 %. Частота рецидива (РЭП) составила 19,3 %. Среди них у 70,7 % развились в ранние сроки (до 12 месяцев) после хирургического лечения.

В исследованиях было выявлено преимущественное поражение правой доли печени, что согласуется с данными литературы [236].

Среди пациентов с РЭП множественные эхинококковые кисты были у 82,1 % больных, что существенно больше, чем у пациентов с ПЭП. Провели сравнительный анализ размеров эхинококковых кист у пациентов с ПЭП (n = 136) и РЭП (n = 28). Существенной разницы частоты встречаемости малых, средних и больших размеров кист у пациентов с ПЭП и РЭП не выявили. Более чем половина кист имели средние размеры (50,6 %). Среди них у пациентов с ПЭП и РЭП количество средних кист было почти равным (50,0 % против 53,6 %). У больных ПЭП несколько чаще, чем у больных с РЭП, встречались кисты больших (38,2 % против 32,1 %) и гигантских размеров (5,9 % против 3,6 %). У пациентов с РЭП кисты больших размеров выявляли почти у трети обследованных (32,1 %), несмотря на то, что больные уже были насторожены в отношении этого тяжелого заболевания и находились под диспансерным наблюдением.

Таким образом, изучение размеров кист у больных с РЭП и ПЭП показало, что чаще диагностировали заболевание, когда кисты достигали размеров - более 50 мм в диаметре. В этих случаях хирургическое лечение уже становится безальтернативным. Это вероятно связано с тем, что эхинококкоз протекает длительное время бессимптомно и поэтому поздно диагностируется.

Проведен сравнительный анализ фазы жизнедеятельности кист при первичном и рецидивном эхинококкозе печени. Эхинококковые кисты у больных ПЭП распределили по фазам жизнедеятельности в соответствии с классификацией Гилевича М.Ю. (1987):

I – живые кисты, с прозрачным жидким содержимым (16,9 %);

IIА – кисты в фазе ранних «посмертных» изменений, содержащие дочерние пузыри (27,2 %);

IIБ - кисты в фазе поздних «посмертных» изменений, помутнением жидкого содержимого, иногда с обызвествлением капсулы (45,6 %);

III – нагноившиеся кисты, иногда с прорывом содержимого (10,3 %).

У пациентов с ПЭП наибольшее количество кист было выявлено во IIБ фазе жизнедеятельности (при множественном эхинококкозе учитывали состояние самой старой кисты). Наименьшее количество составляли кисты III фазы. Количество кист в I, IIА и III фаз частотой существенно не отличались у пациентов с РЭП от ПЭП. Значительно больше было кист во IIБ фазе у больных ПЭП, чем у больных с РЭП. Чаще при РЭП встречались кисты в III фазе жизнедеятельности.

Выявлено, что 17,8 % рецидивных кист на момент обследования имели гнойное содержимое, в 25,0 % случаях обнаружено обызвествление капсулы. Для рецидивного эхинококкоза печени характерным являются множественные поражения и доминирование мёртвых и осложнённых кист диаметром до 7,0 см [40]. РЭП чаще развивался у пациентов после солитарного ПЭП, имеющих кисты IIБ и III фазы жизнедеятельности.

Среди них в 64,3 % случаев РЭП развивался после ПЭП с кистами ПБ фазы жизнедеятельности.

Проведен анализ частоты РЭП за 2005 – 2014 гг. по данным медицинских карт стационарных больных РЦХГ. В 2005 г. у 21,3 % наблюдался РЭП; в 2008 – 18,2 %; в 2011 – 19,5 %; в 2014 – 17,1 %. Выявлено, что показатель частоты рецидивов в последние годы приобрел тенденцию к снижению. Таким образом, исследования в динамике показали, что за последние годы (2013-2016 гг.) в РЦХГ чаще стали поступать (чем за 1998-2012 гг.) больные с множественными кистами в печени. Сравнительный анализ показал, что 2 и более кист чаще выявлялись у больных с РЭП, чем с ПЭП. Обращает внимание, что пациенты поступают часто с кистами средних и больших размеров, а в этих случаях хирургическое лечение уже становится безальтернативным. Исследование в динамике показало, что за последнее десятилетие показатель частоты рецидивов приобрел тенденцию к снижению.

5.2. Характеристика морфологии кист у больных эхинококкозом печени

Обнаружение отличий разных по этиологии рецидивных кист между собой имеет важное значение для выявления причины повторного заболевания. Нами проведен сравнительный анализ морфологического строения 18 кист у пациентов с ПЭП и 17 — у больных с РЭП. При исследовании оболочки пузырей во всех случаях определяли характерную для эхинококковых личинок белый хитиновый слой снаружи, изнутри выстланный герминативными клетками. Толщина хитина была разной: от 2 до 7 мм при ПЭП и 2-5 мм при РЭП. Проведено исследование плодородности эхинококковых пузырей, полученных от больных с ПЭП и РЭП. В исследованной выборке все кисты были фертильны (100 %). Проведено микроскопическое исследование внутреннего содержимого кист. Все ки-

сты имели зародышевые элементы. Выводковые капсулы были с протосколексами, прикрепленными к ней герминативными ножками.

Свободные протосколексы были двух типов: вывернутые (эвагинированные) и ввернутые (инвагинированные), с двигательной активностью и без (рисунки 5, 6, 7).

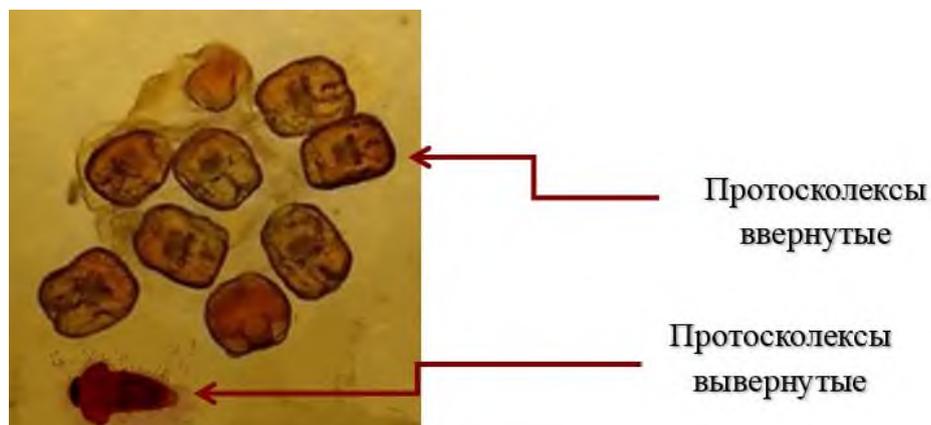


Рисунок 5 — Протосколексы овальной формы: ввернутые и вывернутые (ув. $\times 400$, окраска раствором Люголя)

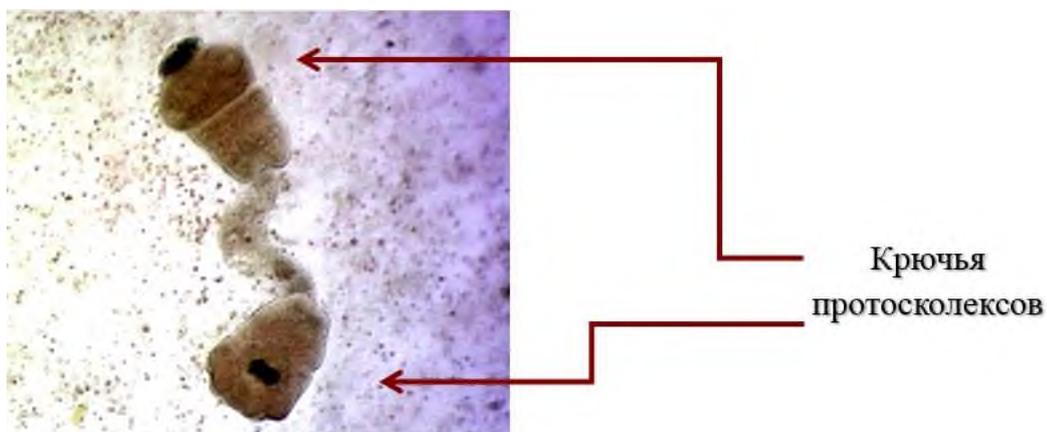


Рисунок 6 — Протосколексы вывернутые (сверху) и ввернутые (снизу), прикрепленные герминативными ножками к фрагменту выводковой капсулы (ув. $\times 900$, окраска раствором Люголя)

Инвагинированные протосколексы имели овальную форму. Длина была больше, чем ширина. Длина ввернутых протосколексов составляла 125 – 145 мкм, длина эвагинированных протосколексов была 170 – 210 мкм, что согласуется с данными литературы [39].

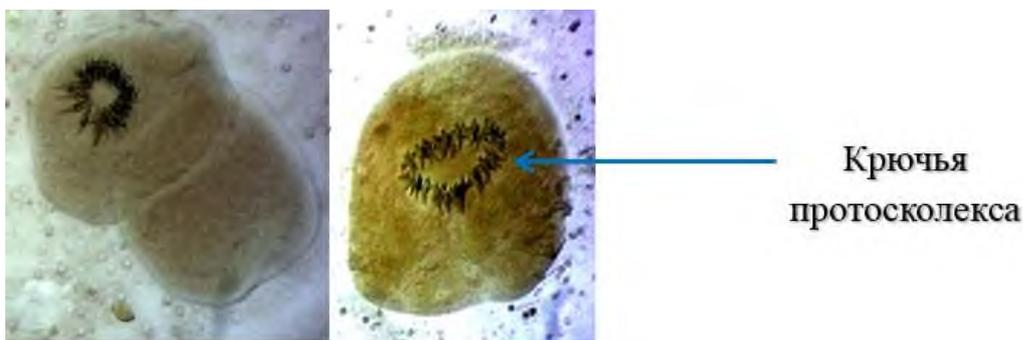


Рисунок 7 — Вывернутый (слева) и ввернутый (справа) протосколексы из пузырьной жидкости с двигательной активностью (ув. $\times 900$, окраска раствором Люголя)

Для сравнительного анализа было подсчитано процентное отношение эвагинированных к общему числу (эвагинированных + инвагинированных) протосколексов в кистах, полученных от пациентов с ПЭП и РЭП. Соотношение этих элементов в разных кистах значительно отличалось как при ПЭП (от 2 % – до 34 %), так и при РЭП (от 4 % – до 28 %) и выделить существенную разницу между первичными и рецидивными кистами, а также между разными рецидивными кистами не представилось возможным.

В 11 (61,1 %) исследуемых первичных ($n = 18$) и в 14 (82,3 %) рецидивных ($n = 17$) кистах обнаружены дочерние пузыри (рисунок 8).



Рисунок 8 — Дочерние пузыри и хитиновая оболочка кисты

Доля кист с дочерними пузырями у больных с РЭП была незначительно больше, чем у пациентов с ПЭП ($p = 0,63$; $\chi^2 = 0,23$). В одном материнском пузыре они могли иметь разные размеры (рисунок 9).



Рисунок 9 — Дочерние пузыри из одной рецидивной кисты печени

Число дочерних пузырей в материнских кистах было разным (в некоторых кистах более 10). Существенной разницы в количестве дочерних пузырей между кистами у больных с ПЭП и РЭП не выявлено ($p > 0,05$).

Поскольку инвазионными началами эхинококкового пузыря являются протосколексы, то определение их жизнеспособности имеет важное значение для профилактики рецидивов. Проведено вычисление процента жизнеспособных протосколексов (соотношение числа жизнеспособных протосколексов к общему числу подсчитанных протосколексов). В кистах, выделенных от больных ПЭП этот показатель составлял $34,8 \% \pm 9,3 \%$ и соответственно с РЭП – $42,1 \% \pm 11,3 \%$. Существенной разницы между первичными и рецидивными кистами, а также между разными рецидивными кистами не выявлено ($p > 0,05$).

Таким образом, на основании изучения макро- и микроскопического строения эхинококковых пузырей и их содержимого статистически значимые отличия между разными рецидивными кистами не выявили. Значит, морфологические исследования мало информативны для дифференциации рецидивных кист.

5.3. Дифференциация рецидивных кист на основе молекулярно-генетических исследований гена cox1 E. Granulosus

Дифференциация рецидивных кист (метастатической, резидуальной, имплантационной, реинвазионной) по происхождению имеет значение при выборе метода хирургического лечения и является необходимым для проведения адекватной профилактики. Например, опеределение метастатической причины возникновения кист является прямым показанием для выполнения радикальных операций, к которым относятся перикистэктомии и атипичные резекции [40]. Обнаружение реинвазивной природы рецидива — характеризует неблагоприятную эпидемиологическую обстановку, а, значит, необходимость улучшить санитарно-гигиеническую мероприятия.

Проведенный анализ литературы показал наличие генетических отличий внутри вида *E. granulosus* [166, 169, 182, 210]. Выявлено, что полиморфизм может быть обусловлен одиночными заменами нуклеотидов или делециями даже в маркерных участках ядерных и митохондриальных генов [182, 184]. Генетические перестройки, которые возникают в результате мутаций и комбинативной изменчивости, лежат в основе внутривидовой вариабельности *E. granulosus*.

На основании этих данных было предложено делить этот вид на биологические варианты (генотипы, штаммы): G1 — common, domestic sheep, G2 — Tasmanian sheep, G3 — buffalo, G4 — *E. equinus*, G5 — *E. ortleppi*, G6 — camel, G7 — pig, G8 — cervid 'northern form', G9 — human, G10 — Fennoscandian cervid. Путем секвенирования авторами были обнаружены изменения нуклеотидной последовательности генов еще и внутри каждого штамма, которые регистрировали в Международной базе данных "GenBank". Так наиболее распространенный в мире штамм G1 [178, 180, 226, 227] разделили на G1A, G1B, G1C, G1D, G1E и другие генотипы.

Поскольку метастатические и имплантационные кисты отраждаются из первичной кисты, поэтому вероятность того, что они (первичная и рецидивная кисты) имеют генетическое сходство, высока. Резидуальные и реинвазивные кисты могут иметь сходство с генотипом первичной кисты или нет. Исследований в этом направлении мы в отечественной и зарубежной литературе не обнаружили.

Учитывая генетическую вариабельность эхинококка, нами разработан способ дифференциации разных по происхождению кист (патент на изобретение РФ № 2591807 от 23.06.16). Он основан на сравнении нуклеотидной последовательности маркерного фрагмента гена *cox1* у первичной (материнской) кисты с рецидивной при помощи ПЦР-ПДРФ анализа. Затем этот способ был нами усовершенствован. Для настоящего исследования был использован способ дифференциации генотипов эхинококка, основанный на сравнении длины ПЦР-продуктов маркерного фрагмента гена *cox1* первичной (материнской) кисты с рецидивной путем использования разных праймеров №1 (предложенных Bowles J., 1993 [118]) и №2 (Буйдаковым В.М. и др., 2010 [31]).

Нами проведен молекулярно-генетический анализ маркерного фрагмента гена *cox1* эхинококковых пузырей, полученных во время операции у 18 больных с ПЭП. От всех кист выделили ДНК и провели ПЦР-анализ. После применения в ПЦР праймеров №1 получены амплифицированные фрагменты ДНК от всех образцов. Далее все образцы ДНК подвергли ПЦР, используя праймеры № 2, и на электрофореграмме обнаружили амплификаты только от 11 исследуемых образцов ДНК. Следовательно, эти 11 кист имели «нормальный» генотип, а другие 7 — генетически отличающийся. Таким образом, среди исследуемых образцов было не менее двух полиморфных вариантов *E. granulosus*: с «нормальным» и «измененным» генотипом. У 3 пациентов (из 18 наблюдаемых на данном этапе исследований) развился РЭП.

Предложенный способ молекулярно-генетического анализа легко выполним в любой современной лаборатории, экономичен и поэтому может быть использован для выявления природы происхождения рецидивных кист. Например, обнаружив при помощи ПЦР-анализа различия генотипов эхинококковых пузырей при ПЭП и РЭП можно утверждать, что рецидив не имеет имплантационную природу происхождения, обусловленную диссеминацией зародышевых элементов из-за нарушения принципов апаразитарности во время первой операции.

6. ПРОФИЛАКТИКА РЕЦИДИВА ОДНОКАМЕРНОГО ЭХИНОКОККОЗА ПЕЧЕНИ

Отношение к эхинококкозу печени как к исключительно хирургической патологии, привело к тому, что в утвержденном стандарте медицинской помощи отсутствует схема противорецидивной химиопрофилактики и диспансерного наблюдения больных.

6.1. Химиопрофилактика рецидива эхинококкоза печени

С 1983 г. в мире, с 1996 г. в России и по настоящее время применяют противогельминтный препарат альбендазол для лечения эхинококковых кист размерами менее 5 см и противорецидивной профилактики после оперативного лечения. Это положение закреплено и в резолюции конгресса Ассоциации хирургов-гепатологов России и стран СНГ (2014 г.).

Проведенный анализ литературы показал, что альбендазол, попадая в организм человека, не оказывает прямого действия, а быстро подвергается биотрансформации [151, 206, 238]. В настоящее время известно, что в организме человека альбендазол (АБЗ) превращается в альбендазол-сульфоксид (АБЗ-СД), обладающий противогельминтным действием, далее метаболизируется в альбендазол-сульфон (АБЗ-СН) - не имеющий биологической активности. Затем АБЗ-СН гидроксيليруется и большая часть выводится с желчью, часть с мочой. В основном катализирует процесс превращения в АБЗ-СД цитохром СYP3A4. Ген, кодирующий СYP3A4, не имеет полиморфных вариантов, значимо влияющих на фармакокинетику, и у всех людей этот цитохром функционирует почти одинаково. Поэтому этот этап биотрансформации мы не рассматривали.

Превращение АБЗ-СД в АБЗ-СН обеспечивает изоформа цитохрома P450 СYP1A2, функционирующая в основном в клетках печени (рисунок 10).



Рисунок 10 — Схема биотрансформации альбендазола в клетках печени

Изучена вариабельность гена CYP1A2 в популяциях людей и доказано ее влияние на метаболизм лекарств [60]. Одним из наиболее изученных и функционально значимых является полиморфизм 1 интрона *1F (C-163A) [137, 181]. Установлено, что этот полиморфизм приводит к существенному изменению каталитической активности цитохрома CYP1A2 и увеличивает его индуцибельность [13, 219].

Альбендазол назначается в дозе 10 – 20 мг/кг веса в сутки, количество курсов 3 – 10 с перерывом в 14 – 15 дней [25, 116, 145]. Эта схема согласуется с предложенной Horton (1989) и одобренной ВОЗ.

Проведено исследование эффективности профилактики рецидивов эхинококкоза печени альбендазолом у больных, поступавших в РЦХГ в 2013 – 2016 гг. Пациенты были разделены на 2 группы: основную и сравнения. В группу сравнения включены 107 пациентов с эхинококкозом печени, отказавшиеся от химиопрофилактики, или принимавших альбендазол по стандартной схеме: 10 – 15 мг/кг веса в сутки (не более 800 мг в сутки), три курса по 28 дней с перерывом 14 дней.

В основную группу вошли 57 больных эхинококкозом печени, которым был рекомендован альбендазол по дифференцированной схеме, с учетом генотипа. Для определения схемы химиотерапии альбендазолом в

основной группе проведено молекулярно-генетическое исследование полиморфизма *1F(C-163A) гена CYP1A2 методом ПЦР-ПДРФ анализа.

В основной группе пациентов обнаружены генотипы (таблица 14): CYP1A2F1*AA (AA) — 21 (36,8 %), CYP1A2F1*AC (AC) — 19 (33,4 %), CYP1A2F1*CC (CC) — 17 (29,8 %).

Таблица 14 — Распределение генотипов полиморфизма *1F(C-163A) гена CYP1A2 больных эхинококкозом печени в основной группе

Генотипы	Фенотипы	Частота встречаемости
CYP1A2F1*AA	«быстрый» (ultraextensive metabolizers, UM)	21 (36,8 %)
CYP1A2F1*AC	«нормальный» (extensive metabolizers, EM)	19 (33,4 %)
CYP1A2F1*CC	«нормальный» (extensive metabolizers, EM)	17 (29,8 %)

Генотип AA — соответствует фенотипу «быстрого» (ultraextensive metabolizers, UM) метаболизма и встречается с частотой 33 % у представителей европейской, 49 – 57 — африканской и 61 % — у представителей азиатской популяции [13, 73]. Генотип CC — гомозигота «дикого» типа, определяет нормальную скорость метаболизма (extensive metabolizers, EM). И поскольку А аллель гена аутосомно-рецессивный, то генотип AC тоже определяет фенотип EM [45].

У больных эхинококкозом печени из основной группы, имеющих генотип AA и «быстрый» фенотип — UM, альбендазол-сульфоксид (обладающий антигельминтным действием) быстро метаболизируется в альбендазол-сульфон, поэтому препарат будет оказывать непродолжительное терапевтическое действие. Лицам с таким генотипом рекомендовали химиотерапию в максимальной допустимой [116] суточной дозе — 20 мг/кг веса в сутки, 3-10 курсов в год (в зависимости от наличия осложнений) по 28 дней с перерывами на 14 дней. После каждого курса лечения им проводили контрольное обследование, которое включало УЗИ, клинические данные, биохимические показатели функционального состояния печени (АЛТ, АСТ).

Пациентам с генотипом СС и АС, имеющим фенотип ЕМ – «нормального» метаболизма, назначена профилактика рецидива в стандартной минимальной дозе 10 – 15 мг/кг веса в сутки 3 – 10 курсов (в зависимости от наличия осложнений) по 28 дней с перерывами на 14 дней [102]. После каждого курса лечения проводили контрольное обследование, которое включало УЗИ, клинические данные.

Пациентам группы сравнения также проводили контрольное обследование. Через 0,5 – 2,5 года развился рецидив заболевания у 4 пациентов из основной и 24 пациентов из группы сравнения, всего 28 (17,1 %) случаев рецидива из 164 обследуемых больных эхинококкозом печени. Среди больных с рецидивом заболевания из основной группы 1 пациент имел генотип АА, 2 – АС, 1 – СС.

Таким образом, в группе сравнения частота рецидива была больше, чем в основной группе, в 3,2 раза ($\chi^2 = 5,20$; $p = 0,02$). Значит, тестирование генов метаболизма альбендазола у больных позволяет прогнозировать недостаточность химиотерапии, высокий риск развития рецидива после оперативного удаления первичной эхинококковой кисты и соответственно — назначить эффективную дозу альбендазола.

Полученные данные согласуются с литературными. Как показывают опубликованные обзоры, химиотерапия альбендазолом полностью эффективна в 10 – 58 % случаев, приводит к улучшению — у 10 – 51 %, неэффективна у 13 – 37 % пациентов [207, 215, 232]. Где также показано, что альбендазол вызывает дегенеративные изменения в кисте в 40 – 74 % случаев. В то же время доказано, что альбендазол-сульфоксид в дозе 200 мкг/мл обладает 100 % сколицидной активностью в пробирке [235]. Так было продемонстрировано, что на эффективность препарата в организме человека влияют внутренние факторы.

Есть публикации о высокой эффективности химиотерапии альбендазолом [151]. Например, Бабакулов К.К. и др. (2014) провели лечение альбендазолом в дозе 800 мг/сут в 3 курса по 28 дней у больных высокой

группы риска рецидива эхинококкоза печени (пациенты, в анамнезе которых был прорыв кисты с обсеменением, или имели оставленные мелкие множественные кисты, и др.) [26]. Препарат давали с растительным маслом (жирная пища в 5 раз увеличивает всасывание альбендазола). Отклонений в функциональном состоянии печени (по результатам биохимических анализов крови) не обнаружили и достигли значительного снижения частоты рецидива до 1,7 % (2 из 114).

Есть мнение, что результативность альбендазола зависит от возраста и конституции больного эхинококкозом, локализации и морфологии эхинококковых пузырей [145]. Проведенный анализ медицинских карт пациентов, принявших три курса альбендазола после первичного оперативного лечения, поло-возрастной зависимости не выявил. Рецидивные эхинококковые кисты развивались у женщин и мужчин в молодом, среднем, зрелом и пожилом возрасте.

Корреляция аллелей генов цитохромов P450 с особенностями метаболизма лекарств стала очевидной в связи с появлением в последние десятилетия в литературе новых доказательств. Например, разработан высокоэффективный алгоритм выбора дозы варфарина на основе тестирования полиморфизма гена CYP2C19. Исследования индивидуальных особенностей каталитической активности ферментов, участвующих в биотрансформации альбендазола у людей, проводили Marques M.P. et al. (2002) [206]. Было выявлено, что в 1 фазе метаболизма альбендазола в основном участвуют цитохромы P450 — CYP3A4 и CYP2C19 [206, 225]. Эти же ферменты осуществляют метаболизм многих (60 %) лекарств, гормонов (тестостерона). Поэтому одновременное принятие АБЗ и других препаратов вызывает индукцию этих цитохромов, а возможно и разное действие на мужчин и женщин.

Skuhala T. et al. (2014) указывали на огромный диапазон значений концентрации альбендазол-сульфоксида в крови пациентов (различия между минимумом и максимумом составляли 25 — 80 раз) [152]. По их

данным у пациентов, которые не получали терапию альбендазолом, частота рецидивов составила 16,7 %, в то время как не наблюдались рецидивы у больных, получавших химиопрофилактику. Проведенные доказательства убедительно свидетельствовали о том, что более высокие концентрации в плазме крови альбендазол-сульфоксида коррелируют с более низким риском рецидива заболевания [152].

Известно, что цитохромы CYP1A1 и CYP1A2 являются ключевыми ферментами, участвующими в детоксикации ароматических углеводов (бензопирена), содержащихся в сигаретном дыме и в метаболизме (на 90 %) кофеина, содержащегося в чае, кофе [60]. На основании этих данных было сделано заключение, что оценка метаболизма кофеина является надежным тестом для определения активности изоформы цитохрома P450 — CYP1A2 и соответственно функционального состояния печени. Кофеин — единственное соединение, применяемое для фенотипирования CYP1A2 *in vivo*.

Известно, что альбендазол сам индуцирует синтез CYP1A1 и CYP1A2, а значит и образование бензопирена из табачного дыма в организме человека [45, 73]. Поэтому, при химиотерапии альбендазолом вероятно лицам с генотипом «быстрого» UM-метаболизера гена CYP1A2 необходимо воздержаться от курения (для того чтобы исключить повышенную индукцию цитохрома). Альбендазол способен индуцировать синтез цитохромов CYP1A1 и CYP1A2 на уровне транскрипции, тем самым влияя на метаболизм ксенобиотиков, усиливая их токсичность [167, 191].

Таким образом, фармакологическая эффективность альбендазола зависит от многих факторов, в числе которых генетическая индивидуальность пациентов, воздействие индукторов и ингибиторов (кофеина, ПАУ в составе табачного дыма и других). Изложенные результаты свидетельствуют о необходимости дифференцированного подхода к химиопрофилактике рецидива эхинококкоза.

6.2. Прогнозирование эффективности химиопрофилактики рецидива эхинококкоза печени

Идентификация новых аллелей генов, выяснение роли наследственных факторов в патогенезе заболеваний, индивидуальный подход к больному (диагностике, лечению, профилактике) составляют научную основу молекулярной медицины [45].

Каждый человек обладает уникальными морфологическими, физиологическими и биохимическими свойствами, обусловленными генетическим полиморфизмом. Наиболее существенный вклад вносят в вариативность индивидуумов однонуклеотидные замены (SNP). В настоящее время идет накопление информации о связи разных аллелей генов с течением заболеваний.

В настоящей работе нами использована информация об участии цитохрома CYP1A2 в метаболизме альбендазола и о наличии у гена, кодирующего этот фермент, функционально значимых полиморфных вариантов. Проведенные исследования показали, что генетическое тестирование полиморфизма *1F(C-163A) гена CYP1A2 у больных эхинококкозом, и обнаружение генотипа «быстрого» метаболизера, укажет на слабую эффективность альбендазола и соответственно – на высокий риск развития рецидива. В соответствии с результатами генотипирования лицам с генотипом UM-метаболизера гена CYP1A2 была рекомендована химиотерапия альбендазолом в максимально допустимой суточной дозе 20 мг/кг веса, 28 дней, числом курсов — 3 – 10 (в зависимости от наличия осложнений) и диспансерное наблюдение в течение 5 – 8 лет под ультразвуковым и серологическим контролем (согласуется с рекомендациями ВОЗ). Поскольку УЗИ, МРТ и ИФА исследования эффективны для диагностики эхинококкоза и широко применяются в практической медицине [132, 143, 223, 250]. Пациентам с генотипом CC и AC «нормального» метаболизма назначена профилактика рецидива в стандартной минимальной дозе 10 –

15 мг/кг веса в сутки 3 – 10 курсов (в зависимости от наличия осложнений) по 28 дней с перерывами на 14 дней и стандартное диспансерное наблюдение в соответствии с резолюцией конгресса Ассоциации хирургов-гепатологов России и стран СНГ.

На основании полученных данных разработан способ прогнозирования эффективности химиотерапии эхинококкоза печени альбендазолом (Патент РФ на изобретение № 2601902 от 17.10.16).

Известен способ профилактики эхинококкоза альбендазолом в зависимости от тяжести течения (солитарный, множественный), но без учета индивидуальных особенностей метаболизма. Однако эффективность этого подхода составляет 40 % – 70 % [116]. Предложенную стандартную схему назначения альбендазола (в дозе 10 – 20 мг/кг веса в сутки, количество курсов 3 – 10 в год с перерывом в 14 – 15 дней [116]) на практике используют по разному, поскольку не разработаны четкие показания. Использование тестирования полиморфизма гена CYP1A2 у больных эхинококкозом обоснует назначение максимально разрешенной дозы препараты у лиц с высокой активностью метаболизма альбендазола.

Разработанный нами способ использован при составлении алгоритма химиопрофилактики рецидива эхинококкоза печени альбендазолом. Алгоритм химиопрофилактики рецидива эхинококкоза альбендазолом состоит из трех этапов. На первом этапе у лиц, с подозрением на эхинококкоз печени, проводят обследование с использованием ультразвуковой диагностики, МРТ и серологических методов. При обнаружении кисты на втором этапе проводится стандартная предоперационная подготовка и молекулярно-генетическое исследование полиморфизма *1F(C-163A) гена CYP1A2 методом ПЦР-ПДРФ анализа (рисунок 11).

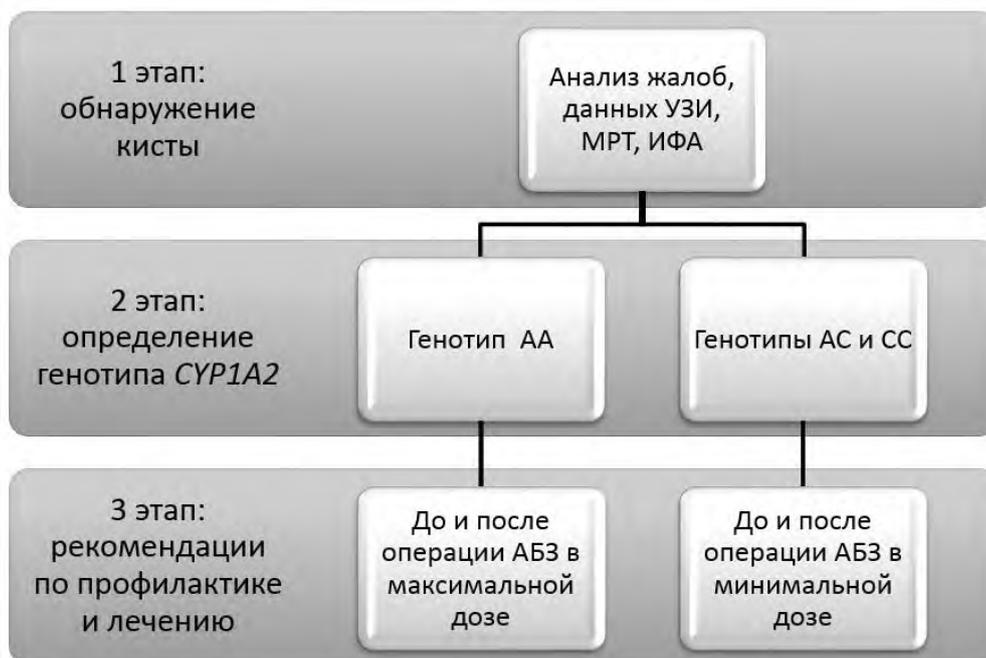


Рисунок 7 — Алгоритм химиопрофилактики и лечения рецидива эхинококкоза печени альбендазолом (АБЗ)

При обнаружении генотипа АА — «быстрого» метаболизера обследуемому на третьем этапе назначается максимально разрешенная доза препарата в пред- и послеоперационном периодах для профилактики повторного заболевания эхинококкозом и лечения (резидуальных кист). У пациентов с генотипами АС и СС назначается стандартная схема альбендазола в пред- и послеоперационном периодах. После лечения пациенты переходят на диспансерное наблюдение по месту жительства (не менее 2 раз в год в течение 3 лет под УЗИ, ИФА контролем и исследованием биохимических показателей функционального состояния печени (АЛТ, АСТ)).

7. ЛЕЧЕНИЕ РЕЦИДИВОВ ОДНОКАМЕРНОГО ЭХИНОКОККОЗА ПЕЧЕНИ В БЛИЖАЙШИЕ И ОТДАЛЕННЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ

Выбор метода лечения РЭП, его объем зависят от размеров и локализации эхинококковых кист, их количества, наличия осложнений, состояния пациента [64].

7.1. Частота рецидива эхинококкоза печени в зависимости от сроков обнаружения рецидива после хирургического лечения и особенностей течения первичного эхинококкоза

Сроки возникновения РЭП после первичной операции могут быть самыми различными. Ранними считают РЭП в сроки до 3 лет, поздние – развиваются через 3 года и даже могли диагностироваться через 5 лет после хирургического лечения [51].

Проведен анализ сроков обнаружения рецидивных эхинококковых кист после хирургического лечения у пациентов, поступивших в РЦХГ за 2013 – 2016 годы (рисунок 12).

Всего было проанализировано 28 случаев заболевания РЭП. Как видно из рисунка, большинство РЭП обнаруживали в сроки до 3 лет после ПЭП. Эти данные согласуются с результатами исследований других авторов и объясняются разной этиологией рецидивных кист [40]. Ранние РЭП связывают с резидуальным происхождением, а поздние - с имплантационным, метастатическим или реинвазионным [40]. Такое распределение объясняют быстрым ростом резидуальных и медленным – остальных кист. Среднее увеличение в диаметре кисты считается 1 см/год, но подобных исследований мало [207].

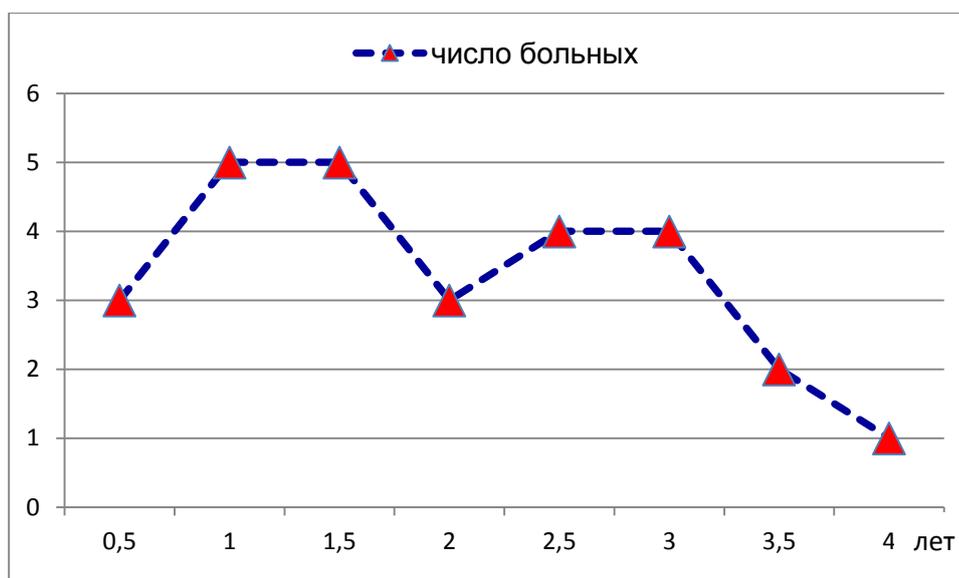


Рисунок 12 — Сроки выявления РЭП (количество лет)
у пациентов за 2013 – 2016 годы

Проведенный анализ данных 28 пациентов с РЭП показал, что рецидивы после первой операции через 3 – 4 года (поздние) были диагностированы у 4 (14,3 %) больных, а ранние — до 3-х лет после хирургического лечения у 24 (85,7 %). Чаще всего РЭП выявляли в первые полтора года 13 (46,4 %) после операции.

Изучили распределение больных с РЭП ($n = 28$) в зависимости от сроков обнаружения рецидива и от локализации первичной кисты. РЭП развивался в 67,9 % случаев у пациентов, у которых первичная киста была локализована только в печени (первично-солитарный и первично-множественный). У 32,1 % пациентов с РЭП локализация первичных кист была в печени и других органах (первично-сочетанный эхинококкоз). Значит, рецидивы чаще ($p = 0,01$; $\chi^2 = 5,78$) развивались в печени, если у больных первичная киста также локализовалась в печени. По данным Назырова Ф.Г. и др. (2011) рецидивные кисты печени в 26,6 % случаев обнаруживались в том же сегменте, где локализовалась первичная киста, а в отдалении — у 63,4 % пациентов [129]. Эти результаты позволили им предположить, что роль имплантационного и метастатического происхождения рецидива не так велика, как резидуального.

Сравнительный анализ распределения больных РЭП в зависимости от сроков обнаружения рецидива и от локализации первичной кисты показал, что и в ближайшие (57,2 % против 28,6 %) и отдаленные (10,7 % против 3,6 %) сроки после хирургического лечения рецидивы чаще развивались в печени, если у больных первичная киста также локализовалась в печени. В ближайшие сроки более, чем в отдаленные, РЭП развивался после первично-сочетанного эхинококкоза (28,6 % против 3,6 %), но разница была статистически не значимой ($p = 0,33$; $\chi^2 = 0,92$). Обращает внимание, что РЭП мало диагностировались в сроки после 3-х лет после ПЭП. Возможно, это связано с тем, что наблюдаются больные с эхинококкозом после операции только 3 года и вероятно этого недостаточно.

Среди исследуемых больных РЭП ($n = 28$) у 5 (17,8 %) наблюдался солитарный рецидив, у 12 (42,8 %) были выявлены 2 или более кист в печени, у 11 (39,3 %) — сочетанная форма РЭП. О высокой частоте множественных кист при РЭП (в отличие от ПЭП) отмечено в работе В.А. Вишневого и др., 2011 [40]. Однако, есть и противоположные данные, в которых показано преобладание солитарного рецидивного эхинококкоза [24].

Проведен сравнительный анализ частот встречаемости солитарных, множественных и сочетанных РЭП у больных ($n = 28$), которые оперировались по поводу разных видов ПЭП (солитарный, множественный и сочетанный). Выявлено, что у больных после солитарного ПЭП могли развиваться как солитарный (7,1 %), так и множественный (28,6 %) и сочетанный (25,0 %) РЭП. После множественного ПЭП не развивался солитарный РЭП и количество кист в печени всегда было 2 и больше. После сочетанного ПЭП, чаще, чем другие формы (10,7 % против 3,6 % и 3,6 %), развивался сочетанный РЭП.

Обращает внимание, что при РЭП часто (39,3 % при РЭП и 11,3 % при ПЭП; $p = 0,002$; $\chi^2 = 10,86$) встречалась сочетанная форма с внепече-

ночным поражением брюшной полости, что согласуется с данными литературы [40].

Таким образом, клиническая картина РЭП была более тяжелой, чем ПЭП, поскольку чаще встречались множественные и сочетанные формы, а значит, и оперативное вмешательство было более сложным.

7.2. Хирургическое лечение рецидива эхинококкоза печени

Основным методом лечения РЭП является хирургический. Согласно данным литературы оперативные вмешательства по поводу РЭП травматичнее, наблюдается достоверно большая кровопотеря и послеоперационные осложнения [40]. Выбор показаний к операции, ее характер и объём, необходимость дренирования или ликвидации остаточной полости, способ обработки эхинококковой кисты, остаются предметом дискуссии [87, 160, 168, 218, 232].

Нами разработана собственная классификация видов оперативных вмешательств [112] при эхинококкозе печени. В соответствии с ней нами проведен анализ видов оперативных вмешательств у пациентов с РЭП, поступивших на хирургическое лечение в РЦХГ 2013-2016 годах. Всего были проанализированы 28 протоколов операций, путем выкопировки информации из медицинских карт стационарного больного. Как показало исследование, больным при РЭП были проведены традиционные органосохраняющие эхинококкэктомии (ЭЭ), резекции печени, а также малоинвазивные вмешательства.

Традиционные органосохраняющие хирургические вмешательства (закрытая эхинококкэктомия без вскрытия хитиновой оболочки или после ее вскрытия; без удаления фиброзной капсулы или с частичной перикистэктомией; без дренирования или с наружным дренированием остаточной полости) составили более трети (39,3 %) от всех операций при РЭП.

Из них в 2 (7,1 %) случаях операции закрытой эхинококкэктомии выполнялись путем полного удаления кисты без ее вскрытия («идеальная»). Они применялись у пациентов с кистами среднего размера, в I фазе жизнедеятельности, неосложненных, краевым расположением в правой доле печени (рисунок 13).

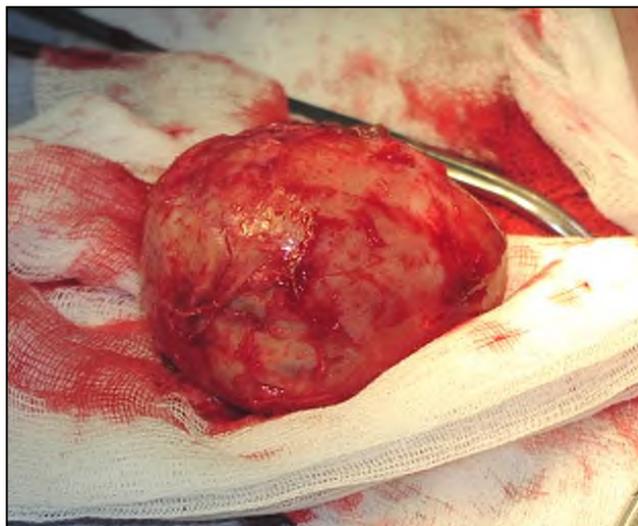


Рисунок 13 — Удаление кисты IIА фазы жизнедеятельности путем «идеальной» эхинококкэктомии

Эхинококкэктомии с аплатизацией остаточной полости дают наименьшее число осложнений [121]. Эхинококкэктомии со вскрытием хитиновой оболочки и аспирацией содержимого произведены у 9 (32,1 %) пациентов. Среди них 2 (7,1 %) пациентам (с кистами среднего размера, во IIА фазе жизнедеятельности, неосложненных, расположением в V и VII сегментах печени) выполнили закрытую эхинококкэктомиию (рисунок 14).

В 7 (25,0) наблюдениях выполнена эхинококкэктомия со вскрытием хитиновой оболочки, иссечением фиброзной капсулы (частичная перикистэктомия) и последующим дренированием остаточной полости. У этих пациентов были солитарные или множественные кисты разных размеров, в IIА, IIБ и III фазах жизнедеятельности, расположением в правой или левой, или обеих долях печени.



Рисунок 10 — Удаление кисты при традиционной эхинококкэктомии

Доля резекций печени, среди оперативных вмешательств, выполненных у больных с РЭП была больше, чем при ПЭП. Более половины из оперативных вмешательств (53,6 %) при рецидивах заболевания составляли резекции и сочетание резекции с традиционной эхинококкэктомией. Возможно потому, что при РЭП чаще встречалась множественная форма заболевания. Эти данные согласуются с мнением многих хирургов о том, что необходимо отдавать предпочтение радикальной хирургии при лечении рецидива эхинококкоза печени [37, 40, 133, 144]. Резекции печени выполнялись при обнаружении признаков обызвествления фиброзной капсулы и множественных близко расположенных к друг другу кистах. При обнаружении больших и гигантских кист печени, когда закрытие остаточной полости вызывало затруднение, также выполняли резекцию печени. Резекции у больных РЭП выполнялись со вскрытием полости кисты или без (рисунок 15).

Атипичную резекцию выполняли в 26,7 % случаев, сегментарную — 20,0 %. Резекции не выполнялись при расположении кист в области ворот печени или крупных сосудов и при интрапаренхиматозной локализации неосложненных малых и средних кист. Чаще (46,6 %) выполняли комбинированное оперативное вмешательство.



Рисунок 15 — Резекция печени без вскрытия кисты

2 (7,1 %) пациентам выполнено малоинвазивное лапароскопическое оперативное вмешательство. Кисты имели краевое расположение близко к передней брюшной стенке, были неосложненными, средних размеров. Увеличить число лапароскопических эхинококкэктомий при РЭП не представляется возможным ввиду развития массивных спаек после первичной операции.

Проведен анализ видов оперативного вмешательства в зависимости от размеров и локализации рецидивных кист печени у больных. Проанализировали протоколы 28 операций с характеристикой удаления 37 рецидивных кист печени. Исследования показали, что чаще встречаются рецидивные кисты в правой доле печени средних размеров (54,1 %). Операции при кистах правой доли средних размеров проводились разные. Чаще это были традиционные эхинококкэктомии (37,8 %).

В ранние сроки после хирургического лечения доля множественного РЭП составила 33,3 % и в поздние сроки – 75,0 %. При РЭП в поздние сроки после хирургического лечения радикальные операции проводились чаще, чем в ранние сроки (75,0 % против 50,0 %). Возможно потому, что рецидивные кисты в поздние сроки часто были «мертвыми» или с обызвествленной капсулой.

Доказано, что традиционная эхинококкэктомия чаще сопровождается послеоперационными осложнениями (в том числе рецидивами заболевания), а радикальная (тотальная перицистэктомия или резекция печени)

более эффективна в отношении профилактики рецидивов, но характеризуется большим числом интраоперационных осложнений [154, 186, 239].

Проведен анализ протоколов оперативных вмешательств у пациентов с РЭП, где были даны характеристики фаз жизнедеятельности кист (n = 28). Состояние жизнедеятельности эхинококковой кисты определяли в соответствии с классификацией М.Ю. Гилевича (1987) [46]: в I фазе находились 6 (21,4 %), во IIА – 8 (28,6 %), в IIБ – 6 (21,4 %) и III – 8 (28,6 %) кист (при множественном эхинококкозе учитывали состояние самой старой кисты). Среди них четвертую часть составляли кисты с нагноением. Есть мнение, что после нагноившейся кисты рецидивы редки, имеют резидуальную или метастатическую природу возникновения, а не имплантационную, поскольку гнойное содержимое разрушает зародышевые элементы эхинококкового пузыря [11, 44]. Также обращает внимание, что пациенты поступают часто (17,9 %) рецидивными кистами с обызвествленной капсулой, и в этих случаях радикальное хирургическое лечение уже становится безальтернативным.

Как показал анализ, кисты в фазе I и IIА чаще (28,6 %) оперировались путем традиционной ЭЭ, а IIБ фазы – резекцией (17,9 %). Кисты III фазы в 21,4 % наблюдений удаляли сочетанием резекции с традиционной ЭЭ (эти кисты чаще встречались при множественном РЭП). Полученные результаты согласуются с литературными данными о том, что при обызвествлении фиброзной капсулы кисты операцией выбора является радикальное вмешательство. При нагноившихся кистах III фазы во время операции эхинококкэктомии в остаточную полость устанавливались дренажные трубки, ввиду высокой вероятности осложнений.

Как показал анализ протоколов операций, остаточную полость обрабатывали: 85 % раствором глицерина или 10 % раствором формалина, или с применением энергии лазерного излучения (расфокусированным лучом углекислотного лазера) с последующим сеансом фотодинамической терапии.

Послеоперационные осложнения у больных РЭП встречались в 5 (17,8 %) случаях. Это были: нагноение остаточной полости, желчный свищ, биллома.

8. МЕРОПРИЯТИЯ ПО УЛУЧШЕНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ РЕЦИДИВОВ ОДНОКАМЕРНОГО ЭХИНОКОККОЗА ПЕЧЕНИ

8.1. Эффективность применения альбендазола для профилактики рецидива заболевания

Laivacuma S. et al. (2015) доказали, что химиотерапия продолжительностью 3 года в итоге приводит к статистически значимым патологическим изменениям в эхинококковых кистах [165].

Нами изучена эффективность применения альбендазола для профилактики рецидива заболевания. Для этого нами был анализирован следующий клинический пример:

Пример. Больной Ш., 22 лет, обратился в РЦХГ в 2014 году (история болезни № 68694) с жалобами на боли в области правого подреберья. При УЗИ органов брюшной полости в правой доле печени (сегментов V - VII) выявлено 4 объемных образования неоднородной структуры, смешанной эхогенности, с четкими контурами. Больной оперирован, выполнено оперативное вмешательство в виде сочетания резекции с закрытой эхинококкэктомией. Микроскопически эхинококковая природа кисты была подтверждена. Назначена профилактика рецидива заболевания альбендазолом в дозе 15 мг/кг веса в сутки, 3 курса в год по 28 дней, с перерывом 14 дней.

Через 7 месяцев после первичной операции пациент обратился с теми же жалобами. При УЗИ в левой доле печени (сегментов II-IV) выявлены 3 объемных образования. Выполнена повторная операция. Один эхинококковый пузырь и его содержимое были взяты на анализ после оперативного вмешательства. Проведено исследование: хитиновая оболочка

эхинококкового пузыря имела серовато-белый цвет, непрозрачное содержимое, без нагноения. Внутри кисты обнаружили дочерние пузыри.

Провели микроскопический анализ удаленного препарата у данного больного на наличие у протосколексов известковых телец, характеризующих их нормальное состояние (рисунок 16).

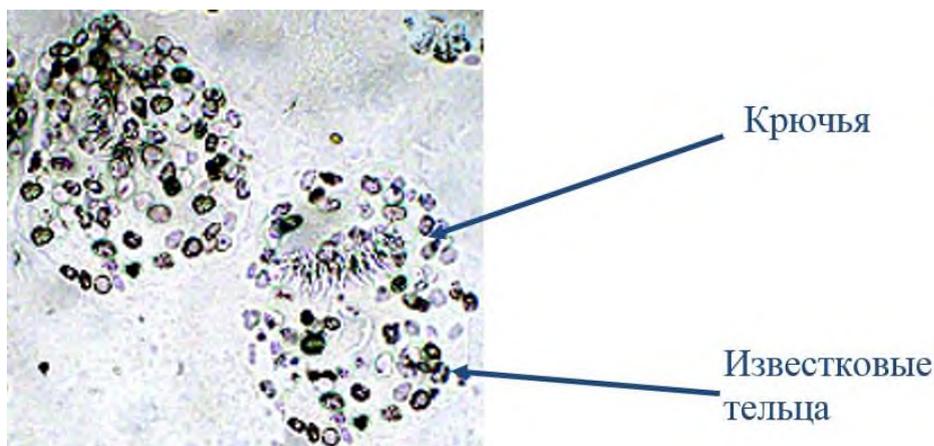


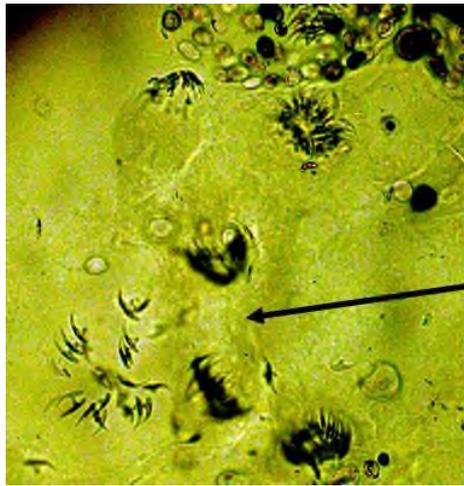
Рисунок 16 — Протосколексы эхинококка с известковыми тельцами (ув. $\times 1500$, окраска раствором Люголя)

Среди протосколексов встречались и деформированные, в них отсутствовали известковые тельца (рисунок 17).



Рисунок 17 — Протосколексы эхинококка без известковых телец (ув. $\times 1500$, окраска раствором Люголя)

Некоторые из них были полностью разрушенными, и крючья находились в пузырьной жидкости (рисунок 17).



Крючья
разрушенных
протосколексов

Рисунок 17 — Поврежденные протосколексы эхинококка
(ув. $\times 1500$, окраска раствором Люголя)

Изучение доли жизнеспособных протосколексов в пузырьной жидкости материнской кисты и в дочерних пузырьках у обследуемого больного с РЭП показал на существенную разницу. Значительно больше было зародышей с известковыми тельцами в дочерних пузырьках (45,0 % против 10,0 %), чем в материнских ($p = 0,03$; $\chi^2 = 4,51$).

Этот пример показал на изменения в материнской эхинококковой кисте схожие с дегенеративными процессами, вызываемыми альбендазолом. Полученные сведения согласуются с литературными данными о том, что альбендазол мало влияет на зародыши внутри дочерних пузырей [231].

За последние годы в практику лечения больных эхинококкозом печени стали внедряться малоинвазивные методы. Отношение к ним неоднозначное. По мнению В.А. Кубышкина и соавт. (2002), показания к их применению должны базироваться в первую очередь на противопоказаниях к радикальным операциям [70]. Ф.Г. Назыров и соавт. (2011 г.) весьма сдержанно относятся к чрескожным миниинвазивным вмешательствам из-за их недостаточной эффективности и возможности генерализации паразитарного процесса [94, 129]. Учитывая, что к чрескожным пункционно-дренирующим, лапароскопическим методам очень строги показания,

они проводятся реже, чем традиционные и радикальные оперативные вмешательства.

Проведенный анализ 28 медицинских карт больных РЭП показал, что 26 (92,8 %) из них имели противопоказания к малоинвазивным вмешательствам по причине множественного характера поражения, центральной локализации, больших размеров или осложненного течения.

Полученный нами результат исследования жизнеспособности протосколексов оправдывает мнение авторов о том, что наличие дочерних пузырей является противопоказанием при лапароскопических, пункционно-дренирующих методах лечения. Хотя есть спорное мнение, что чрескожное дренирование можно использовать даже при наличии дочерних пузырей [164].

На основании полученных данных можно считать, что случайное повреждение во время операции дочерних пузырей является риском развития рецидива даже у больных, получающих химиопрофилактику альбендазолом. Поэтому можно добавить к числу противопоказаний к лапароскопическим методам и наличие дочерних пузырей в кистах, что согласуется с литературными данными.

8.2. Разработка нового раствора для обработки эхинококковой полости после эхинококкотомии

Одной из причин развития рецидива является использование недостаточно эффективных сколексоцидных растворов для обработки ложа эхинококковой кисты после эхинококкотомии. Для этих целей были испытаны следующие препараты: различные концентрации растворов формалина, спирта, риванола, настойка йода, растворы формалина в глицерине, перекись водорода и т.д. Используемые препараты являются хорошими антисептиками, но, к сожалению, не обладают специфическим действием на протосколексы. Более того, эти препараты токсичны. В связи с

определенными условиями проведения оперативного вмешательства — ограничением времени обработки растворами полости кисты не более 3 – 5 мин., препараты для обработки полости цисты должны обладать выраженным противопаразитарным эффектом и с минимальным токсическим действием на организм больного. К сожалению, таких химических агентов нет. Например, ранее широко используемый раствор формалина в низкой концентрации (3 – 5 %) недостаточно активен в отношении протосколексов, а при более высокой концентрации токсичен.

Для обработки ложа эхинококковой кисты должен применяться препарат со специфической активностью против протосколексов без токсического действия на больного. Таким препаратом является антигельминтик празиквантель. Он применяется давно и успешно в лечении трематодозов и цестодозов (в том числе кишечной формы эхинококкоза у собак). Повышая проницаемость мембран клеток гельминтов для ионов кальция, он вызывает генерализованное сокращение мускулатуры паразита, переходящее в стойкий паралич, ведущий к гибели гельминта. Препарат эффективен и для кишечной и для личиночной формы паразита. Период полураспада 0,8 – 1,5 часа. Нетоксичен. Разовая доза от 10 до 33 мг/кг. Видимо, в связи с достаточно быстрым периодом полураспада и проблематичным вопросом его проникновения во внутрь цисты, препарат не эффективен при терапевтическом лечении эхинококкоза. Празиквантель не растворим в воде, но растворим в спирте. При концентрации спирта ниже 35 – 40° он выпадает в осадок. Попытки использовать празиквантель для обработки эхинококковых цист были, но оказались безуспешными. Автор использовал не раствор, а взвесь празиквантеля в 0,85 % растворе хлорида натрия, почему-то решив, что он может быть активным и в нерастворимой форме. При исследовании их жизнеспособности под действием взвеси препарата паразиты оставались живыми несколько часов. Но только в растворе он может быть активным и оказывать специфическое фармакологическое действие. Для работы нами был выбран 50°

спиртовый раствор празиквантеля и 0,1 % хлористого кальция (в смеси), как составляющая его специфической активности. Однако, антигельминтик не обладает свойствами антисептика. Необходимо было ввести в раствор такое вещество. Мы остановились на «Йоксе» в рабочей концентрации 1:40. Раствор «Йокса» представляет собой смесь активных (поливидон йода и аллантаина) и других компонентов с выраженным дезинфицирующим и противовоспалительным эффектом.

Растворимость всех ингредиентов и стабильность- необходимое условие для раствора. Поскольку празиквантель плохо растворяется в разбавленных спиртовых растворах, мы проверили совместимость основных ингредиентов предлагаемого раствора для обработки эхинококковых кист и их стабильность. При выпадении в осадок празиквантеля или других ингредиентов раствор начинает опалесцировать, а затем появляется осадок. Растворимость определяли на ФЭКе. Выпадающий в осадок празиквантель определяется на ФЭКе в концентрации не менее 0,1 мг/мл. Результаты представлены в табл.15.

Таблица 15 — Совместимость основных ингредиентов предлагаемого раствора.

Концентрация йокса, взятого в разведении	Концентрация празиквантеля (мг/мл) в 50° растворе спирта с 0,1 % хлористым кальцием в смеси.				
	40,0	20,0	10,0	5,0	2,5
1:10	р	р	р	р	р
1:20	р	р	р	р	р
1:40	р	р	р	р	р
Примечание — р растворимость полная, срок наблюдения 5 мес.					

Ингредиенты (йокс: празиквантель) смешивали в объемном соотношении как 1:1. Они оказались совместимыми и стабильными в течение 12 месяцев (срок наблюдения) в любых пропорциях.

Изучали влияние некоторых препаратов, используемых в настоящее время для обработки ложа эхинококковых кист после эхинококкэктомии, предлагаемый раствор и его отдельные ингредиенты на жизнестойкость протосколексов. Схема опыта была следующей: 0,05 мл 0,85 % раствора

хлорида натрия с протосколеками помещали на предметное стекло с лункой, добавляли 0,05 мл исследуемого препарата, предметное стекло подогревали примерно до 50°C. Затем клетки паразита изучали под микроскопом. Нагревание предметного стекла с протосколеками до 45 – 50°C стимулировало живых паразитов (просмотр под микроскопом х 80) к волнообразному и поступательному движению, их крючья выворачивались наружу. Если они погибшие, то протосколексы оставались обездвиженными. Сразу же, после внесения препаратов (проходило 5 – 10 секунд), проводили микроскопирование паразитов. В каждом случае просматривали 2 поля зрения (около 50 протосколексов). Исследуемый препарат при добавлении к 0,85 % раствору хлорида натрия с протосколеками разбавлялся примерно в 2 раза, раствор не убирали сознательно, приближая эксперимент к реальным условиям эхинококкэкотомии. Во внутренних складках фиброзной капсулы, где могут находиться протосколексы, может оставаться эхинококковая или тканевая жидкость и, используемые для обработки сколексоцидные агенты, разбавляются. Это отмечали и другие авторы [94]. Результаты опыта представлены в таблице 16.

При использовании празиквантеля, в результате паралича и гибели паразита, они приобретали шаровидную форму, крючья втягивались во внутрь, известковые гранулы смещались к середине тела паразита, между ними и оболочкой появлялся просвет. В 0,85 % стерильном растворе хлорида натрия с добавлением противомикробных препаратов они оставались живыми до 8 – 10 суток.

Из таблицы 16 видно, что контрольное количество живых протосколексов с 0,85 % раствором хлорида натрия было около 60 %. Наибольшим противопаразитарным эффектом обладает раствор празиквантеля в концентрации 5,0 – 20,0 мг/мл с 0,1 % раствором хлористого кальция. Фактически сразу, через 5 – 10 секунд, паразиты погибают. При меньшей концентрации (1,2 – 2,5 мг/мл) остаются живыми только минуту, при концентрации – 0,6 мг/мл две минуты. Настойка йода 2,5 % и

5 % концентраций имеют фактически одинаковую эффективность. На 4 минуте независимо от используемой концентрации йода выявляются единичные живые протосколексы. Возможно, основным действующим противопаразитарным действием обладает не йод, а высокая концентрация спирта.

Таблица 16 — Сколексоцидная активность растворов.

Используемый препарат и его концентрация		% оставшихся живых протосколексов через				
		5-10 сек.	60 сек.	2 мин.	4 мин.	8 мин.
Раствор * хлорида натрия	0,85 %	61	52	59	67	62
Настойка йода	5 %	32	21	11	2	0
	2,5 %	28	24	15	1	0
Раствор формалина	10 %	16	8	3	0	0
	5 %	20	10	7	2	0
	3 %	30	12	11	4	0
Предлагаемый раствор		0	0	0	0	0
И его ингредиенты						
Раствор празиквантела в концентрации (мг/мл) с 0,1 % хлористым кальцием	20,0	0	0	0	0	0
	10,0	0	0	0	0	0
	5,0	0	0	0	0	0
	2,5	1	0	0	0	0
	1,2	2	0	0	0	0
	0,6	6	4	0	0	0
Раствор этилового спирта в градусах	50	40	38	36	24	16
	25	49	53	52	44	31
	12	59	55	47	56	45
Водный раствор йокса в разведении	1:10	58	42	12	8	1
	1:20	53	37	32	16	6
	1:40	57	45	36	19	7
Примечание — * контроль						

Йод также обладает антипаразитарным свойством. Это видно по активности водных растворов йокса. На 8 минуте при концентрациях 1:10, 1:20, 1:40 выявлялись уже единичные живые паразиты. В любом случае основной эффект йода, будь он в свободной или полимерной форме (йокс), связан с выраженным противомикробным действием. 50° спиртовой раствор йода полностью не уничтожал паразитов. Более разбавленные спиртовые растворы (12 – 25°) обладают даже стимулирующими свойствами: активность протосколексов повышалась, амплитуда поступательных и вращательных движений увеличивалась в 2 – 3 раза. Формалин

оказывает сколексоцидное действие. Лучший эффект наблюдался при использовании более высокой концентрации (10 %) — к 2 минутам оставались живыми единичные паразиты. При концентрации 3 – 5 % они оставались живыми до 4 минут.

Раствор для обработки эхинококковых цист после эхинококкотомии, состоящий из 50° спиртового раствора празиквантела (5 мг/мл), йокса (1:40) и 0,1 % хлористого кальция обладал выраженными противопаразитарными свойствами. Уже через 5 – 10 секунд живых паразитов не оставалось. Его противопаразитарная эффективность определяется суммарной активностью празиквантела с хлористым кальцием, поливидон йода и спирта. Антибактериальная — из поливидон йода и спирта.

В эксперименте на эхинококковых цистах печени овец сравнивали эффективность некоторых растворов, используемых в качестве сколексоцидов. Каждым раствором обрабатывали 4 цисты. Всего было исследовано 16 эхинококковых цист в диаметре 3 – 6 см (из них 4 контрольных). Сначала их вскрывали, удаляли эхинококковую жидкость и герментативную оболочку, затем фиброзную капсулу цисты обрабатывали тампонами смоченными разными растворами: 3 % формалином, 5 % йодом, 50° спиртовым раствором празиквантела (5 мг/мл) с 0,1 % хлористым кальцием и йоксом (1:40), а в качестве контроля использовали 0,85 % хлорид натрия. На обработку одной цисты уходило 40 – 60 мл раствора. Через 3 – 4 минуты раствор убирали сухими марлевыми тампонами. Для сбора оставшихся протосколексов и определения живые они или нет, в цисту заливали 10 – 20 мл 0,85 % хлорида натрия и с помощью стеклянной палочки 3 – 5 минут промывали внутреннюю поверхность фиброзной капсулы, раствор собирали шприцом и помещали в цилиндр. Через 10 – 15 минут надосады сливали, осадок из протосколексов исследовался под микроскопом. Общее количество живых клеток паразита обнаруженных в 4 цистах было 1190 (около 60 % от общего исследованного количества протосколексов — 2000). Результаты представлены в таблице 17.

Таблица 17 — Эффективность сколексоцидных растворов на выживаемость паразитов.

Общее количество живых протосколексов в цистах при обработке фиброзной капсулы			
0,85 % NaCl (контроль)	5 % настойкой йода	3 % раствором формалина	раствором празиквантела (5мг/мл) с ингредиентами
1190* (4)**	180 (2)	460 (3)	0 (0)
Примечания: 1. * просматривалось по 500 протосколексов в каждой цисте. 2. ** количество цист с живыми протосколексами.			

Видно, что только при обработке цисты 50° спиртовым раствором празиквантела (5 мг/мл) с 0,1 % хлористым кальцием и йоксом (1:40) все протосколексы погибают. Предлагаемый раствор значительно более эффективнее уничтожает дочерние клетки паразита чем 5 % настойка йода или 3 % раствор формалина ($p < 0,001$).

8.3. Изучение эффективности предлагаемого раствора в клинике

Клинические испытания разработанного раствора проводились на базе Научного центра хирургии им. А.Н.Сызганова и Алма-атинской многопрофильной клинической больнице.

Разработанный раствор празиквантела был использован у 31 добровольцев с эхинококкозом. В возрасте от 6 до 72 лет. При этом эхинококкоз печени был выявлен у 16 больных, эхинококкоз легких — у 7 больных, сочетанный эхинококкоз легкого и печени — у 3 больных, рецидивный эхинококкоз печени — у 5 больных. Все больные были прооперированы (таблица 18).

Таблица 18 — Больные эхинококкозом прооперированные с использованием разработанного раствора.

Группа больных с	Количество прооперированных больных		
	мужчин	женщин	детей
Эхинококкозом печени	7	6	3
Эхинококкозом легких	3	2	2
Сочетанным эхинококкозом легкого и печени	2	0	1
Рецидивным эхинококкозом печени	2	1	2
Всего	14	9	8

Оперативное вмешательство осуществлялось известными способами:

- 1) при эхинококкозе печени — Лапаротомия, эхинококкэктомия печени;
- 2) при эхинококкозе легких — Торакотомия, эхинококкэктомия легкого;
- 3) при сочетанном эхинококкозе легкого и печени — Торакофрентомия, эхинококкэктомия легкого и печени.

Эхинококкэктомия выполняли открытым путем с вскрытием фиброзной капсулы. Основным возможным осложнением эхинококкэктомии печени и легкого, является истечение содержимого кисты в свободную брюшную или плевральную полости. Обязательно подведение в зоне пункции эхинококковой кисты отсосной трубки. Перед пункцией зона операции обкладывалась марлевыми салфетками, смоченными раствором антисептика, производилась пункция кисты иглой d-0,2см. содержимое кисты аспирировалось. Через иглу вводилось 40 – 80 мл (в зависимости от размера паразита) раствора празиквантеля-йокса с экспозицией 1 мин, проводилась повторная аспирация жидкости с последующим вскрытием фиброзной капсулы. Сразу же фиброзная полость эхинококковой кисты обрабатывалась (трижды) тампоном, смоченным раствором (празиквантель-йокс-хлористый кальций) общее время обработки 3 – 5 минут. На конечном этапе, эхинококковая полость осушивалась марлевыми тампо-

нами. Затем остаточная полость ликвидировалась полукисетными швами. При гистологическом исследовании кусочков фиброзной капсулы после обработки раствором празиквантела, как в легком, так и в печени, живых протосколексов не обнаружено. Перифокальное воспаление окружающих кисту тканей было слабовыражено. Очень важно, что разработанный раствор не обладает раздражающим эффектом, поэтому окружающие кисту ткани органов не воспалялись в отличие от ранее применяемого способа обработки остаточной полости кисты горячим 60 – 70° С раствором фурацилина или раствором формалина. В послеоперационный период у 30 больных протекал гладко, без осложнений. Лишь у одного больного (3,2 %) отмечалось нагноение остаточной полости. Все прооперированные больные наблюдаются от нескольких месяцев до 2,5 лет, рецидивы эхинококкоза не наблюдались. В контрольной группе (34 больных) оперированных с применением известных препаратов для обработки цист (растворы фурацилина, формалина, глицерина, йода) у 7 (20,5 %) были отмечены осложнения (нагноение остаточной полости, рецидив эхинококкоза, наружный желчный свищ).

Приводятся несколько примеров эхинококкэктомии у больных с эхинококкозом печени и легких с использованием разработанного раствора.

***Пример 1.** Б-й А. 32г. поступил в торако-абдоминальное отделение Научного центра хирургии им. А.Н.Сызганова с жалобами на боли в правой половине грудной клетки, одышку, кашель с мокротой, повышение температуры тела до 38С^о. Считает себя больным в течении 10 дней. Был обследован. ОАК – НВ – 127 г\л, эр.-3.5x10¹², лейкоциты 11x10, СОЭ-35мм\ч. ОАМ: удельн. Вес 1020, белок-0,033г\л, реакция – кисл., лейкоциты-1-2, эритроц. – отр. Биохим. анализ крови: белок 60г\л, мочевины-5,6ммоль\л, креатинин- 102 мкмоль\л, билирубин – 10,3 мкмоль\л.*

Физикально: в нижней доли правого легкого резко ослаблено, единичные влажные хрипы. На R-грамме в проекции нижней доли правого

легкого определяется округлое гомогенное образование $d=9$ см. (Рисунок 18).



Рисунок 18 — Эхинококковая киста нижней доли правого легкого
(до операции)

Серологическое обследование: РПГА полож., титр 1:1600.

На основании клинико-лабораторных обследований установлен диагноз: Эхинококковая киста правого легкого. Под общим наркозом произведена операция: Торакотомия. Эхинококкэктомия из нижней доли правого легкого. Интраоперационно: киста локализовалась в задне-базальных сегментах правого легкого. В плевральной полости 60ml.серозно-фибринозного выпота. После обкладывания операционного поля салфетками смоченных раствором празиквантеля-йокса, произведена пункция кисты иглой $d=0,2$ см. аспирировано 150 ml прозрачной жидкости. Через иглу введено 40 ml раствора празиквантеля-йокса с экспозицией 1 мин, повторная аспирация жидкости с последующим вскрытием фиброзной капсулы. Затем фиброзная полость эхинококковой кисты обрабатывается 3 раза тампоном смоченным раствором празиквантеля-йокса. При ревизии выявлены два бронхиальных свища $d=0,3$ см, которые были ушиты П-образными швами. Полость кисты ликвидирована 4-мя вертикальными полукисетными швами. Герметичность хорошая. Дрени-

рование плевральной полости по Бюллау. В послеоперационном периоде в 1-е сутки выделилось 70 ml серозно-геморрагического выпота. На контрольной обзорной R-грамме легких: легкое полностью расправлено. В проекции удаленной кисты имеется легкое инфильтративное изменение. Через 2-е суток, ввиду отсутствия выпота, дренаж удален (Рисунок 19).



Рисунок 19 — После операции эхинококкэктомии из легкого на 2-е сутки

Через 4-е сутки на УЗИ в плевральной полости жидкости нет. На 7-е сутки выписан в удовлетворительном состоянии. Контроль через 6 месяцев: изменения со стороны легочной паренхимы не выявлено.

Пример 2. Б-й Е. 45л. поступил в хирургическое отделение Алма-тинской многопрофильной клинической больницы с жалобами на боли и чувство тяжести в правом подреберье, тошноту. Со слов больного вышеуказанные жалобы появились около 20 дней назад. Был обследован: ОАК- эр- $4,5 \times 10^{12}$, Нб-131г\л, ЦП-0,95, СОЭ-30мм\ч. ОАМ- пл.-1023, цвет-солом.-желт., реакц.-кисл., белок- abs, сахар-отр., лейкоц.- 1-3 в п.\зр., эр.- 0-1 в п\зр. Биохим. анализ крови: белок 65г\л, мочевины- 4.2ммоль\л, креатинин- 98 мкмоль\л, билирубин – 14,5 мкмоль\л. УЗИ брюшной полости – В области 8 сегмента печени имеется округлое гиперэхогенное образование d-12см. заключение: эхинококковая киста печени. РПГА положитель-

ная титры 1: 1200. St. Localis: Язык влажный, живот не вздут, мягкий, в правом подреберье пальпируется округлое образование плотноэластической консистенции, d-10см, умеренно болезненное при пальпации. На основании клинико-лабораторных обследования установлен диагноз: Эхинококковая киста печени. 6 ноября 2002г под общим наркозом произведена операция: Лапаротомия. Эхинококкэктомия из правой доли печени. Дренажирование подпеченочного пространства. Интраоперационно – киста локализовалась в 8 сегменте правой доли печени, d-12см. После обкладывания операционного поля салфетками, смоченными раствором празиквантеля-йокса, произведена пункция кисты иглой d-0,2 см. аспирировано 200 ml прозрачной жидкости. Через иглу введено 50 ml раствора празиквантеля-йокса с экспозицией 1 мин., повторная аспирация жидкости с последующим вскрытием фиброзной капсулы. Затем фиброзная полость эхинококковой кисты обрабатывается 3 раза тампоном смоченным раствором празиквантеля-йокса. При ревизии желчных свищей нет. Иссечение фиброзной капсулы в пределах здоровых тканей. Полость кисты ликвидировали кисетными швами. Дренажную трубку в подпеченочное пространство. В послеоперационном периоде выделений по дренажу не было, дренаж убран на 2 сутки. Получал антибиотикотерапию, инфузионную терапию, перевязки. На контрольном УЗИ печени остаточной полости нет. Состояние удовлетворительное, был выписан на 8-е сутки. Повторный осмотр через 1 год - патологии со стороны печени не выявлено.

Пример 3. Б-я Т. 56л. поступила в торако-абдоминальное отделение Научного центра хирургии им. А.Н.Сызганова с жалобами на боли в правом подреберье и пояснице справа, повышение температуры тела до 38⁰С. Длительность заболевания 15 дней. Из анамнеза: в течении 7 последних лет 5 раз была оперирована по поводу эхинококкоза печени, последняя операция 1,5 года назад. Обследована: ОАК — эр-3,0x10¹², Нб-115г\л, лейкоц. — 11,0x10, ЦП-0,85, СОЭ — 40мм\ч. ОАМ — пл.-1021, цвет-солом.-желт., реакц.-кисл., белок- abs, сахар-отр., лейкоц. — 3 – 6 в п.\зр.,

эр. — 0 — 1 в п\зр. Биохим. анализ крови: белок 56г\л , мочевины 6.2ммоль\л, креатинин- 110 мкмоль\л, билирубин — 21,5 мкмоль\л. УЗИ брюшной полости: Паренхима печени неоднородна, в 6 сегменте определяется округлое образование, контуры четкие d-6x8см. Заключение: Эхинококковая киста правой доли печени. РПГА положительная, титры 1:2400. Status Localis: Язык влажный, живот не вздут, мягкий, умеренно болезненный в правом подреберье, там же имеются послеоперационные келлоидные рубцы (рана зажила вторичным заживлением). На основании клинико-лабораторного обследования установлен диагноз: Эхинококковая киста правой доли печени. Учитывая, что у больной имеется массивный спаечный процесс (5 операций на печени), локализацию кисты (6 сегмент), на клиническом разборе было решено провести пункционно-аспирационную эхинококкэктомия под контролем УЗИ. После предоперационной подготовки 14 августа 2002г под в/в наркозом произведена операция: Пункционно-аспирационная эхинококкэктомия. Дренаж полости кисты. Интраоперационно: В области 10 – 11 межреберья по задне-подмышечной линии справа, троакаром d-0,5см , под контролем УЗИ, произведена пункция эхинококковой кисты – выделилось 30 ml жидкости с хлопьями , обрывками хитиновой оболочки и небольшими дочерними эхинококковыми кистами. Произведено промывание полости кисты раствором празиквантела-йокса с экспозицией на 5 минут, затем содержимое откачали. На протяжении 20 суток производили промывание полости кисты в амбулаторных условиях. Контроль УЗИ через 1 месяц — остаточной полости в паренхиме печени не обнаружено. На повторном обследовании через 2 года патологии не обнаружено.

Таким образом, результаты экспериментального исследования, а также опыт клинического применения раствора празиквантела с йоксом показал его высокую эффективность в лечении пациентов с эхинококковой болезнью.

9. ОБОБЩЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эхинококкоз человечеству известен с древности и термин «эхинококкоз» был предложен Рудольфи в 1801 году. Только в конце XIX века было определено его паразитарное происхождение. Вначале предпринятые попытки консервативного лечения, рентгенотерапии не увенчались успехом. На сегодняшний день хирургическое лечение является единственно эффективным. Сейчас эхинококкоз - одно из самых распространенных паразитарных инвазий печени, встречающихся в хирургической практике [53, 147]. По данным Роспотребнадзора Российской Федерации (2016) до настоящего времени эпидемиологическая ситуация по эхинококкозам в России остается сложной. К числу регионов РФ, где регистрируется высокий показатель заболеваемости эхинококкозом населения относятся и Республика Башкортостан. Это тяжелое заболевание в 22 – 54 % случаев осложняется развитием рецидивных кист [40]. Повторные хирургические вмешательства при эхинококкозе отличаются методически и технически значительной сложностью, а в ряде случаев (при множественных и многократных рецидивах) приводят к инвалидности и даже летальному исходу.

Широкий диапазон частоты рецидивов в разных клиниках обусловлен множеством факторов, в том числе эффективностью профилактики. Успех профилактических мероприятий во многом зависит от выявления причины развития рецидива, тем не менее, до настоящего времени отсутствует единство мнений по вопросам, касающимся этиологии (метастатическая, имплантационная, резидуальная, реинвазивная) рецидива. Метод дифференциации рецидивных кист еще не разработан.

Для профилактики рецидивов и лечения ранних этапов развития эхинококкоза широко применяют препарат «альбендазол» с эффективностью 40 – 100 %. Этот препарат назначается в дозе 10 – 20 мг/кг, длительностью 25 – 30 дней и количеством курсов химиотерапии 3 – 20 в год. Рекомендации по назначению схемы химиотерапии не стандартизированы, что во многом определяет актуальность проблемы эхинококкозов.

10. РЕКОМЕНДАЦИИ ДЛЯ ПРАКТИЧЕСКОГО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ

1. В процессе приготовления ИФА тест-систем для диагностики эхинококкоза из эхинококковой жидкости следует учитывать ее возможное загрязнение микрофлорой. Для диагностики осложненной перфорацией в желчные протоки эхинококкоза печени рекомендуется проводить исследование порции С желчи на эхинококковый антиген.

2. Обработка остаточной полости после эхинококкэктомии раствором, содержащий празиквантель, йокс и хлористый кальций, в рекомендуемых соотношениях весьма перспективно в плане предупреждения печеночной недостаточности и рецидива эхинококкоза.

3. Комплекс мероприятий по профилактике рецидива эхинококкоза печени должен включать анализ гена CYP1A2, для дифференцированного подхода к назначению химиотерапии.

4. Схема профилактики рецидива эхинококкоза печени альбендазолом для лиц с фенотипом «быстрого» метаболизма альбендазола включает максимально допустимую суточную дозу 20 мг/кг веса, а с фенотипом «нормального» метаболизма — стандартную, 10 – 15 мг/кг веса.

5. В связи с существенной значимостью определения этиологии рецидивных кист при выборе метода лечения необходимо проводить сравнительные исследования генетической вариабельности первичной и рецидивной кист.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Абаршалина, М.В. Хирургическое лечение тотального эхинококкоза брюшной полости / М.В. Абаршалина, А.С. Фатьянова, Г.Х. Мусаев // Хирургия. — 2012. — № 9. — С. 87 – 89.
2. Абдисаматов, Б.С. Хирургическое лечение эхинококкоза печени / Б.С. Абдисаматов, М.С. Айтназаров, Э. Мадаминов // Наука, новые технологии и инновации. — 2015. — № 3. — С. 70 – 73.
3. Абдримов Е.Г. Применение низкочастотного ультразвука при хирургическом лечении эхинококкоза легких: автореф. дис. ... канд. мед. наук. 11.08.87. Москва, 1987, 36 с.
4. Абдуллаев, А.М. Лапароскопическая эхинококкэктомия у пациентов с эхинококкозом печени / А.М. Абдуллаев, Р.А. Койчурев, И.Г. Ахмедов // Казанский медицинский журнал. — 2015. — № 2. — С. 144 – 149.
5. Абижанов Р.А. Осложненный и рецидивный эхинококкоз печени (диагностика и хирургическое лечение). автореф. дис. ... докт. мед. наук: 29.02.80. Москва. 1980, 34 с.
6. Авасов, Б.А. Резекции печени в хирургическом лечении эхинококкоза печени / Б.А. Авасов // Вестник Кыргызско-Российского славянского университета. — 2013. — Т. 13, № 6. — С. 122 – 123.
7. Айдемиров А.Н. Применение плазменного потока в хирургии эхинококкоза печени. автореф. дис. ... канд. мед. наук: 08.03.95. Ставрополь, 1995, 24 с.
8. Айтназаров, М.С. Оперативное лечение рецидива эхинококкоза печени поддиафрагмальной локализации / М.С. Айтназаров // Вестник Кыргызско-Российского славянского университета. — 2015. — Т. 15, № 7. — С. 11 – 12.
9. Акматов Б.А. Активное комплексное выявление и хирургическое лечение ранних форм и рецидивов эхинококкоза. автореф. дис. ... докт. мед. наук: 09.08.89. Москва, 1989, 38 с.
10. Алиев М.А., С.О. Ордабеков. Осложненный эхинококкоз органов брюшной полости / Алматы: Казахстан, 1996 – 216 с.

11. Алиев, М.Ж. Оперативное лечение эхинококкоза печени и его результаты / М.Ж. Алиев // Вестник КГМА им И.К. Ахунбаева. — 2014. — № 3. — С. 88 – 90.
12. Алиев, М.Ж. Способ клинико-лабораторно-морфологического обоснования антипаразитарной обработки при эхинококкозе печени / М.Ж. Алиев // Вестник КГМА им И.К. Ахунбаева. — 2015. — № 2(1). — С. 123 – 125.
13. Алышева Н. О. Эпидемиологический надзор за паразитарными инвазиями на примере эхинококкоза : автореф. дис. ... канд мед. наук: - Алматы: Республика Казахстан, 2010. — 22 с.
14. Альперович Б.И. Хирургия эхинококкоза и альвеококкоза печени / Томск: Россия. — 1977. — 165 с.
15. Альперович Б.И., Сорокин Р.В., Толкаева М.В., Будков С.Р. Хирургическое лечение рецидивного эхинококкоза печени // Анналы хирург. гепатологии. 2006. Т. 11. № 1. С. 7 – 10.
16. Альперович, Б.И. Криохирургия очаговых поражений печени / Б.И. Альперович, Н.В. Мерзликин, В.Н. Сало [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. — 2011. — № 1. — С. 143 – 149.
17. Амонов, Ш.Ш. Роль пергидроля в ликвидации остаточных полостей при эхинококкозе печени / Ш.Ш. Амонов, М.И. Прудков, З.Ш. Мухамедова, Т.Г. Гульмурадов // Доклады Академии наук Республики Таджикистан. — 2015. — Т. 58, №1. — С. 83 – 88.
18. Анализ ассоциации полиморфных вариантов С-163А гена СYP1A2 у больных раком легкого в РС (Я) / В.М. Николаев, Ф.Г. Иванова, Е.Н. Александрова [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2013. – Прил. 2. — С. 52.
19. Аничкин, В.В. Антипаразитарная обработка фиброзных (остаточных) полостей печени после эхинококкэктомии / В.В. Аничкин, В.В. Мартынюк // Хирургия. Восточная Европа. — 2013. — № 4(08). — С. 85 – 94.

20. Аничкин, В.В. Лечение осложненных форм эхинококкоза печени в экстренной абдоминальной хирургии / В.В. Аничкин, В.В. Мартынюк // Экстренная медицина. — 2014. — № 1(9). — С. 62 – 70.
21. Аничкин, В.В. Метод атипичной резекции с антипаразитарной обработкой печеночной ткани смесью глицерина и 1 – 2 % раствора альбендазола в димексиде у пациентов с эхинококкозом печени / В.В. Аничкин, Э.А. Повелица, В.В. Мартынюк // Новости хирургии. — 2014. — Т. 22, № 3. — С. 360 – 365.
22. Арестова, С.В. Диагностика эхинококкоза у детей на современном этапе / С.В. Арестова, И.В. Афуков, Р.С. Котлубаев [и др.] // Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии. — 2014. — Т. 4, № 2. — С. 30 – 36.
23. Аскерханов Р.П. Хирургия эхинококкоза / Махачкала: Дагестан. — 1976, 372 с.
24. Астановицкий Ф.С. К диагностике эхинококкоза и его рецидивов. автореф. дис. ... канд. мед. наук: 23.08.75. Ставрополь, 1975, 28 с.
25. Ахмедов, И.Г. Анализ отдаленных результатов хирургического лечения эхинококкоза: методологический аспект / И.Г. Ахмедов // Анналы хирургической гепатологии. — 2016. — Т. 21, № 4. — С. 113 – 118.
26. Ахмедов, И.Г. Классификация эхинококковых кист, выявленных после хирургического лечения / И.Г. Ахмедов, А.О. Османов // Хирургия. — 2002. — № 9. — С. 27 – 30.
27. Ахмедов, И.Г. Рецидив эхинококковой болезни: патогенетические аспекты, профилактика, ранняя диагностика и лечение / И.Г. Ахмедов // Хирургия. — 2006. — № 4. — С. 52 – 57.
28. Ахмедов, И.Г. Формирование микроцефалооднокамер в эхинококковой кисте и его индукция *in vitro* / И.Г. Ахмедов // Вестник Дагестанской государственной медицинской академии. — 2015. — № 1(14). — С. 29 – 33.
29. Ахмедов, С.М. Резекция печени при эхинококкозе / С.М. Ахмедов, Н.К. Иброхимов, Б.Дж. Сафаров [и др.] // Анналы хирургической гепатологии. — 2014. — № 2. — С. 49 – 54.

30. Бабакулов, К.К. Химиопрофилактика рецидива эхинококкоза / К.К. Бабакулов, М.Ж. Алиев, А.К. Каниетов // Вестник КГМА им. И.К. Ахунбаева. — 2014. — № 4. — С. 162 – 165.
31. Барыков, В.Н. Хирургическое лечение паразитарных заболеваний печени / В.Н. Барыков, Б.Х. Сарсенбаев, Н.Ф. Зинич [и др.] // Уральский медицинский журнал. — 2013. — № 8(113). — С. 99 – 102.
32. Бекиш, Вл.Я. Состояние генома хозяина при гельминтозах / Вл.Я. Бекиш, О.-Я.Л. Бекиш. — Витебск: ВГМУ, 2004. — 218 с.
33. Белеков Ж.О. Диагностика и хирургическая тактика при сочетанных, осложненных и рецидивных формах эхинококкоза печени. автореф. дис. ... докт. мед. наук: 23.08.97. Алматы, 1997. — 40 с.
34. Бирюков, Ю.В. О влиянии ультразвука – НЧ на протосколексы альвеококка и эхинококка в эксперименте / Ю.В. Бирюков, В.С. Моисеев, Ф.П. Коваленко // Грудная хирургия. — 1988 г. — № 6. — С. 77 – 79.
35. Бодулин А.В. Диагностика и лечение эхинококкоза редкой локализации. автореф. дис. ... канд. мед. наук: 09.04.88. Москва, 1988. — 23 с.
36. Бронштейн, А.М. Эхинококкозы (гидатидозный и альвеолярный) – пограничная проблема медицинской паразитологии и хирургии (обзор и собственные наблюдения) / А.М. Бронштейн, Н.А. Малышев, С.Н. Жаров [и др.] // Российский медицинский журнал. — 2012. — №3. — С. 50 – 53.
37. Буйдаков, В.М. Способ идентификации генотипа G1 у изолятов *Echinococcus granulosus* / В.М. Буйдаков, А.Н. Аслаев, А.А. Гумеров // Медицинская паразитология. — 2010. — № 1. — С. 5 – 8.
38. Вафин, А.З. Диагностика и хирургическое лечение сочетанного эхинококкоза легких / А.З. Вафин, А.В. Дядьков, А.Н. Айдемиров [и др.] // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. — 2013. — № 5. — С. 21 – 25.
39. Вафин, А.З. К определению понятия рецидивного эхинококкоза / А.З. Вафин, А.А. Филус, Т.К. Габеджишвилли // Диагностика и лечение эхинококковой болезни. Ставрополь. — 1983. — С. 190 – 196.

40. Вафин, А.З. Профилактика рецидивов эхинококкоза / А.З. Вафин, И.Г. Щербаков // В кн. Диагностика и лечение эхинококкоза. – Баку, 1987. – С. 73 – 74.
41. Велиева, Т.А. Проблемы диагностики и лечения эхинококкоза / Т.А. Велиева // ScienceRise. — 2015. — Т. 5., № 4(10). — С. 8 – 11.
42. Ветшев, П.С. Эндохирургическое лечение осложненного эхинококкоза печени у детей / П.С. Ветшев, Г.Х. Мусаев, А.С. Фатьянова // Анналы хирургической гепатологии. — 2015. — Т. 20, № 3. — С. 47 – 53.
43. Ветшев, П.С. Эхинококкоз: основы диагностики и роль миниинвазивных технологий (обзор литературы) / П.С. Ветшев, Г.Х. Мусаев, А.С. Фатьянова // Анналы хирургической гепатологии. — 2015. — Т. 20, № 3. — С. 47 – 50.
44. Ветшев, П.С. Эхинококкоз: современное состояние проблемы / П.С. Ветшев, Г.Х. Мусаев, С.В. Бруслик // Украинский журнал хирургии. — 2013. — № 3 (22). — С. 196 – 201.
45. Вишневский, В.А. Радикальное лечение эхинококкоза печени. Современное состояние проблемы / В.А. Вишневский, Р.З. Икрамов, М.А. Кахаров, М.Г. Ефанов // Бюллетень сибирской медицины. — 2007. — № 3. — С. 22 – 26.
46. Вишневский, В.А. Радикальные операции при первичном и резидуальном эхинококкозе печени / В.А. Вишневский, М.Г. Ефанов, Р.З. Икрамов // Анналы хирургической гепатологии. — 2011. — № 4. — С. 25 – 33.
47. Вишневский, В.А. Эхинококкоз печени. Хирургическое лечение / В.А. Вишневский, М.Г. Ефанов, Р.З. Икрамов [и др.] // Доказательная гастроэнтерология. — 2013. — № 2. — С. 18 – 25.
48. Волох Ю.А. К профилактике рецидивов эхинококкоза печени/ Хирургия органов брюшной полости / Целиноград, 1981. — С. 92 – 94.
49. Гаджиев Ш.М. Оценка методов хирургического лечения эхинококкоза легких по данным ближайших и отдаленных результатов. автореф. дис. ... канд. мед. наук: 23.08.84. — Баку, 1984. — 28 с.

50. Гатауллин, Н.Г. Эхинококкоз органов брюшной полости / Н.Г. Гатауллин, М.Х. Камалов, В.В. Плечев // Казанский медицинский журнал. — 1982. — Т. 63, № 6. — С. 33 – 35.
51. Генетический паспорт – основа индивидуальной и предиктивной медицины / под ред. В.С. Баранова. – СПб.: Изд-во Н-Л, 2009. — 528 с.
52. Гилевич, М.Ю. Зависимость способа эхинококкэктомии от стадии развития паразита / М.Ю. Гилевич, А.В. Бодулин // Хирургия. — 1986. — № 4. — С. 94 – 97.
53. Гилевич, М.Ю. Клинико-морфологические обоснования в выборе метода лечения эхинококкоза органов брюшной полости и забрюшинного пространства / М.Ю. Гилевич, Г.М. Князева, Г.С. Натрошвили, И.П. Касторная // Хирургия. — 1990. — № 11. — С. 116 – 120.
54. Гульмурадов, Т.Г. Эндовидеохирургическое лечение эхинококкоза печени / Т.Г. Гульмурадов, Д.С. Сангов, Ф.Н. Назаров // Вестник последипломного образования в сфере здравоохранения. — 2013. — № 3. — С. 18 – 22.
55. Гумеров, А.А. Комплексное лечение эхинококкоза у детей / А.А. Гумеров, Т.Н. Ткаченко, Р.Х. Шангареева // Хирургия. — 2010. — № 1. — С. 25 – 29.
56. Джаборов, А.И. Распространенность эхинококкоза в Республике Таджикистан / А.И. Джаборов // Здравоохранение Таджикистана. — 2013. — № 3(318). — С. 29 – 33.
57. Домашенко, О.Н. Домашенко, О.Н. Эхинококкоз печени: диагностика, лечебная тактика / О.Н. Домашенко, А.Ф. Шаталов, Д.С. Паниева // Известия высших учебных заведений Поволжского региона. Медицинские науки. — 2016. — № 3(39). — С. 35 – 37.
58. Досмагамбетов, С.П. Методы эндовидеохирургии в лечении эхинококкоза печени, осложненного перитонитом у детей / С.П. Досмагамбетов, Г.Б. Кенжалиев, Е.Н. Кенжегулов // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН (электронный журнал). — 2014. — №1. URL: <http://www.elmag.uran.ru> (дата обращения 2014).

59. Ермакова, Л.А. Диагностическая значимость иммуноферментного анализа при ларвальных гельминтозах (трихинеллез, эхинококкоз, токсокароз) / Л.А. Ермакова, Т.И. Твердохлебова, Н.Ю. Пшеничная // Профилактическая и клиническая медицина. — 2012. — № 3(44). — С. 59 – 63.
60. Журавец, А.К. Цистный эхинококкоз – гидатидная болезнь животных и человека / А.К. Журавец. — Новочеркасск, 2004. — 507 с.
61. Иванова, И.Б. Эхинококкоз на территории Хабаровского края. Вопросы лабораторной диагностики / И.Б. Иванова // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. — 2012. — № 20. — С. 92 – 97.
62. Изоформа CYP1A2 как составная часть суперсемейства цитохромов P-450 / Я.Г. Новицкая, В.П. Жердев, А.О. Виглинская, А.А. Литвин // Фармакокинетика и фармакодинамика. - 2014. - №1. С. 4-7.
63. Икрамов Р.З. Кисты печени (диагностика и лечение). автореф. дис. ... докт. мед. наук: 06.04.92. — Москва, 1992. — 36 с.
64. Касыев, Н.Б. Диагностика рецидивного эхинококкоза / Н.Б. Касыев // Вестник КГМА им. И.К. Ахунбаева. — 2013. — № 3. — С. 143 – 145.
65. Касыев, Н.Б. Заболеваемость гидатидозным эхинококкозом населения Киргизской республики / Н.Б. Касыев, Р.М. Баширов, А.Н. Нурбекова // Вестник КГМА им. И.К. Ахунбаева. — 2014. — № 4. — С. 165 – 167.
66. Касыев, Н.Б. Современные подходы к лечению эхинококкоза печени / Н.Б. Касыев, М.С. Айтназаров, А.Н. Нурбекова // Вестник КГМА им. И.К. Ахунбаева. — 2016. — № 3. — С. 68 – 71.
67. Коваленко Ф.П., Бирюков Ю.В. Метод изоляции содержимого эхинококковой кисты при хирургическом лечении гидатидозного эхинококкоза // Эхинококкозы (методы и исследования, лечение, профилактика). — Москва, 1990. — С. 129 – 131.
68. Коваленко, Ф.П. Экспериментальная модель эхинококкозов: оптимизация и применение в разрезе новых методов диагностики, профилактики и лечения эхинококкозов человека и животных: автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 03.00.19 / Коваленко Феликс Павлович. — Москва, 1998. — 59 с.

69. Коновалова Л.М. Изыскание эффективных методов иммунодиагностики цистицеркоза человека. автореф. дис. ... канд. мед.наук: 20.11.74. — Москва, 1974. — 24 с.
70. Корнеев, А.Г. Эхинококкоз в Оренбургской области: эпидемиологические, иммунологические и таксономические аспекты / А.Г. Корнеев, М.В. Тришин, В.В. Соловых [и др.] // Актуальная инфектология. — 2014. — №4 (5). — С. 46 – 49.
71. Кубышкин, В.А. Эволюция методов хирургического лечения эхинококкоза печени / В.А. Кубышкин, В.А. Вишневский, М.А. Кахаров // Анналы хирургической гепатологии. — 2002. — № 1. — С. 18 – 22.
72. Кузьмин, Ю.А. Разработка иммунореагентов и серологических методов и совершенствование диагностики некоторых паразитарных заболеваний. автореф. дис. ... докт. мед. наук: 18.11.91. — Алма-Ата, 1991. — 40 с.
73. Кузьмин, Ю.А. Совершенствование серодиагностики эхинококкоза на основе применения эритроцитарных реагентов. автореф. дис. ... докт. мед. наук: 23.08.82. — Алма-Ата, 1982. — 30 с.
74. Кукес, В.Г. Клиническая фармакология: учебник / В.Г. Кукес; под ред. В.Г. Кукес и Д.А. Сычева. — 5-е изд., испр. и доп. — Москва: ГЭОТАР – Медиа, 2015. — 1024 с.
75. Кулиев, Ю.Б. Наш опыт лечения эхинококкоза печени / Ю.Б. Кулиев, М.М. Тагиев, И.П. Исаев. и др. // Диагностика и лечение эхинококкоза. — 1987. — С. 116 – 117.
76. Курбонов, К.М. Диагностика и тактика хирургического лечения рецидивного эхинококкоза печени / К.М. Курбонов, Д.Е. Давлатов, Ф.И. Махмадов, З.А. Азизов // Здравоохранение Таджикистана. — 2014. — № 2(321). — С. 36 – 43.
77. Лазарева, Е.Н. Оценка возможностей лучевых методов при эхинококкозе печени / Е.Н. Лазарева // Бюллетень медицинских интернет-конференций. — 2013. — Т. 3, № 11. — С. 1314.

78. Лечение эхинококкоза печени взрослых больных, осложненного пециломикозом и ХОБЛ / А.В. Стреляева, С.А. Сапожников, Н.В. Чебышев [и др.] // Хирургическая практика. — 2014. — № 1. — С. 37 – 42.
79. Лотов, А.Н. Сберегающая хирургия при эхинококкозе печени / А.Н. Лотов, Н.Р. Черная, С.А. Бугаев [и др.] // Анналы хирургической гепатологии. — 2011. — Т. 16, № 4. — С. 11 – 17.
80. Мадаминов, Э.М. Абдоминализация полости фиброзной капсулы в лечении эхинококкоза печени / Э.М. Мадаминов // Вестник КГМА им. И.К. Ахунбаева. — 2014. — № 4. — С. 173 – 175.
81. Мадаминов, Э.М. Результат малоинвазивного варианта эхинококкэктомии печени / Э.М. Мадаминов // Наука, новые технологии и инновации. — 2015. — № 1. — С. 111 – 112.
82. Мамлеев, И.А. Лапароскопические эхинококкэктомии при поражении печени у детей / И.А. Мамлеев, А.А. Гумеров, В.У. Сатаев [и др.] // Детская хирургия. — 1999. — №2. — С. 27 – 30.
83. Масленникова, Н.А. Случаи эхинококкоза (альвеококкоза) в Красноярском крае / Н.А. Масленникова, Е.П. Тихонова, Т.Ю. Кузьмина [и др.] // Лечащий врач. — 2013. — № 7. — С. 99.
84. Махмадов, Ф.И. Некоторые аспекты применения диагностической и лечебной видеолапароскопии у больных эхинококкозом печени / Ф.И. Махмадов, К.М. Курбонов, К.Р. Холов // Вестник современной клинической медицины. — 2010. — Т. 3, Прил. 1. — С. 116.
85. Меджидов, Р.Т. Профилактика рецидива абдоминального эхинококкоза / Р.Т. Меджидов, Р.С. Султанова, Ш.Р. Меджидов // Анналы хирургической гепатологии. — 2014. — № 3. — С. 63 – 67.
86. Метод резекции печени с антипаразитарной обработкой печеночной ткани смесью глицерина и 1 – 2 % раствора альбендазола в димексиде у пациентов с эхинококкозом печени / Н.А. Масленникова, Е.Ю. Сергеева, Е.П. Тихонова [и др.] // Казанский медицинский журнал. — 2014. — № 4. — С. 531 – 533.
87. Мефодьев, В.В. Современная эпидемиологическая ситуация по эхинококкозу в Тюменской области / В.В. Мефодьев, Д.Р. Сабирова, О.П.

- Маркова // Итоги и перспективы изучения проблем инфекционных и паразитарных болезней: сборник научных трудов. — Тюмень, 2015. — С. 237 – 242.
88. Милонов О.Б., Гилевич Ю.С. Рецидивы эхинококкоза, его диагностика и лечение / Методические рекомендации. — Ставрополь, 1987. — 25 с.
89. Минаев, С.В. Повышение эффективности лечения эхинококкоза печени в детской хирургической практике / С.В. Минаев, И.Н. Герасименко, Н.И. Быков // Педиатр. — 2013. — Т. 4, № 1. — С. 62 – 64.
90. Минимально инвазивная интраоперационная диагностика и лечение внутренних желчных свищей у пациентов с эхинококкозом печени / Ш.Ш. Амонов, М.И. Прудков, М.А. Кацадзе, О.Г. Орлов // Новости хирургии. — 2014. — № 5. — С. 615 – 620.
91. Михин, И.В. Гигантская эхинококковая киста левой доли печени у пациентки, ранее перенесшей эхинококкэктомия левого легкого / И.В. Михин, О.А. Косивцов, С.В. Пономарев // Волгоградский научно-медицинский журнал. — 2014. — № 3(43). — С. 52 – 56.
92. Мовчун А.А., Колосс О.Е., Шатверян Г.А. К вопросу о профилактике рецидива эхинококкоза органов брюшной полости в хирургической клинике // Эпидемиологический надзор за эхинококкозами. — Москва, 1989. — С. 111 – 112.
93. Мукантаев, Т.Е. Лапароскопическая эхинококкэктомия у пациентов с эхинококкозом печени / Т.Е. Мукантаев // Казанский медицинский журнал. — 2015. — № 2. — С. 138 – 143.
94. Мукантаев, Т.Е. Сравнительная оценка ближайших и отдаленных результатов лапароскопической эхинококкэктомии из печени / Т.Е. Мукантаев // Вестник хирургической гастроэнтерологии. — 2014. — № 1. — С. 31 – 35.
95. Мунтян Н.А. Иммунохимическое изучение антигенной структуры ларвоцисты *Echinococcus granulosus*. автореф. дис. ... канд. мед.наук: 15.09.71. — Москва, 1971. — 24 с.
96. Мусаев, А.И. Частота осложнений и рецидивов эхинококкоза печени в зависимости от способа обеззараживания / А.И. Мусаев, Э. Максут

- уулу, А.Ж. Акешов // Вестник КГМА им. И.К. Ахунбаева. — 2012. — №1. — С. 120 – 122.
97. Мусаев, Г.Х. Возможности хирургического лечения рецидивного эхинококкоза / Г.Х. Мусаев, А.С. Фатьянова, А.С. Бекшоков [и др.] // Хирургия. — 2015. — № 6. — С. 77 – 80.
98. Мусаев, Г.Х. Клинико-экономические особенности различных стратегий гемостаза у пациентов в ходе обширной операции по резекции печени / Г.Х. Мусаев, А.С. Фатьянова, А.С. Бекшоков [и др.] // Хирургия. — 2015. — № 6. — С. 77-80.
99. Мустафин, А.Х. Оперативное лечение эхинококкоза / А.Х. Мустафин, И.А. Сафин, Н.В. Пешков, Д.Р. Мушарапов // Здоровоохранение Башкортостана. Специальный выпуск. — 2000. — № 4. — С. 35.
100. Назаревский Н.Г., Изосимов В.В., Сидоренко В.Д. О рецидивах эхинококковой болезни // Диагностика и лечение эхинококкоза. — Баку 1987. — С. 140 – 142.
101. Назыров Ф.Г., Девятов А.В., Акбаров М.М., Махмудов У.М., Бабаджанов А.Х. Химиотерапия и проблемы рецидивного эхинококкоза печени. // Анн. хир, гепатологии, 2011. — Т. 16. № 4. — С. 19 – 22.
102. Назыров, Ф.Г. Химиотерапия и проблемы рецидивного эхинококкоза печени / Ф.Г. Назыров, А.В. Девятов, М.М. Акбаров [и др.] // Анналы хирургической гепатологии. — 2011. — Т. 16, № 4. — С. 19 – 24.
103. Нартайлаков, М.А. Некоторые аспекты хирургического лечения эхинококкоза / М.А. Нартайлаков, А.Х. Мустафин, И.А. Сафин [и др.] // Здоровоохранение Башкортостана. — 2002. — № 1. — С. 27 – 31.
104. Нартайлаков, М.А. Обследование и лечение пациентов с инфицированными полостными образованиями печени / М.А. Нартайлаков, М.Р. Гараев, А.И. Грицаенко, В.Д. Дорофеев // Медицинский вестник Башкортостана. — 2014. — № 9(6). — С. 96 – 102.
105. Наумов И.Д., Рецидивный эхинококкоз и его классификация / И.Д.Наумов, Н.Г. Бреславский, А.З. Вафин, И.Д. Наумов, Н.Г. Бреславский, А.З. Вафин // Диагностика и лечение эхинококкоза. — Баку, 1987. — С. 142 – 144.

106. Нишанов, Ф.Н. Этиопатогенетические аспекты рецидивного эхинококкоза печени и его диагностика / Ф.Н. Нишанов, М.Ф. Нишанов, А. К. Ботиров, А. З. Отакузиев // Вестник хирургии им. И. И. Грекова. — 2011. — № 2. — С. 91 – 94.
107. Новскреденов, Д.Б. Эхинококковая болезнь печени. автореф. дис. ... докт. мед. наук: 23.08.71. — Москва, 1971. — 40 с.
108. О заболеваемости эхинококкозом и альвеококкозом в Российской Федерации. – Москва: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 2016. — 20 июня, № 01/7782. — С. 16 – 27.
109. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации в 2011 году: государственный доклад. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012. — 316 с.
110. Одишелашвили, Г.Д. Обоснование применения нового способа облитерации остаточных полостей после операции по поводу эхинококкоза печени / Г.Д. Одишелашвили, Д.В. Пахнов, Л.Г. Одишелашвили // Астраханский медицинский журнал. — 2015. — Т. 10, №3. — С. 98 – 105.
111. Однокамерный (гидатидный) эхинококкоз / Н.В. Поляков, В.В. Ромих, Р.М. Сафаров, В.Е. Поляков // Исследования и практика в медицине. — 2015. — Т. 2, № 1. — С. 27 — 35.
112. Ордабеков С. О. Диагностика и тактика лечения эхинококкоза печени, осложненного механической желтухой / С.О. Ордабеков // Медицина. — 2007. — № 7. — С. 10 – 13.
113. Ордабеков С.О., Акшулаков С.К., Кулакеев О.К. «Эхинококкоз человека». — Алматы, 2009. — 512 с.
114. Османов А.О. Диагностика и хирургическое лечение рецидивного и резидуального эхинококкоза органов брюшной полости. автореф. дис. ... канд. мед. наук: 23.08.84. — Москва, 1984. — 32 с.
115. Пантелеев, В.С. Паразитарные поражения печени: альвеококкозы, эхинококкозы / В.С. Пантелеев, М.А. Нартайлаков, Р.Р. Абдеев [и

- др.] // Клиническая и экспериментальная хирургия. Электронный научно-практический журнал ассоциации хирургов Республики Башкортостан. www.JECS.ru (Дата обращения: 11.01.16)
116. Пантелеев, В.С. Способы ликвидации остаточной полости печени после закрытой эхинококкэктомии / В.С. Пантелеев, А.Х. Мустафин, Р.Р. Абдеев [и др.] // Медицинский вестник Башкортостана. — 2015. — Т. 10, № 5(59). — С. 81 — 88.
117. Пантелеев, В.С. Фотодинамическое воздействие и лазероантибиотикотерапия у больных с инфицированными эхинококковыми, непаразитарными кистами и альвеококковыми полостями распада печени / В.С. Пантелеев, Д.Р. Мушарапов, М.А. Нартайлаков // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. — 2011. — Т. 4, №4. — С. 815 – 817.
118. Помелов, В.С. Диагностика и лечение эхинококкоза печени, осложненного прорывом в желчные пути / В.С. Помелов, Ш.И. Каримов, Х.Т. Нишанов // Хирургия. — 1991. — № 12. — С. 87 – 91.
119. Пулатов, А.Т. Классификация оперативных вмешательств, методов обеззараживания и ликвидация остаточных полостей при эхинококкозе у детей: тезисы докл. / Пулатов А.Т., Хамиджанов Э.Х. // Всесоюзной научной конф. Хирургов. — 1987. — Т. 125, № 11. – С. 99 – 103.
120. Раззаков М.А. Иммунохимический анализ антигенов эхинококка и альвеококка. автореф. дис. ... канд. мед.наук:23.08.75. — Москва, 1975. — 30 с.
121. Рожин, К.А. Динамика эпизоотического процесса по эхинококкозу в Российской Федерации и Оренбургской области / К.А. Рожин, П.И. Христиановский // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. — 2014. — №1. — С. 5.
122. Руководство по хирургии очаговых паразитарных заболеваний печени / Н.В. Мерзликин, Альперович Б.И., Бражникова Н.А [и др.]; под ред. Н.В. Мерзликина. — Томск: Изд-во «Печатная мануфактура», 2013. — 468 с.

123. Салимов, Ш.Т. Возможности хирургического лечения рецидивного эхинококкоза / Ш.Т. Салимов, Б.З. Абдусаматов, А.Ш. Вахидов // Детская хирургия. — 2015. — № 3. — С. 9 – 12.
124. Сангов, Д.С. Видеоэндоскопическая хирургия эхинококкоза печени / Д.С. Сангов, Ф.Н. Назаров, Т.Г. Гульмурадов // Здравоохранение Таджикистана. — 2013. — № 3(318). — С. 53 – 57.
125. Сергеева, Е.Ю. Оценка активности ферментов антиоксидантной активности у больных эхинококкозом с целью персонализации терапии / Е.Ю. Сергеева, Е.П. Тихонова, Н.А. Масленникова [и др.] // Современные проблемы науки и образования. — 2014. — № 6. — С. 1206.
126. Скипенко, О.Г. Эхинококкоз печени: современные тенденции в хирургической тактике / О.Г. Скипенко, В.Д. Паршин, Г.А. Шатверян [и др.] // Анналы хирургической гепатологии. — 2011. — Т. 16, №4. — С. 34 – 38.
127. Степанковская Л.П. Изучение эффективности реакции непрямой геммагглютинации при эхинококкозе и альвеококкозе человека и роли группоподобных антигенов в образовании ложноположительных серологических реакций с эхинококковым диагностикумом. автореф. дис. ... канд. мед.наук:03.03.72. — Москва, 1972. — 26 с.
128. Султанова, Р.С. Профилактика абдоминального эхинококкоза / Р.С. Султанова, Р.Т. Меджидов, Ш.Р. Меджидов // Современная наука: актуальные проблемы и пути их решения. — 2014. — № 8. — С. 18 – 23.
129. Тарасенко, В.С. Тактика хирургического лечения эхинококкоза легких и печени / В.С. Тарасенко, С.А. Корнилов, Н.Г. Асауф // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. — 2014. — № 1. — С. 7.
130. Толстикова, А.П. Хирургическое лечение больных с эхинококкозом печени / А.П. Толстикова, А.В. Абдульянов, М.А. Бородин, А.М. Имамова // Практическая медицина. — 2013. — № 2(67). — С. 94 – 97.

131. Толстокоров, А.С. Лечение эхинококкоза диафрагмальной поверхности печени / А.С. Толстокоров, Ю.С. Гергенретер // Современные проблемы науки и образования. — 2013. — №5. — С. 335.
132. Тулин, А.И. Диагностика и хирургическое лечение эхинококкоза печени в Латвии / А.И. Тулин, Р. Рибениекс, Е.Н. Погодина [и др.] // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. — 2012. — Т. 171, № 1. — С. 38 – 44.
133. Турсунов, Т.Т. Ларвицидное действие глауконита / Т.Т. Турсунов, Е.А. Дардыкина // Вестник Кыргызско-Российского славянского университета. — 2015. — Т. 15, № 4. — С. 167 – 169.
134. Удовикова, О.И. Эхинококкоз в практике врача / О.И. Удовикова, Е.В. Иванишкина, Л.С. Хибин [и др.] // Земский врач. — 2015. — № 2 (26). — С. 51-54.
135. Утепкалиев М.Р. Эхинококкоз печени с поражением желчных путей (диагностика и хирургическое лечение. автореф. дис. ... канд. мед. наук: 23.08.92. — Москва, 1992. — 24 с.
136. Холин, А.В. Состояние проблемы и комплексная лучевая диагностика эхинококковых кист различных локализаций. Ч. I: Состояние проблемы / А.В. Холин, Г.Т. Аманбаева, Ж.Э. Абдыкадырова // Профилактическая и клиническая медицина. — 2015. — № 1(54). — С. 78 – 85.
137. Хушвактов, У.Ш. Особенности диагностики и хирургического лечения поздних рецидивов эхинококкоза: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.17 / Хушвактов Уткир Шоназарович. — Ставрополь, 2012. — 24 с.
138. Черноусов, А.Ф. Эхинококкоз: стратегия и тактика / А.Ф. Черноусов, Г.Х. Мусаев, А.С. Фатьянова // Вестник хирургической гастроэнтерологии. — 2013. — № 4. — С. 5 – 10.
139. Чжао, А.В. Хирургическое лечение эхинококкоза печени / А.В. Чжао, Р.З. Икрамов // Хирургия. Приложение к журналу Consilium Medicum. — 2016. — № 2. — С. 15 – 17.

140. Чубирко, М.И. Использование метода иммуноферментного анализа в диагностике паразитарных заболеваний / М.И. Чубирко, Ю.А. Березина, И.К. Азаренкова // Научно-медицинский вестник Центрального Черноземья. — 2014. — № 58. — С. 122 – 126.
141. Шангареева, Р.Х. Видеолапароскопическое лечение эхинококкоза печени у детей / Р.Х. Шангареева, А.А. Гумеров, И.А. Мамлеев [и др.] // Детская хирургия. — 2008. — № 6. — С. 32 – 36.
142. Шангареева, Р.Х. Тактика лечения детей сочетанным эхинококкозом / Р.Х. Шангареева, А.А. Мирасов, В.В. Глазырина, Э.К. Тимербаяева // Хирургия. — 2017. — №1. — С. 48 – 53.
143. Школяр, Н.А. Эффективность нокодазола при экспериментальной инвазии *Echinococcus granulosus* белых мышей / Н.А. Школяр, И.В. Кухалева, Ю.А. Легоньков, Ф.П. Коваленко // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. — 2014. — № 2. — С. 42 – 46.
144. Эрдман, В.В. Возрастные особенности полиморфизма -163С/А гена *CYP1A2* в трех этнических группах жителей Республики Башкортостан / В.В. Эрдман, Т.Р. Насибуллин, И.А. Туктарова // Успехи геронтологии. — 2014. — № 3. — С. 25 – 30.
145. Эхинококкоз печени / М.А. Нартайлаков, В.В. Плечев, Д.Р. Мушарапов, Г.И. Лукманова. — Уфа, 2006. — 104 с.
146. Abdel-Azeem S. Abdel-Baki. In Vitro Scolicidal Effects of *Salvadora persica* Root Extract against Protoscolices of *Echinococcus granulosus* / Abdel-Azeem S. Abdel-Baki [et al.] // Korean J. Parasitol. — 2016. — Vol. 54, №1. — P. 61 – 66.
147. Abdel-Moein, K.A. Norway rat (*Rattus norvegicus*) as a potential reservoir for *Echinococcus granulosus*: A public health implication / K.A. Abdel-Moein, D.A. Hamza // Acta Parasitol. — 2016. — Vol. 61, № 4. — P. 815 – 819.
148. Akay, S. Development of a cutaneous fistula following hepatic cystic echinococcosis / S. Akay, N. Erkan, M. Yildirim, H. Akay // Springerplus. — 2015. — Vol. 4. — P. 538.

149. Akkucuk, S. Comparison of surgical procedures and percutaneous drainage in the treatment of liver hydatid cysts: a retrospective study in an endemic area / S. Akkucuk [et al.] // *Int. J. Clin. Exp. Med.* — 2014. — Vol. 7, №8. — P. 2280 – 2285.
150. Alvela-Suárez, L. Safety of the Combined Use of Praziquantel and Albendazole in the Treatment of Human Hydatid Disease / L. Alvela-Suárez [et al.] // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* — 2014. — Vol. 7, № 90. — P. 819 – 822.
151. Amine, B. Changing paradigms in the surgical management of cystic liver hydatidosis improve the postoperative outcomes / B. Amine [et al.] // *Surgery.* — 2016. — Vol. 159, № 4. — P. 1170 – 1180.
152. Anand, S. Management of liver hydatid cysts – Current perspectives / S. Anand, S. Rajagopalan, R. Mohan // *Med. J. Armed. Forces India.* — 2012. — Vol. 68, № 3. — P. 304 – 309.
153. Bakal, U. Surgical and Molecular Evaluation of Pediatric Hydatid Cyst Cases in Eastern Turkey / U. Bakal, S. Simsek, A. Kazez // *Korean J. Parasitol.* — 2015. — Vol. 53, №6. — P. 785 – 788.
154. Baliharova, V. Inhibitory effect of albendazole and its metabolites on cytochromes P450 activities in rat and mouflon in vitro / V. Baliharova [et al.] // *Pharm. Rep.* — 2005. — Vol. 57, № 1. — P. 97 – 106.
155. Bapiro. T.E. Cytochrome P450 1A1/2 induction by antiparasitic drugs: dose-dependent increase in ethoxyresorufin O-deethylase activity and mRNA caused by quinine, primaquine and albendazole in HepG2 cells / T.E. Bapiro [et al.] // *European Journal of Clinical Pharmacology.* — 2002. — Vol. 58, № 8. — P. 537 – 542.
156. Bari, S.-U. Role of Albendazole in the Management of Hydatid Cyst Liver / S.-U. Bari [et al.] // *Saudi J. Gastroenterol.* — 2011. — Vol. 17, №5. — P. 343 – 347.
157. Boufana B. Reprint of "Echinococcus granulosus sensu stricto (s.s.) from the critically endangered antelope Addax nasomaculatus in Tunisia" / B. Boufana [et al.] // *Acta Trop.* — 2017. — Vol. 165, SI. — P. 17 – 20.

158. Bowles, J. Rapid discrimination of Echinococcus species and strains using a polymerase chain reaction-based RFLP method / J. Bowles, D.P. McManus // *Mol. Biochem. Parasitol.* – 1993. – Vol. 57, №2. – P. 231 – 9.
159. Brunetti, E. Cystic Echinococcosis: Chronic, Complex, and Still Neglected / E. Brunetti, H.H. Garcia, T. Junghanss // *PLoS Negl. Trop. Dis.* — 2011. — Vol. 5, № 7. — P. e1146.
160. Cappello, E. Epidemiology and clinical features of cystic hydatidosis in Western Sicily: A ten-year review / E. Cappello [et al.] // *World J. Gastroenterol.* — 2013. — Vol. 19, № 48. — P. 9351 – 9358.
161. Carlos, M. Infected Hepatic Echinococcosis: Results of Surgical Treatment of a Consecutive Series of Patients / M. Carlos, U. Sebastian // *Surg. Infect.* — 2015. — Vol. 16, № 5. — P. 553 – 557.
162. Chaabane-Banaoues, R. A novel PCR-RFLP assay for molecular characterization of Echinococcus granulosus sensu lato and closely related species in developing countries / R. Chaabane-Banaoues [et al.] // *Parasitol. Res.* — 2016. — Vol. 115, №10. — P. 3817 – 3824.
163. Chen, X. The Comparison of 2 New Promising Weapons for the Treatment of Hydatid Cyst Disease: PAIR and Laparoscopic Therapy / X. Chen [et al.] // *Surg. Laparosc. Endosc. Percutan. Techn.* — 2015. — Vol. 25, № 4. — P. 358 – 362.
164. Chihai, O. Slaughterhouse survey of cystic echinococcosis in cattle and sheep from the Republic of Moldova / O. Chihai [et al.] // *J. Helminthol.* — 2016. — Vol. 90, №3. — P. 279 – 283.
165. Ciprian, D. Minimally Invasive Treatment of Liver Hydatidosis / D. Ciprian [et al.] // *J. Soc. Laparoendosc. Surg.* — 2016. — Vol. 20, №1. — P. e2016.00002.
166. Clin, Br. J. Albendazole-praziquantel interaction in healthy volunteers: kinetic disposition, metabolism and enantioselectivity / R.M. Lima [et al.] // *Br. J. Clin. Pharmacol.* — 2011. — Vol. 71, №4. — P. 528 – 535.
167. Dezaki, E.S. Differential Expression of Hox and Notch Genes in Larval and Adult Stages of Echinococcus granulosus / E.S. Dezaki [et al.] // *Korean J. Parasitol.* — 2016. — Vol. 54, № 5. — P. 653 – 658.

168. Dinc, B. Platelet function parameters in management of hepatic hydatid disease: a case-controlled study / B. Dinc [et al.] // *Int. J. Clin. Exp. Med.* — 2015. — Vol. 8, №3. — P. 3869 – 3875.
169. Dos Santos, G.B. Excretory/secretory products in the *Echinococcus granulosus* metacestode: is the intermediate host complacent with infection caused by the larval form of the parasite? / G.B. dos Santos [et al.] // *Int. J. Parasitol.* — 2016. — Vol. 46, № 13 – 14. — P. 843 – 856.
170. *Echinococcus* metacestode: in search of viability markers / B. Gottstein [et al.] // *Parasite.* — 2014. — Vol. 21. — P. 63.
171. Efficacies of Albendazole Sulfoxide and Albendazole Sulfone against In Vitro-Cultivated *Echinococcus multilocularis* Metacestodes / K. Ingold [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 1999. — Vol. 43, №5. — P. 1052 – 1061.
172. El Malki, H.O. Postoperative recurrence of cystic hydatidosis: What are the predictive factors? / H.O. El Malki, A. Souadka // *Can. J. Surg.* — 2013. — Vol. 56, №3. — P. E44.
173. Fatin, R. Hydatid Cyst: Open or Laparoscopic Approach? A Retrospective Analysis / R. Fatin, M.D. Polat // *Surg. Laparosc. Endosc. Percutan. Tech.* — 2012. — Vol. 22, №3. — P. 264 – 266.
174. Gavara, C.G. Review of the treatment of liver hydatid cysts / C.G. Gavara [et al.] // *World J. Gastroenterol.* — 2015. — Vol. 7, №21. — P. 124 – 131.
175. Genetic diversity of *Echinococcus* spp. in Russia / S.V. Konyaev [et al.] // *Parasitology.* — 2013. — Vol. 140. — P. 1637 – 1647.
176. Georgiou, G.K. Surgical management of hydatid liver disease / G.K. Georgiou [et al.] // *Int. J. Surg.* — 2015. — Vol. 20. — P. 118 – 122.
177. Gharbi, H.A. Ultrasound examination of the hydatid liver / H.A. Gharbi [et al.] // *Radiology.* — 1981. — Vol. 139. — P. 459 – 463.
178. Giovanni, V. Major liver resection for recurrent hydatid cyst of the liver after suboptimal treatment / V. Giovanni [et al.] // *Updat. Surg. Ital.* — 2016. — Vol. 68, №2. — P. 179 – 184.

179. Giri, S. A review on diagnostic and preventive aspects of cystic echinococcosis and human cysticercosis / S. Giri, S.C. Parija // *Trop. Parasitol.* — 2012. — Vol. 2, №2. — P. 99 – 108.
180. Hayati, P.S. Chronic Hydatid Cyst in Malaysia: A Rare Occurrence / P.S. Hayati, C.B.T. Eugene, B.J. Jin, I.M. Rose // *Malays J. Med. Sci.* — 2015. — Vol. 22, №1. — P. 79 – 83.
181. He, Y.B. Efficacy of radical and conservative surgery for hepatic cystic echinococcosis: a meta-analysis / Y.B. He [et al.] // *Int. J. Clin. Exp. Med.* — 2015. — Vol. 8, № 5. — P. 7039 – 7048.
182. Hemphill, A. Treatment of echinococcosis: albendazole and mebendazole— what else? / A. Hemphill [et al.] // *Parasite.* — 2014. — Vol. 21. — P. 70.
183. Hepatic echinococcosis: Clinical and therapeutic aspects / G. Nunnari [et al.] // *World J. Gastroenterol.* — 2012. — Vol. 18, №13. — P. 1448 – 1458.
184. Hizem, A. Molecular genotyping of *Echinococcus granulosus* using formalin-fixed paraffin-embedded preparations from human isolates in unusual tissue sites / A. Hizem [et al.] // *J. Helminthol.* — 2016. — Vol. 90, №4. — P. 417 – 421.
185. Hossein, M. Efficacy of *Myrtus communis* L. to Inactivate the Hydatid Cyst Protoscoleces / M. Hossein [et al.] // *J. Investig. Surg.* — 2016. — Vol. 29, №3. — P. 137 – 143.
186. Ingold, K. Effect of albendazole sulphoxide on viability of hydatid protoscoleces in vitro / K. Ingold [et al.] // *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* — 1986. — Vol. 80, № 5. — P. 815 – 7.
187. Ito, A. Cystic echinococcosis: Future perspectives of molecular epidemiology / A. Ito [et al.] // *Acta Tropica.* — 2017. — Vol. 165, SI. — P. 3 – 9.
188. Jani, K. Spillage-free laparoscopic management of hepatic hydatid disease using the hydatid trocar canula / K. Jani // *J. Minim. Access. Surg.* — 2014. — Vol. 10, № 3. — P. 113 – 118.

189. Julio, C. Biopharmaceutic evaluation of novel anthelmintic (1H-benzimidazol-5(6-yl)carboxamide derivatives / C. Julio [et al.] // *J. Pharm.* — 2007. — Vol. 343, № 1. — P. 159 – 165.
190. Karabulut, K. Long-term outcomes of intraoperative and perioperative albendazole treatment in hepatic hydatidosis: single center experience / K. Karabulut [et al.] // *Ann. Surg. Treat. Res.* — 2014. — Vol. 87, №2. — P. 61 – 65.
191. Kelly, K. Cystic diseases of the liver and bile ducts / K. Kelly, S.M. Weber // *J. Gastrointest. Surg.* — 2014. — Vol. 18, №3. — P. 627 – 634.
192. Kinkar Laurimae, L. High-resolution phylogeography of zoonotic tapeworm *Echinococcus granulosus sensu stricto* genotype G1 with an emphasis on its distribution in Turkey, Italy and Spain / L. Kinkar Laurimae [et al.] // *Parasitology.* — 2016. — Vol. 143, № 13. — P. 1790 – 1801.
193. Krasniqi, A. The Role of Perioperative Endoscopic Retrograde Cholangiopancreatography and Biliary Drainage in Large Liver Hydatid Cysts / A. Krasniqi [et al.] // *Sci. World J.* — 2014. — P. 301891.
194. Laivacuma, S. Cystic echinococcosis: epidemiological and clinical aspects of Latvian population and review of the literature / S. Laivacuma, A. Ivanovs, A. Derovs, L. Viksna // *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.* — 2015. — № 7(119). — С. 24 – 30.
195. Laparoscopic Drainage of a Hepatic Echinococcal Cyst: A Case Report / S.B. Goldin, J.L. Mateka, M.J. Schnaus, S. Dahal // *Rep. Gastrointest. Med.* – 2011. – Vol. 2011. – P. 107087.
196. Laparoscopic Management of Hydatid Cyst of Liver with Palanivelu Hydatid System over a Period of 3 Years: A Case Series of 32 Patients / D.S. Samala [et al.] // *Ind. J. Surg.* — 2015. — Vol. 77, №3. – P. S918 – S922.
197. Li, T. Post-Treatment Follow-Up Study of Abdominal Cystic Echinococcosis in Tibetan Communities of Northwest Sichuan Province, China / T. Li [et al.] // *PLoS. Negl. Trop. Dis.* — 2011. — Vol. 5, №10. — P. e1364.
198. Li, W. Multiorgan resection with inferior vena cava reconstruction for hepatic alveolar echinococcosis. A case report and literature review / W. Li, H. Wu // *Medicine.* — 2016. — Vol. 95. — P. 23 (e3768).

199. Li, H. Laparoscopic approach for total cystectomy in treating hepatic cystic echinococcosis / H. Li [et al.] // *Parasite*. — 2014. — Vol. 21. — P. 65.
200. Lianos, G.D. Unusual locations of hydatid disease: a 33 years' experience analysis on 233 patients / G.D. Lianos [et al.] // *Updat. Surg. Ital.* — 2015. — Vol. 67, № 3. — P. 279 – 282.
201. Loetsch, F. Intra-cystic concentrations of albendazole-sulphoxide in human cystic echinococcosis: a systematic review and analysis of individual patient data / F. Loetsch [et al.] // *Parasitol. Res.* — 2016. — Vol. 115, №8. — P. 2995 – 3001.
202. Mahami-Oskouei, M. Gene flow for *Echinococcus granulosus* metapopulations determined by mitochondrial sequences: A reliable approach for reflecting epidemiological drift of parasite among neighboring countries / M. Mahami-Oskouei [et al.] // *Exp. Parasitol.* — 2016. — Vol. 171. — P. 77 – 83.
203. Majbar, A.M. Asymptomatic intra-peritoneal rupture of hydatid cyst of the liver: case report / [et al.] // *BMC Res Notes*. — 2014. — Vol. 7. — P. 114.
204. Manterola, C. Risk factors of postoperative morbidity in patients with uncomplicated liver hydatid cyst / C. Manterola, T. Otzen, S. Urrutia // *Int. J. Surg.* — 2014. — Vol. 12, №7. — P. 695 – 699.
205. Marques, M.P. Albendazole metabolism in patients with neurocysticercosis: antipyrine as a multifunctional marker drug of cytochrome P450 / M.P. Marques, O.M. Takayanagui, V.L. Lanchote // *Brazil. J. Med. Biol. Res.* — 2002. — Vol. 35, № 2. — P. 261 – 9.
206. Martel, G. Surgical management of symptomatic hydatid liver disease: experience from a Western centre / [et al.] // *Can. J. Surg.* — 2014. — Vol. 57, № 5. — P. 320 – 326.
207. Missori, S. Frequencies of genetic polymorphisms related to triptans metabolism in chronic migraine Giovanna Gentile / S. Missori [et al.] // *J. Headache Pain*. — 2010. — Vol. 11. — P. 151 – 156.
208. Mohammadreza, T. Primary Hydatid Cyst of Umbilicus, Mimicking an Umbilical Hernia / T. Mohammadreza [et al.] // *Case Rep. Surg.* — 2016. — №9682178.

209. Mousavi, S.R. A retrospective survey of human hydatidosis based on hospital records during the period of 10 years / S.R. Mousavi, M. Samsami, M. Fallah, H. Zirakzadeh // *J. Parasit. Dis.* — 2012. — Vol. 366 №1. — P. 7 – 9.
210. Naseri, M. Scolicidal and apoptotic activities of albendazole sulfoxide and albendazole sulfoxide-loaded PLGA-PEG as a novel nanopolymeric particle against *Echinococcus granulosus* protoscoleces / M. Naseri [et al.] // *Parasitol. Res.* — 2016. — Vol. 115, №12. — P. 4595 – 4603.
211. Nazligul, Y. Role of Chemotherapeutic Agents in the Management of Cystic Echinococcosis / Y. Nazligul, M. Kucukazman, S. Akbulut // *Int. Surg.* — 2015. — Vol. 100, №1. — P. 112 – 114.
212. Neumayr, A. Justified Concern or Exaggerated Fear: The Risk of Anaphylaxis in Percutaneous Treatment of Cystic Echinococcosis - A Systematic Literature Review / A. Neumayr [et al.] // *PLoS Negl. Trop. Dis.* – 2011. – Vol. 5, №6. — P. e1154.
213. Nihat, A. Unusually located primary hydatid cyst / A. Nihat [et al.] // *Turk. J. Surg.* — 2016. — Vol. 32, № 2. — P. 130 – 133.
214. Nooghabi, A.J. Evaluation and Comparison of the Early Outcomes of Open and Laparoscopic Surgery of Liver Hydatid Cyst / A.J. Nooghabi [et al.] // *Surg. Laparosc. Endosc. Percutan. Tech.* — 2015. — Vol. 25, №5. — P. 403 – 407.
215. Osemek, P. Single hydatid cyst of liver managed with laparoscopy – a case study / P. Osemek, A. Chmieliński, K. Paśnik, R. Kidziński // *Wideochir. Inne Tech. Maloinwazyjne.* — 2011. — Vol. 6, №4. — P. 264–267.
216. Oudni-M'rad, M. First molecular evidence of the simultaneous human infection with two species of *Echinococcus granulosus* sensu lato: *Echinococcus granulosus* sensu stricto and *Echinococcus Canadensis* / M. Oudni-M'rad [et al.] // *Parasitol. Res.* — 2016. – Vol. 115, №3. – P. 1065 – 1069.
217. Oz, G. Aggressive hydatid cysts: characteristics of six cases / G. Oz [et al.] // *Surg. Today.* — 2015. — Vol. 45, № 7. — P. 864 – 870.

218. Ozgur, B. Laparoscopic versus open surgery for hydatid disease of the liver. A single center experience / B. Ozgur [et al.] // *Ann. Ital. Chirurg.* — 2016. — Vol. 87, №3. — P. 237 — 241.
219. Panic, G. Repurposing drugs for the treatment and control of helminth infections / G. Panic, U. Duthaler, B. Speich, J. Keiser // *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* — 2014. — Vol. 4, №3. — P. 185 – 200.
220. Paula Scioscia, N. Reprint of "Survey and first molecular characterization of *Echinococcus granulosus sensu stricto* (G1) in Pampas fox (*Lycalopex gymnocercus*) in Buenos Aires province, Argentina" / N. Paula Scioscia [et al.] // *Acta Trop.* — 2017. — Vol. 165, SI. — P. 21 – 25.
221. Pazarci, O.Z. Treatment of Bifocal Cyst Hydatid Involvement in Right Femur with Teicoplanin Added Bone Cement and Albendazole / O.Z. Pazarci, O.B. Oztemur, O. Bulut // *Case Rep. Orthop.* — 2015. — P. 824824.
222. Piccoli, L. Long-term Sonographic and Serological Follow-up of Inactive Echinococcal Cysts of the Liver: Hints for a “Watch-and-Wait” Approach/ L. Piccoli [et al.] // *PLoS Negl. Trop. Dis.* — 2014. — Vol. 8, №8. — P. e3057.
223. Polat, F.R. Hydatid Cyst: Open or Laparoscopic Approach? A Retrospective Analysis / F.R. Polat // *Surg. Laparosc. Endosc. Percutan. Tech.* — 2012. — Vol. 22, №3. — P. 264 – 267.
224. Prousalidis, J. Postoperative recurrence of cystic hydatidosis / J. Prousalidis [et al.] // *Can. J. Surg.* — 2012. — Vol. 55, №1. — P. 15 – 20.
225. Pujahari, A.K. The symposium on management of liver hydatid cyst – Current prospective: An addendum / A.K. Pujahari [et al.] // *Med. J. Armed Forces India.* — 2013. — Vol. 69, № 1. — P. 100 – 100.
226. Quail, J.F. Hydatidosis of the liver and posterior mediastinum / J.F. Quail [et al.] // *Int. J. Surg.* — 2015. — Vol. 7. — P. 26 – 28.
227. Rahimi, M.T. Scolicidal activity of biosynthesized silver nanoparticles against *Echinococcus granulosus protoscolices* / M.T. Rahimi [et al.] // *Int. J. Surg.* — 2015. — Vol. 19. — P. 128 – 133.
228. Raimkylov, K.M. Epidemiological analysis of the distribution of cystic and alveolar echinococcosis in Osh Oblast in the Kyrgyz Republic, 2000–

- 2013 / K.M. Raimkylov, O.T. Kuttubaev, V.S. Toigombaeva // *J. Helminthol.* — 2015. — Vol. 89, №6. — P. 651 – 654.
229. Rawden, H.C. Relative contribution of cytochromes P-450 and avin-containing monooxygenases to the metabolism of albendazole by human liver microsomes / H.C. Rawden, G.O. Kokwaro, S.A. Ward, G. Edwards // *Br. J. Clin. Pharmacol.* — 2000. — Vol. 49. — P. 313 – 322.
230. Rinaldi, F. Cystic echinococcosis of the liver: A primer for hepatologists / F. Rinaldi [et al.] // *World J. Hepatol.* — 2014. — Vol. 6, №5. — P. 293 – 305.
231. Rinaldi, F. Medical treatment versus “Watch and Wait” in the clinical management of CE3b echinococcal cysts of the liver / F. Rinaldi [et al.] // *BMC Infect. Dis.* — 2014. — Vol. 14. — P. 492.
232. Robinson, T.N. Everson Laparoscopic palliation of polycystic liver disease / T.N. Robinson, G.V. Stiegmann // *Surg. Endosc.* — 2005. — № 19. — P. 130 – 132.
233. Roelfsema, J.H. Novel PCRs for differential diagnosis of cestodes / J.H. Roelfsema [et al.] // *Exp. Parasitol.* — 2016. — Vol. 161. — P. 20 – 26.
234. Rossi, P. The first meeting of the European Register of Cystic Echinococcosis (ERCE) / P. Rossi [et al.] // *Heracles Extended Network. Parasites & Vectors.* — 2016. — Vol. 9. — P. 243.
235. Sachse C. Polymorphisms in the cytochrome P450 CYP1A2 gene (CYP1A2) in colorectal cancer patients and controls: allele frequencies, linkage disequilibrium and influence on caffeine metabolism / C. Sachse, U. Bhambra, G. Smith [et al.] // *Br. J. Clin. Pharmacol.* — 2003. — Vol. 55, №1. — P. 68 – 76.
236. Sambrook, J. Commonly used techniques in molecular cloning. Extraction with phenol: chloroform / J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis. - Cold Spring Harbor Laboratory Press. — 1987. — P. E3 – E4.
237. Sharma, S. Molecular phylogeny of Cyclophyllidea (Cestoda: Eucestoda): an in-silico analysis based on mtCOI gene / S. Sharma [et al.] // *Parasitol. Res.* — 2016. — Vol. 115, №9. — P. 3329 – 3335.

238. Skuhala, T. Albendazole-sulphoxide concentrations in plasma and hydatid cyst and prediction of parasitological and clinical outcomes in patients with liver hydatidosis caused by *Echinococcus granulosus* / T. Skuhala [et al.] // *Croat. Med. J.* — 2014. — Vol. 55, № 2. — P. 146 – 155.
239. Sotelo, J. Pharmacokinetic optimisation of the treatment of neurocysticercosis / J. Sotelo, H. Jung // *Clin. Pharmacokinet.* — 1998. — Vol. 34, №6. — P. 503 – 15.
240. Sözen, S. The results of surgical treatment for hepatic hydatid disease / S. Sözen, S. Emir, M. Tükenmez, Ö. Topuz // *Hippokratia.* — 2011. — Vol. 15, № 4. — P. 327 – 329.
241. Sozuer, E. Open Surgery for Hepatic Hydatid Disease / E. Sozuer, M. Akyuz, S. Akbulut // *Int. Surg.* — 2014. — Vol. 99, №6. — P. 764 – 769.
242. Spotin, A. Genetic variability of *Echinococcus granulosus* complex in various geographical populations of Iran inferred by mitochondrial DNA sequences / A. Spotin [et al.] // *Acta Tropica.* — 2017. — Vol. 165, SI. — P. 10 – 16.
243. Stancu, B. Laparoscopic simultaneous partial pericystectomy and total cystectomy for hydatid liver cysts – case report / B. Stancu [et al.] // *Clujul Med.* — 2015. — Vol. 88, №3. — P. 415 – 419.
244. Tamarozzi, F. Non-surgical and non-chemical attempts to treat echinococcosis: do they work? / F. Tamarozzi [et al.] // *Parasite.* — 2014. — Vol. 21. — P. 75.
245. Tuxun, T. World review of laparoscopic treatment of liver cystic echinococcosis – 914 patients / T. Tuxun [et al.] // *Int. J. Infect. Dis.* — 2014. — Vol. 24. — P. 43 – 50.
246. Vieira, V. Peritoneal and hepatic hydatid disease causing major bile duct destruction / V. Vieira, H. Alexandrino, E. Furtado, F. Martinho // *J. Surg. Case Rep.* — 2012. — Vol. 4. — P. 6.
247. Vignati, L. An in vitro approach to detect metabolite toxicity due to CYP3A4-dependent bioactivation of xenobiotics / L. Vignati [et al.] // *Toxicology.* — 2005. — Vol. 216 (2-3). — P. 154 – 167.

248. Vuitton, D.A. Proceedings of the International Symposium. Innovation for the Management of Echinococcosis Besançon / D.A. Vuitton [et al.] // Parasite. — 2014. — Vol. 21. — P. 28.
249. Walker, J.M. The isolation of high molecular weight eucariotic DNA / J.M. Walker // Methods in Molecular Biology. — New York; London, 1984. — Vol. 2. — P. 31 – 34.
250. Wassermann, M. A novel zoonotic genotype related to *Echinococcus granulosus sensu stricto* from southern Ethiopia / M. Wassermann [et al.] // Int. J. Parasitol. — 2016. — Vol. 46, №10. — P. 663 – 668.
251. Xing, G. In vitro effect of sodium arsenite on *Echinococcus granulosus* protoscoleces / G. Xing [et al.] // Mol. Biochem. Parasitol. — 2016. — Vol. 207, № 2. — P. 49 – 55.
252. Yasuda, T. Surgical Resection of Hepatic Cystic Echinococcosis Impaired by Preoperative Diagnosis / T. Yasuda [et al.] // Case Rep. Med. — 2013. — P. 271256.
253. Yusuf, Y. Surgical treatment of hepatic hydatid cysts. A retrospective analysis of 425 patients / Y. Yusuf [et al.] // Ann. Ital. Chirug. — 2015. — Vol. 86, № 5. — P. 437 – 441.
254. Zaharie, F. Open or laparoscopic treatment for hydatid disease of the liver? A 10-year single-institution experience / F. Zaharie [et al.] // Surg. Endosc. — 2013. — Vol. 27, №6. — P. 2110 – 2116.
255. Zheng, X. Rare presentation of multi-organ abdominal echinococcosis: report of a case and review of literature / X. Zheng, Y. Zou, C. Yin. // Int. J. Clin. Exp. Pathol. — 2015. — Vol. 8, № 9. — P. 11814 – 11818.

Научное издание

Нартайлаков М.А. — д.м.н., профессор, зав. кафедрой общей хирургии с курсом лучевой диагностики ИДПО БГМУ Минздрава РФ.

Ибадильдин А.С. — д.м.н, зав. кафедрой «Хирургические болезни № 2» КазНМУ Минздравсоцразвития РК.

Лукманов М.И. — к.м.н., ассистент кафедры общей хирургии с курсом лучевой диагностики ИДПО БГМУ Минздрава РФ.

Кузьмин Д.Ю. — к.м.н., ассистент кафедры «Хирургические болезни № 2» КазНМУ Минздравсоцразвития.

**Некоторые аспекты иммунодиагностики
и профилактики рецидивов эхинококкоза**

Монография

Лицензия № 0177 от 10.06.96 г.

Подписано к печати 07.06.2019 г.

Отпечатано на цифровом оборудовании с готового
оригинал-макета, представленного авторами.

Формат 60x84 ¹/₁₆. Усл.-печ. л. 9,71.

Тираж 200 экз. Заказ № 34.

450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3,

Тел.: (347) 272-86-31

ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России