

Мукминов Малик Нилович

Шуралев Эдуард Аркадьевич

ИММУНОАНАЛИТИЧЕСКИЕ И БИОСЕНСОРНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ БИОБЕЗОПАСНОСТИ

Ключевые слова: биосенсоры, биочипы, мультиплекс, иммунологические методы исследования, ИФА, диагностика инфекционных заболеваний, реакции антиген-антитело, биобезопасность.

Данная монография даёт краткий обзор последних достижений в области биосенсорных и мультиплексных иммунологических методов исследования. Обсуждается роль иммунологических исследований в таких научных областях, как диагностика инфекционных заболеваний человека и животных, биологическая опасность и биобезопасность, продовольственная и экологическая безопасность. Кратко описаны различные типы дизайна иммунологических тестов; на рисунках показаны некоторые форматы тестов. Ссылки литературы являются достаточными, чтобы позволить читателю изучить глубже вопросы в интересующих его областях. Отобранные примеры биосенсорных и мультиплексных иммунологических методов классифицированы по формату исследования и стратегии детекции. В заключение даны перспективы использования тест-системы мультиплекс как иммунологического метода исследования для диагностики инфекционных заболеваний.

Keywords: biosensors, biochips, multiplex, immunological methods of research, ELISA, diagnostics of infectious diseases, antigen-antibody reactions, biosafety.

The present monograph gives a brief overview of the latest achievements in biosensor and multiplex immunological methods of research. The role of immunological researches in such scientific fields as human and animal infection disease detection, biosafety and biosecurity, food safety, environmental safety is discussed. The different types of immunological tests design have been described briefly; some formats of tests are shown in figures. The references are sufficient to allow the reader to examine

interesting areas more deeply. The selected examples of biosensor and multiplex immunological methods are classified through their research format and their detection strategy. In conclusion, prospects of multiplex test system use as an immunological method of research for infectious diseases diagnostics is given.

Биологическая опасность и биобезопасность

Вопросы биологической опасности/безопасности актуальны для многих областей народного хозяйства, одной из которых является экологическая безопасность (изменение биологического разнообразия, нарушение экологического равновесия, появление новых резервуаров инфекций). Среди факторов биологической опасности первое место, без сомнения, занимают инфекции [12].

В современном определении термина «биобезопасность» нашло отражение понимание того, что защищенность может только приближаться к абсолютной (100%-ной). Такой подход отличается от недавних официальных установок и стереотипов в сознании граждан нашей страны, воспринимавших безопасность (в том числе биобезопасность) как полное отсутствие каких-либо угроз. Задачами биобезопасности являются защита населения и окружающей среды; защита персонала; качество (защита) продукции.

На современном этапе развития общества к основным источникам биологической опасности для населения, животных и окружающей среды, чрезвычайных ситуаций биолого-социального характера отнесены:

– патогенные микроорганизмы, прионы, возбудители паразитарных заболеваний (опасные и особо опасные инфекции, в том числе природно-очаговые, спонтанные и «возвращающиеся»);

– «новые» патогены, возникающие из непатогенных и патогенных штаммов микроорганизмов в результате мутагенеза под влиянием природных и антропогенных факторов;

– поражающие факторы – продукты жизнедеятельности микроорганизмов (токсины, ферменты, биорегуляторы белковой природы, суперантигены, мини-антитела), технофильные микроорганизмы и др.;

– генетически измененные организмы и генетические конструкции (вирусные векторы, двуспиральные РНК, онкогены, гены, кодирующие белки-токсины);

– патогены, устойчивые к современным антимикробным препаратам;

– экопатогены, повреждающие физические объекты окружающей среды.

Инфекционные заболевания – одна из самых серьезных угроз современному обществу, несмотря на очевидные успехи человечества в борьбе с ними. Сегодня мир снова оказался в ситуации, когда эпидемии бесконтрольно распространяются по земному шару вследствие изменившихся условий жизни (урбанизация, ухудшение социально-экологических условий жизни, новые технологии в медицине и производстве продуктов питания, резко возросшие миграционные процессы, международный туризм и торговля, микробные адаптации и мутации, изменение экологии тела человека, разрушение природных экологических систем и др.). К инфекционным биологическим рискам относятся:

– массовые инфекционные заболевания – эпидемии, вспышки, пандемии, эпизоотии, эпифитотии;

– естественные резервуары патогенных микроорганизмов (грызуны, клещи, птицы);

– искусственные резервуары патогенных микроорганизмов (сибиреязвенные скотомогильники, биотермические ямы, коллекции штаммов музейных культур в НИИ, лабораториях, на биофабриках);

– генетически модифицированные возбудители инфекционных заболеваний.

ВОЗ признает инфекции второй ведущей причиной смертности и первой причиной преждевременной смертности в мире. По данным ВОЗ, в мире ежегодно 2 млрд людей болеет и свыше 17 млн. человек умирает от инфекционных болезней. Ежедневно от инфекций умирает 50 тыс. человек. Около 50% населения планеты проживает в условиях постоянной угрозы эндемических инфекций. В Российской Федерации ежегодно регистрируют около 35 миллионов случаев инфекционных болезней. При этом ежегодные прямые и косвенные

экономические потери от инфекционных болезней составляют примерно 15 миллиардов рублей [12].

Биологические агенты (биоагенты), опасные для здоровья и жизни человека, – это такие вредоносные и болезнетворные биологические агенты (объекты биосферы, патогены), как прионы, вирусы, бактерии, микроскопические грибы и водоросли, животные-паразиты, ядовитые растения и животные. К вредоносным могут быть отнесены живые организмы, полученные методами классической генетики, либо организмы, полученные методами генной инженерии и биотехнологии (т. н. генно-инженерно-модифицированные организмы, или ГМО), потенциальная опасность которых доказана. Используемая для питания биомасса ГМО-высших растений, тем более после её обработки при изготовлении пищевых продуктов, может характеризоваться только в отношении химической опасности, а биомасса живых микроорганизмов – в отношении как химической, так и биологической опасности [6].

В этом аспекте наибольшую биологическую угрозу представляют:

– преодоление микроорганизмами межвидовых барьеров (антропозоонозы, инфекции отдаленных биологических видов);

– «возвращающиеся» (re-emerging), управляемые с помощью вакцинации инфекции, активизировавшиеся после периода эпидемиологического благополучия вследствие свертывания программ иммунизации населения;

– инфекции, возникающие на новых территориях (завоз редких или ранее не встречавшихся инфекций); новые (emerging) инфекции, вызываемые ранее неизвестными патогенами (за последние 35 лет выделен и идентифицирован 41 новый патоген);

– возрастание эпидемиологического значения условно-патогенных микроорганизмов и увеличение частоты заболеваемости оппортунистическими инфекциями (инфекции, проявляющиеся у лиц с иммунодефицитными состояниями любой природы);

– распространение нозокомиальных (госпитальных) инфекций;

– аварии и диверсии на объектах, где проводятся работы с патогенными микроорганизмами;

– биологический терроризм во всех его проявлениях.

Инфекционные болезни отличаются от неинфекционных такими фундаментальными особенностями, как контагиозность (заразность), специфичность этиологического агента и формирование в процессе заболевания иммунитета. Закономерности иммуногенеза при инфекционных болезнях обуславливают еще одно кардинальное их отличие – цикличность течения, которая выражается в наличии последовательно сменяющихся периодов. Одним из факторов инфекционного процесса является условия внешней среды, которые оказывает влияние как на возбудителей инфекций, так и на реактивность макроорганизма. В человеческой популяции чрезвычайно важными являются социальные факторы среды. Следует иметь в виду и тот факт, что из года в год нарастает неблагоприятное воздействие повсеместно ухудшающейся экологической обстановки в стране, особенно вредных факторов промышленного и сельскохозяйственного производства и еще больше – факторов городской среды (урбанизация).

Широкий диапазон социальных, биологических и физико-химических факторов влияет на распространение и вспышки инфекционных заболеваний [8]. Происходят изменения особенностей течения многих болезней, вызванных патогенами, долгое время находящимися в окружающей среде, но ранее не идентифицированными, выявляются, по-видимому, и новые микроорганизмы, изменяются вирулентность, эпидемические характеристики и устойчивость к лекарственным препаратам давно изученных инфекционных агентов, люди заражаются микроорганизмами, которые ранее не были патогенными для человека. По данным ВОЗ больше чем 1,5 миллиона случаев раковых заболеваний в год, или приблизительно 15% общего количества, связаны с микроорганизмами.

К факторам, изменяющим характер инфекционных болезней, относятся изменчивость и адаптационная способность микроорганизмов, международная коммерция и туризм, климатические и погодные изменения экосистем, экономическое развитие в промышленности и землепользовании, бедность и социальное

неравенство, войны и голод, низкая политическая заинтересованность в проблеме. Всё это приводит к возникновению или возобновлению, распространению инфекций.

Нужно также отметить и о важности контроля экологически важных микроорганизмов – показателей чистоты окружающей среды, в особенности в учреждениях медицинского обслуживания [45]. Нередки случаи вспышек новых заболеваний, возбудителями которых являются микроорганизмы окружающей среды, ранее известных как непатогенные микробы, или усиления патогенности слабопатогенных бактерий и вирусов [47; 56; 87].

В последнее время становится всё более существенной эффективная взаимосвязь внутри и между организациями, вовлеченными в научно-исследовательскую и стандарты-разрабатываемую деятельность. Взаимообмен информацией через организационные и географические границы может также облегчить координацию и сотрудничество, продвинуть лучшее понимание технических и политических проблем, и избежать дублирования исследуемых направлений, как в науке, так и в разработке новых стандартов и требований. Чтобы усилить коммуникацию в пределах экологического микробиологического сообщества, Управление по охране окружающей среды США (EPA – U.S. Environmental Protection Agency) использует «Соединитель» Науки об окружающей среде управления (ESC – Environmental Science Connector) (<http://portal.epa.gov/ESC>), сетевой коммуникационный инструмент, который может соединить людей с разными интересами и экспертной направленности для обмена информацией по всем направлениям. Это также является удобным средством для ученых EPA в таких областях, как управление проектами, взаимодействие с сотрудниками проектов через объявления, и участие на виртуальных семинарах. ESC используется для соединения экологического микробиологического сообщества с целью обмена информацией по различным направлениям [68]. Экология микробиологического фокусирования, которая развилась через виртуальное сотрудничество, направила свои усилия на такие области, как обнаружение и идентификация микобактерий, обнаружение источников микроорганизмов, биомониторинг,

количественный ПЦР (qPCR) и другие молекулярные методы. В США идёт направленное финансирование таких проектов, с целью повышения эффективности современных методов биомониторинга как окружающей среды, так и организмов (людей и животных) [92].

Биосенсоры и биочипы

Проблема своевременного обнаружения инфекционного агента как в окружающей среде, так и в организме людей и животных остается открытой. Ведутся научные исследования в разработке новых методов ускоренного обнаружения микроорганизмов в объектах окружающей среды, а также специфических антител в организме животных и человека [33].

Особое место в этом направлении занимают исследования в области разработки новых методов диагностики с использованием биосенсоров [35; 48; 64]. Биодатчики с сенсорами в будущем должны стать легкодоступными и дешевыми для обнаружения многих патологических изменений в организме, как это сейчас возможно для определения уровня глюкозы в крови [58].

Так, сотрудники Cavendish Laboratory (Cambridge, Великобритания) описывают прогрессивные разработки в области применения магнитных биодатчиков и перспективы их использования в будущем [61]. Высокую коммерческую оценку использования ферментных биодатчиков дали в своей работе ученые Institute of BioScience and Technology (Cranfield University, Bedfordshire, Великобритания) [72]. Особенность использования биодатчиков в диагностических целях заключается в том, что полная аналитическая эффективность этих методов достигается при множественных анализах и использовании специального аналитического оборудования [76].

Электрохимические биодатчики комбинируют чувствительность электроаналитических методов с встроенным биоселективным биологическим компонентом. Биологический компонент в датчике признает свой аналит, в конечном счете, производящий электрический сигнал, улавливаемый датчиком, который пропорционален концентрации исследуемого аналита. Некоторые из этих

устройств достигли коммерческой стадии и используются в клинических, экологических, индустриальных и сельскохозяйственных исследованиях [79].

J. Wang [90] даёт сравнительный анализ современных электрохимических биодатчиков, таких как ДНК – или иммуносенсорных, которые обладают высокой чувствительностью, что важно для раннего распознавания раковых заболеваний. Этот метод обладает уникальной способностью мультиплексного анализа с одновременным измерением нескольких биомаркеров рака.

Методами генной инженерии ученые из Massachusetts Institute of Technology Lincoln Laboratory (Lexington, США) создали клеточные биосенсоры, которые могут быть использованы для идентификации патогенных организмов. Метод обладает коротким временем анализа, высокой чувствительностью и специфичностью, и в будущем такая технология обнаружения патогенов возможно будет применяться в медицинской диагностике, биозащите, мониторинге качества воды и продуктов питания, и других схожих областях [78].

Японские ученые The Institute of Scientific and Industrial Research (Osaka, Япония) изучали значение молекулярных колебаний для высокой пропускной способности биосенсоров при обнаружении специфической молекулы 1,6-hexanedithiol [86].

На рис. 1 показаны биосенсоры для электрохимического обнаружения анти-ДНК антител, разработанные итальянскими учеными из Университета Рима Tor Vergata [77]. Биосенсоры основаны на применении олигонуклеотидов, как распознающих зондов для улавливания анти-ДНК антител в сыворотке крови.

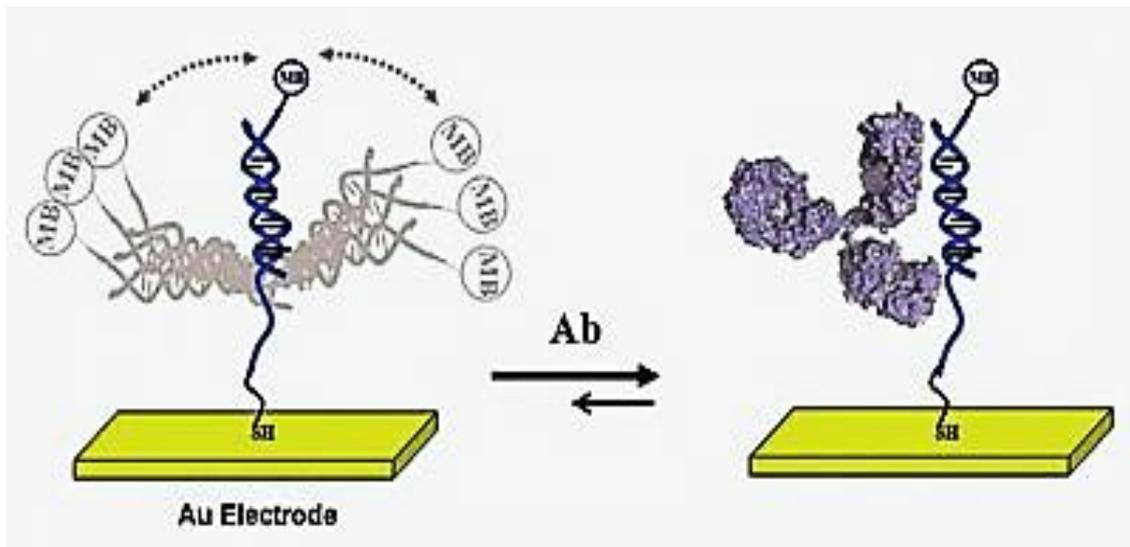


Рис. 1. Биосенсоры для обнаружения анти-ДНК антител [36]

Научные исследования в области биосенсоров продолжают уже более 40 лет, однако широкое практическое применение они получили только в методах учета уровня глюкозы в крови. Продолжаются исследования в возможностях применения этих методов в различных отраслях [54]. В литературе появляются данные о создании биочипов, способных распознавать множественные ДНК для выполнения анализа сложных проб биологических жидкостей [59].

К.Е. Mach с соавт [63] (Stanford University School of Medicine, США) изучали чувствительность и специфичность ДНК биосенсора для быстрого молекулярного диагноза инфекций мочевыводящих путей. Было идентифицировано 20 организмов, из которых чаще всего выявлялись *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterococcus spp*. Специфичность биодатчика и положительная прогнозирующая ценность составляли 100%. Чувствительность обнаружения патогенов составляла 89%. Аналогичные результаты были получены немецкими учеными (Institute of Medical Microbiology, Justus Liebig University, Giessen, Германия) [49]. Указывается также тот факт, что были обнаружены и «скрытые» инфекции, которые не выявлялись обычными микробиологическими методами.

Использование биосенсоров также возможно и в продовольствии. Американские ученые (Auburn University, США) показали высокую эффективность биосенсорного датчика в определении патогенных штаммов *Campylobacter* в мясе бройлерных цыплят [94].

Balasubramanian S. с соавт [31] предлагают в качестве биосенсора использовать литический бактериофаг для обнаружения бактериальных инфекционных агентов.

Velasco-García M.N. с соавт [89] обсуждают вопросы применения биосенсорных технологий не только в здравоохранении и исследовании окружающей среды, но и в сельском хозяйстве, пищевой промышленности и ветеринарии. В частности приводятся примеры использования биосенсоров для обнаружения и идентификации инфекционных патогенов в зерновых культурах, домашних животных, а также измерениях важных параметров в пищевой промышленности, контроля плодовитости животных, скрининга терапевтических препаратов в ветеринарном тестировании.

Иммунологические тесты

Несмотря на то, что биосенсоры широкомасштабно вошли в современную науку, для углубленного изучения многих биологических, патологических и, в особенности, инфекционных процессов продолжают использоваться классические методы, основанные на принципах иммунологического взаимодействия «антиген-антитело». Данные методы используются в различных вариантах и научные исследования по их совершенствованию продолжаются.

Одним из самых популярных методов является иммуноферментный анализ (ИФА, англ. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) – лабораторный иммунологический метод качественного или количественного определения различных соединений, макромолекул, вирусов и т. п., в основе которого лежит специфическая реакция «антиген-антитело». Выявление образовавшегося комплекса проводят с использованием фермента в качестве метки для регистрации сигнала. ИФА применяют для двух целей – для определения наличия антигенов возбудителей различных инфекций, но значительно чаще метод ИФА применяется для определения наличия антител классов IgA, IgM, IgG к антигенам различных возбудителей болезней.

Существуют типы иммуноферментного анализа в зависимости от иммунохимического взаимодействия на первой стадии анализа (в которой происходит

связывание определяемого вещества). Если в системе присутствуют только анализируемое соединение и соответствующие ему центры связывания (антиген и специфические антитела), то метод является неконкурентным. Если же на первой стадии в системе одновременно присутствует анализируемое соединение и его аналог (меченное ферментом анализируемое соединение или анализируемое соединение, иммобилизованное на твердой фазе), конкурирующие за ограниченное количество центров специфического связывания, то метод является конкурентным. Было также установлена зависимость некоторых серологических реакций от типов пробирок, используемых для взятия крови [13].

Среди конкурентных схем твердофазного ИФА существует два основных формата:

1. Прямой конкурентный формат ИФА использует иммобилизованные на твердой фазе специфические антитела, а меченый ферментом и немеченый антиген конкурируют за связь с иммобилизованным антителом.

2. В непрямом конкурентном формате ИФА используются меченные ферментом антитела (специфические или вторичные) и иммобилизованный на твердой фазе конъюгат антиген-белок-носитель.

Иммуноферментный анализ за счёт несомненных преимуществ (удобства в работе, быстроты, объективности за счёт автоматизации учёта результатов, возможности исследования иммуноглобулинов различных классов (что важно для ранней диагностики заболеваний и их прогноза)) в настоящее время является одним из основных методов лабораторной диагностики.

В зависимости от того, какие антигены используются, иммуноферментные тест-системы подразделяются на:

- лизатные – в которых используется смесь нативных антигенов (лизированный или обработанный ультразвуком возбудитель инфекции, полученный в культуре);

- рекомбинантные – в которых используются полученные генно-инженерным способом белки-аналоги определённых белковых антигенов возбудителя;

– пептидные – использующие химически синтезированные фрагменты белков.

Общее направление развития ИФА-диагностикумов – это направление от лизатных тест-систем, которые принято называть тест-системами первого поколения, к рекомбинантным и пептидным. Технология получения рекомбинантных белков позволяет получить в достаточно чистом виде аналог практически любого отдельного антигена. Для создания высококачественной рекомбинантной тест-системы необходимо из всего антигенного многообразия возбудителя выбрать антигены, которые были бы иммуногенными (то есть, в организме инфицированного человека должны вырабатываться антитела к этим антигенам) и высоко специфичными (то есть, характерными лишь для данного возбудителя и, по возможности, не дающими перекрёстных реакций с антителами к другим антигенам). Кроме того, большое значение имеет качество очистки рекомбинантных белков. В идеальном случае возможно получение рекомбинантной тест-системы практически со 100%-ной специфичностью при высокой чувствительности. На практике этого не всегда удаётся достичь, однако специфичность лучших рекомбинантных тест-систем приближается к 100%.

Особо широкое распространение иммуноферментный анализ получил в медицине, для диагностики инфекционных заболеваний и других патологических состояний человека. Работы в этом направлении продолжаются по сегодняшний день, ученые многих стран продолжают совершенствование метода для получения высокоэффективных тест-систем (с достаточной специфичностью и чувствительностью) [5; 10; 43; 80; 102].

В ветеринарии метод ИФА широко применяется в развитых странах, в России практически мало используется, но научные исследования в этом направлении ведутся учеными всего мира [2; 52; 62; 69; 93]. Тест-системы на основе ИФА позволяют проводить иммуномониторинг животных к инфекционным заболеваниям различной этиологии, а также оценивать эффективность вакцинопрофилактики [2].

Биотесты, биочипы, молекулярно-биологические, иммунологические и иммунобиологические, другие традиционно биологические методы исследования, в том числе и ИФА-тесты стали внедряться в экологические исследования, причем при исследовании как биологических жидкостей, так и природных объектов окружающей среды [7; 9]. Терехов И.В. с соавт [11] изучали биологические эффекты СВЧ-излучения, при этом методом ИФА определяли цитокиновый статус и внутриклеточное содержание ряда молекул, обеспечивающих внутриклеточную трансдукцию. Показано, что облучение сопровождается иммунологической перестройкой организма, повышением продукции определенных интерлейкинов. В работе Калиниченко А.А. с соавт [3] представлены и систематизированы данные, открывающие возможности для создания систем детекции методом ИФА афлатоксинов с помощью моноклональных антител, получения рекомбинантных антител с измененными параметрами специфичности, с использованием методов белковой инженерии. Šernoch I. с соавт [36] разработали ИФА для обнаружения сульфонамидов (действующее веществом антибиотиков нового поколения), являющихся одними из наиболее распространенных новых загрязняющих веществ в пресной воде.

Актуальной стала и проблема обнаружения цианобактерий и их токсинов в объектах водной среды. Работа в этом направлении ведется как отечественными, так и зарубежными научными группами [4; 25; 41]. Цианотоксины диагностируют не только в водных объектах, но и в живых организмах, обитающих в водоемах, например, в рыбе [70]. В настоящее время ведутся исследования в области разработки диагностических тестов обнаружения цианобактерий и их токсинов методами полимеразно-цепной реакции [25; 41; 88].

ИФА зарекомендовал себя как один из высокочувствительных и эффективных методов обнаружения и количественного анализа содержания цианотоксинов в пробах воды и в биологических жидкостях, и по сей день является «золотым» стандартом [70; 74]. Однако все эти тесты доступны только в виде импортных тест-систем, в нашей же стране наборы диагностикумов для проведения ИФА на обнаружение цианотоксинов не производятся.

Мультиплексные тест-системы

Особое место занимают так называемые мультиплексные тест-системы, позволяющие проводить скрининг проб к различным анализам одновременно. Ediage E.N. с соавт [39] даёт высокую оценку мульти-аналитному проточному иммуноанализу, разработанному для быстрого обнаружения микотоксинов в пищевых продуктах. Tian J. с соавт [84] предлагают наносенсоры, основанные на многоцветных квантовых точках, для мультиплексного обнаружения маркеров опухолей в формате, основанном на иммуноанализе флуоресцентной поляризации. Метод обладает высокой чувствительностью, специфичностью, простотой процедуры и коротким временем постановки. Smits G.P. с соавт [82] разработали мультиплексный иммуноанализ для одновременного количественного определения антител против кори, паротита, краснухи и ветряной оспы, который более чувствителен, чем индивидуальные ИФА к каждому заболеванию и имеет высокую специфичность. Показана эффективность использования мультиплексного подхода и в ПЦР индикации биопатогенов [1], в иммунохроматографическом анализе профилирования антител [20]. Высокая чувствительность и специфичность мультиплексного иммуноанализа достигалась путем использования различных комбинаций микобактериальных антигенов при исследовании на туберкулез таких видов животных, как крупный рогатый скот [14; 18], коза [22], северный олень [19], вапити [16], кабан [15], альпака [23], барсук [21] и других.

Мультиплексный анализ является одним из видов анализа, который одновременно измеряет несколько аналитов (десятки или больше) за один прогон / цикл анализа. Одно-аналитные анализы обычно предшествуют росту их мультиплексных версий, которые часто требуют специальных технологий или миниатюризации для достижения более высокой степени параллелизма. Мультиплекс-тесты широко используются в экспериментах в области функциональной геномики, которые стремятся обнаружить или анализировать состояния всех биомолекул определенного класса (например, РНК, белки) в биологической пробе, чтобы определить влияние экспериментального лечения или эффект мутации ДНК по всем биомолекулам. Возможность выполнять такие мультиплексные

аналитические измерения большого числа анализируемых биомолекулярных аналитов была облегчена завершением расшифровки генома человека и многих других модельных организмов, что было сложной задачей до расшифровки генома.

Наиболее широко распространены такие форматы мультиплексного анализа, как микросферный (рис. 2), микропланшетный (рис. 3), мембранный (рис. 4).

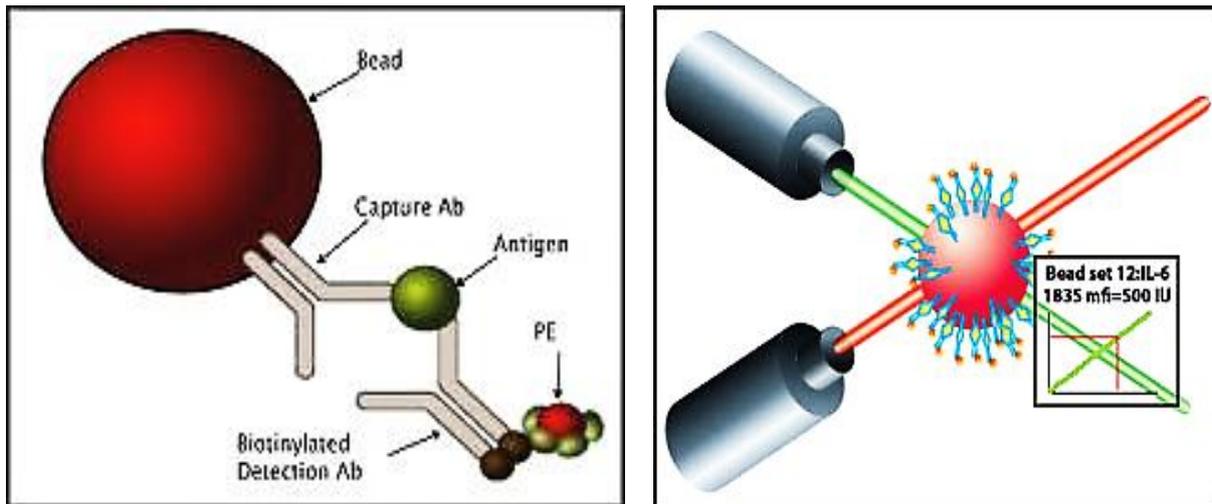


Рис. 2. Мультиплексный иммуноанализ, основанный на микросферах [71]

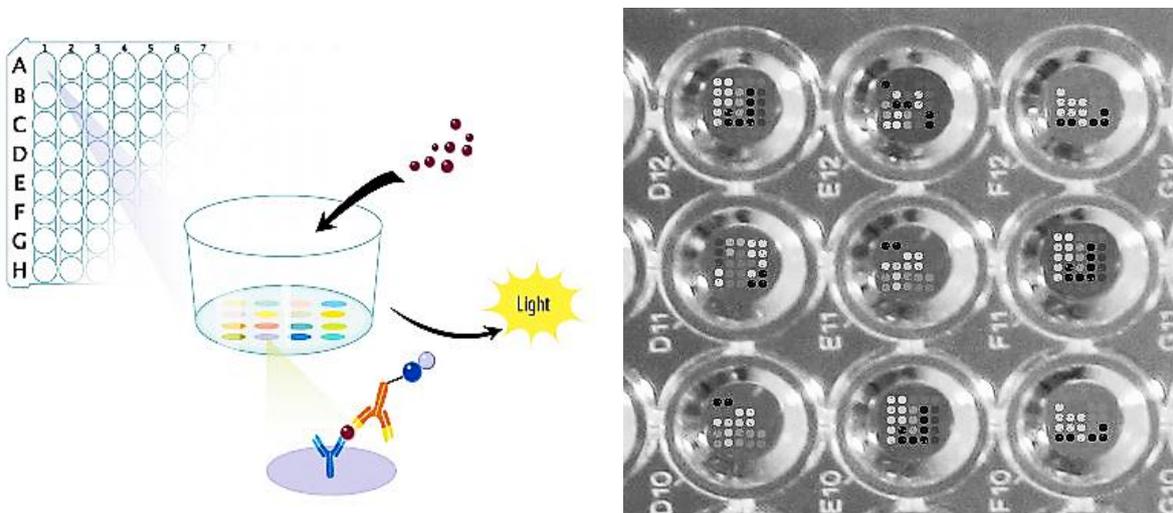


Рис. 3. Мультиплексный иммуноанализ, основанный на микропланшетах [28; 67]

Мультиплекс-анализ тесты часто используются при скрининге серий проб с высокой пропускной способностью, где многие образцы могут быть

проанализированы с использованием мультиплексного (или другого) анализа. Строго говоря, мультиплекс-анализ не обязательно должен обладать высокой пропускной способностью.

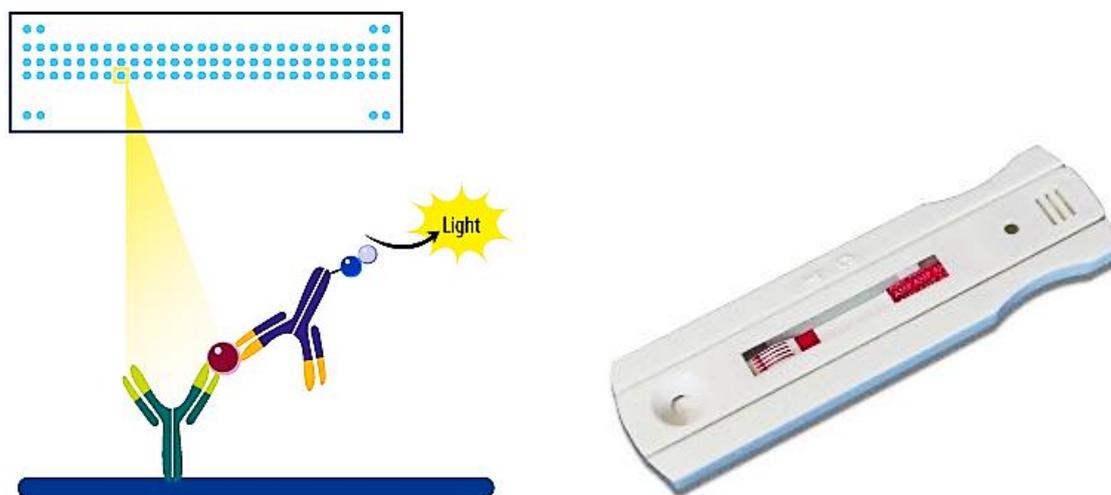


Рис. 4. Мультиплексный иммуноанализ, основанный на мембранах [50; 66]

При выполнении одного теста мультиплексный вариант генерирует данные для большого числа аналитов (например, уровни экспрессии генов для всех генов в геноме человека), что считается высокой пропускной способностью. Однако этот метод также обладает еще и возможностью быстро обрабатывать несколько образцов в автоматическом режиме, что характеризует его высокую пропускную способность. Массивный параллельный анализ является одним из способов достижения статуса «высокой пропускной способности». Другой способ – это автоматизация обычных лабораторных методов.

Примеры методов мультиплексного анализа

Мультиплексные методы на основе нуклеиновых кислот:

- ДНК-микрoанализ методы, используемые для анализа изменения экспрессии генов, выявления однонуклеотидных полиморфизмов, генотипирования или повторного секвенирования мутантных геномов [24; 42; 75];
- последовательный анализ экспрессии генов (SAGE) [60; 65];
- секвенирование с высокой пропускной способностью, которое может производить миллионы коротких последовательностей ДНК в параллелях [26; 38];

- мультиплекс-ПЦР для методик, требующих амплификации или секвенирования ДНК или РНК [55; 83];
- мультиплекс-амплификация лигирование-зависящего зонда [37];
- секвенирование ДНК путем лигирования [46];
- мультиплекс-анализ, на основе принципов Luminex/ХМАР, при котором методом ХМАР короткие последовательности олигонуклеотидов прикреплены к Luminex микросферам с кодированным цветом, распознаваемые поточной цитометрией [30; 73].

Мультиплексные методы на основе белков:

- белок-микроанализ для измерения белок-белок взаимодействий или небольших молекулярных связей [44; 99];
- антитела-микроанализ – тип белок-микроанализа, при котором обнаруживают антитела [29; 85];
- фаговый дисплей для скрининга белков и генетической информации, кодирующей их, взаимодействующих белков или других биомолекул [51; 101];
- антитело-профилирование (например, обнаружение нескольких специфических антител или определение их реактивности к определенным антигенам) [32; 85];
- мультианалитная детекция – MAGPIX технология позволяет обнаружить около 50 аналитов в одной пробе, при этом используются микросферы, с прикрепленными к ним антителами против этих аналитов, а измерение проводится методом флуоресценции [34; 100].

Другие мультиплексные методы:

- микрогистоанализ – для мультианализа проб тканей [53];
- клеточный микроанализ – для наблюдения клеточных реакций к серии исследуемых аналитов [91];
- микроанализ химических соединений – для исследования мульти химических соединений на специфичную активность [97];

- мультиплекс-детекция, позволяющая одновременно обнаруживать две или более мишеней при вестерн блоттинге [27];
- мультиплексный биомаркерный анализ мочи [57];
- мультиплекс-ИФА, который позволяет обнаруживать отдельные аналиты одновременно в параллелях с использованием микротитровальных планшетов для достижения высокой пропускной способности обработки проб [40; 96; 98].

В компании Enfer Scientific, Ирландия была разработана мультиплексная хемилюминесцентная тест-система для диагностики туберкулеза крупного рогатого скота, вызываемого *Mycobacterium bovis*. Этот метод показал высокую чувствительность и специфичность и зарекомендовал себя как альтернативный алергическому методу серологический тест, позволяющий проводить исследования проб сывороток крови к серии туберкулезных антигенов в одной лунке, что ранее не было достигнуто [95; 96]. Этот тест проходит полевые испытания по адаптации тест-платформы к другим видам животных, таким как барсук, кабан, коза, олень, лама и другие [17; 81]. Особенностью метода является то, что такая тест-платформа может быть адаптирована к любым заболеваниям, для диагностики которых используются реакции по принципу «антиген-антитело». При этом можно проводить скрининг к нескольким антигенам одновременно, а следовательно и к нескольким заболеваниям.

Заключение

На современном уровне противоэпидемических и противоэпизоотических мероприятий большое внимание уделяется проведению иммунологического мониторинга инфекционных заболеваний. В связи с этим разработка высокоспецифичных и чувствительных диагностических тест-систем является приоритетной задачей. К основным требованиям, которые должны выдвигаться при разработке таких тест-систем, нужно также отнести дешевизну и простоту постановки, с целью дальнейшего их широкомасштабного применения в практике. В настоящее время наблюдается рост исследований по такому направлению как разработка диагностических тест-систем основанных на мультиплексных подходах, которые будут применимы для мониторинга инфекций в урбанизированных и

сельскохозяйственных территориях (исследования людей, синантропных и сельхоз животных), а также в дикой природе (тесты для исследования диких животных).

Список литературы

1. Александрова Н.М. Дифференциальная диагностика туберкулеза у человека и животных с применением мультиплексной тест-системы / Н.М. Александрова, Н.И. Хаммадов, Э.А. Шуралев, И.А. Елизарова // Молекулярная диагностика 2017: Сборник трудов IX Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием. – М., 2017. – С. 493.

2. Иванов А.В. Разработка и испытание тест-системы для диагностики хламидиоза крупного рогатого скота методом ИФА / А.В. Иванов, В.В. Евстифеев, Ф.М. Хусаинов [и др.] // Ветеринарный врач. – 2011. – №2. – С. 10–13.

3. Калиниченко А.А. Получение антител против афлатоксинов различных типов и их свойства / А.А. Калиниченко, В.А. Топорова, А.А. Панина [и др.] // Биоорган. хим. – 2010. – Т. 36. – №1. – С. 122–132.

4. Кокшарова О.А. Применение методов молекулярной генетики и микробиологии в экологии и биотехнологии цианобактерий // Микробиология. – 2010. – Т. 79. – №6. – С. 734–747.

5. Нестерова И.Г. Внутрिलाбораторный контроль качества неколичественных методов ИФА-определения серологических маркеров различных инфекций / И.Г. Нестерова, М.Р. Бобкова // Клин. лаб. диагн. – 2011. – №2. – С. 35–37.

6. Панин А.Н. Об актуальности использования универсальных понятий и терминов в нормативной базе безопасности пищевых продуктов / А.Н. Панин, В.А. Мельников // Жизнь без опасностей. Здоровье. Профилактика. Долголетие. – 2009. – №3. – С. 20–25.

7. Порфирьева А.В. Биосенсоры на основе полиэлектролитных комплексов ДНК и электрополимеризованных материалов / А.В. Порфирьева, В.Б. Костылева, А.И. Замалиева [и др.] // Уч. записки Казанского ун-та. Серия: Естественные науки. – 2010. – Т. 152. – №3. – С. 123–133.

8. Рак. Информационный бюллетень №297 // Центр СМИ ВОЗ. – 2012 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/ru/index.html>, свободный (дата обращения: 11.03.2018).

9. Сахабиев И.А. Мониторинг микромицетов выщелоченного чернозема агроценозов Черемшанского района Республики Татарстан / И.А. Сахабиев, С.С. Рябичко, В.В. Иванова [и др.] // Уч. записки Казанского ун-та. Серия: Естественные науки. – 2011. – Т. 153. – №2. – С. 250–261.

10. Сеидбеков О.С. Разрешающая способность определения ИФА методом IgE-антител в слюне у больных пародонтитом / О.С. Сеидбеков, А.Ш. Фатуллаев, Л.М. Ахмедова, Р.В. Садыгов // Клин. лаб. диагн. – 2010. – №10. – С. 3–3а.

11. Терехов И.В. Молекулярные механизмы иммунореабилитации при использовании низкоинтенсивного СВЧ-излучения / И.В. Терехов, В.И. Петросян, Б.Л. Дягилев [и др.] // Бюлл. мед. интернет-конф. – 2011. – Т. 1. – №5. – С. 34–37.

12. Шаланда А.В. Биологические угрозы антропогенного происхождения // Коммерческая биотехнология. – 2009 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.cbio.ru/modules/news/article.php?storyid=3404> (дата обращения: 11.03.2018).

13. Шуралев Э.А. Влияние антикоагулянтов и активаторов свертывания крови на результаты серологических реакций / Э.А. Шуралев, Н.М. Александрова, М.Н. Мукминов [и др.] // Ветеринария. – 2018. – №2. – С. 54–57.

14. Шуралев Э.А. Микобактериальные антигены: синтетические пептиды и рекомбинантные белки // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2013. – Т. 216. – С. 403–407.

15. Шуралев Э.А. Мультиплексный ИФА с хемилюминесцентной меткой для диагностики туберкулеза у кабанов / Э.А. Шуралев, М.Н. Мукминов, А.Р. Валеева [и др.] // Ветеринария. – 2013. – №2. – С. 25–28.

16. Шуралев Э.А. Выявление специфических антител у вапители при туберкулезе / Э.А. Шуралев, М.Н. Мукминов, К. Велан, Д. Кларк // Ветеринария. – 2013. – №8. – С. 54–57.

17. Шуралев Э.А. Мультиплексная иммуноферментная хемилюминесцентная тест-платформа для индикации биопатогенов в организмах // Народное хозяйство. Вопросы инновационного развития. – 2012. – №1. – С. 258–261.
18. Шуралев Э.А. К вопросу серологической диагностики туберкулеза крупного рогатого скота / Э.А. Шуралев, Э.В. Ндайишимийе, М.Н. Мукминов // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2012. – Т. 211. – С. 202–206.
19. Шуралев Э.А. Образование антител у северного оленя, инфицированного *Mycobacterium bovis* // Ветеринария. – 2016. – №9. – С. 18–20.
20. Шуралев Э.А. Оценка иммунохроматографического теста на основе мультиантигенов *Mycobacterium bovis* // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2017. – Т. 230. – №2. – С. 190–193.
21. Шуралев Э.А. Предварительные результаты изучения антителогенеза у барсуков при экспериментальном туберкулезе // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2015. – Т. 221. – №1. – С. 261–266.
22. Шуралев Э.А. Серологическая диагностика туберкулеза коз и ее преимущества // Современные тенденции научного обеспечения в развитии АПК: фундаментальные и прикладные исследования: Мат. науч.-практ. (очно-заочной) конф. с междунар. участием. – Омск, 2016. – С. 311–316.
23. Шуралев Э.А. Сравнительный анализ тест-систем для диагностики туберкулеза у альпак // Ветеринарный врач. – 2012. – №5. – С. 30–33.
24. Al-Khaldi S.F., Mossoba M.M., Allard M.M. et al. Bacterial identification and subtyping using DNA microarray and DNA sequencing // *Methods Mol Biol.* – 2012. – V. 881. – P. 73–95.
25. Al-Tebrineh J., Mihali T.K., Pomati F., Neilan B.A. Detection of saxitoxin-producing cyanobacteria and *Anabaena circinalis* in environmental water blooms by quantitative PCR // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2010. – V. 76. – №23. – P. 7836–7842.

26. Alamyar E., Giudicelli V., Li S. et al. IMGT/HighV-QUEST: the IMGT® web portal for immunoglobulin (IG) or antibody and T cell receptor (TR) analysis from NGS high throughput and deep sequencing // *Immunome Res.* – 2012. – V. 8. – №1. – P 26.

27. Alegria-Schaffer A., Lodge A., Vattem K. Performing and optimizing Western blots with an emphasis on chemiluminescent detection // *Methods Enzymol.* – 2009. – №463. – P. 573–599.

28. Antigen Microarrays INTO Microwell Plates / European Biotech Network. – 2018 [Electronic resource]. – Access mode: www.euro-bio-net.net (retrieved: 11.03.2018).

29. Ardizzoni A., Manca L., Capodanno F. et al. Detection of follicular fluid and serum antibodies by protein microarrays in women undergoing in vitro fertilization treatment // *Reprod Immunol.* – 2011. – V. 89. – №1. – P. 62–69.

30. Balada-Llasat J.M., LaRue H., Kamboj K. et al. Detection of yeasts in blood cultures by the Luminex xTAG fungal assay // *Clin Microbiol.* – 2012. – V. 50. – №2. – P. 492–494.

31. Balasubramanian S., Sorokulova I.B., Vodyanoy V.J., Simonian A.L. Lytic phage as a specific and selective probe for detection of *Staphylococcus aureus*--A surface plasmon resonance spectroscopic study // *Biosens Bioelectron.* – 2007. – V. 22. – №6. – P. 948–955.

32. Barber N., Gez S., Belov L. et al. Profiling CD antigens on leukaemias with an antibody microarray // *FEBS Lett.* – 2009. – V. 583. – №11. – P. 1785–1791.

33. Baserisalehi M., Bahador N., Kapadnis B.P. A novel method for isolation of *Campylobacter* spp. from environmental samples, involving sample processing, and blood- and antibiotic-free medium // *Appl. Microbiol* – 2004. – V. 97. – №4. – P. 853–860.

34. Bernhard O.K., Mathias R.A., Barnes T.W., Simpson R.J. A fluorescent microsphere-based method for assay of multiple analytes in plasma // *Methods Mol Biol.* – 2011. – №728. – P. 195–206.

35. Boucher H.W. Challenges in anti-infective development in the Era of bad bugs, no drugs: a regulatory perspective using the example of bloodstream infection as an indication // *Clin Infect Dis.* – 2010. – V. 50. – Suppl. 1. – P. 4–9.
36. Černoš I., Fránek M., Diblíková I. et al. POCIS sampling in combination with ELISA: screening of sulfonamide residues in surface and waste waters // *Environ Monit.* – 2012. – V. 14. – №1. – P. 250–257.
37. Chung B., Shin G.W., Hwang H.S. et al. Precise H1N1 swine influenza detection using stuffer-free multiplex ligation-dependent probe amplification in conformation-sensitive capillary electrophoresis // *Anal Biochem.* – 2012. – V. 424. – №1. – P. 54–56.
38. Dehara Y., Hashiguchi Y., Matsubara K. et al. Characterization of squamate olfactory receptor genes and their transcripts by the high-throughput sequencing approach // *Genome Biol Evol.* – 2012 – V. 4. – №4. – P. 602–616.
39. Ediage E.N., Di Mavungu J.D., Goryacheva I.Y. et al. Multiplex flow-through immunoassay formats for screening of mycotoxins in a variety of food matrices // *Anal Bioanal Chem.* – 2012. – V. 403. – №1. – P. 265–278.
40. Edwards A.D., Reis N.M., Slater N.K., Mackley M.R. A simple device for multiplex ELISA made from melt-extruded plastic microcapillary film // *Lab Chip.* – 2011. – V. 11. – №24. – P. 4267–4273.
41. Fortin N., Aranda-Rodriguez R., Jing H. et al. Detection of microcystin-producing cyanobacteria in Missisquoi Bay, Quebec, Canada, using quantitative PCR // *Appl Environ Microbiol.* – 2010. – V. 76. – №15. – P. 5105–5112.
42. Fu Y., Pan Y., Pan M. et al. Development of a high-throughput DNA microarray for drug-resistant gene detection and its preliminary application // *Microbiol Methods.* – 2012. – V. 89. – №2. – P. 110–118.
43. Gong H., Craddock M., Cheung L., Michael Olive D. Development of a near-infrared fluorescence ELISA method using tyramide signal amplification // *Anal Biochem.* – 2012. – V. 426. – №1. – P. 27–29.

44. Gruber K., Horlacher T., Castelli R. et al. Cantilever array sensors detect specific carbohydrate-protein interactions with picomolar sensitivity // *ACS Nano*. – 2011. – V. 5. – №5. – P. 3670–3678.

45. Hadley W., Hunter H.L., Tolou-Shams M. et al. Monitoring challenges: a closer look at parental monitoring, maternal psychopathology, and adolescent sexual risk // *Fam Psychol*. – 2011. – V. 25. – №2. – P. 319–323.

46. Ho A., Murphy M., Wilson S. et al. Sequencing by ligation variation with endonuclease V digestion and deoxyinosine-containing query oligonucleotides // *BMC Genomics*. – 2011. – №12. – P. 598.

47. Hoffman L.R., Kulasekara H.D., Emerson J. et al. *Pseudomonas aeruginosa* lasR mutants are associated with cystic fibrosis lung disease progression // *Cyst Fibros*. – 2009. – V. 8. – №1. – P. 66–70.

48. Hunt H.K., Armani A.M. Label-free biological and chemical sensors // *Nanoscale*. – 2010. – V. 2. – №9. – P. 1544–1559.

49. Imirzalioglu C., Hain T., Chakraborty T., Domann E. Hidden pathogens uncovered: metagenomic analysis of urinary tract infections // *Andrologia*. – 2008. – V. 40. – №2. – P. 66–71.

50. Instant-View Methadone Urine Drug Test / Alfa Scientific Designs. – 2018. – [Electronic resource]. – Access mode: www.alfascientific.com (retrieved: 11.03.2018).

51. Islam M.O., Lim Y.T., Chan C.E. et al. Generation and characterization of a novel recombinant antibody against 15-ketocholestane isolated by phage-display // *Int J Mol Sci*. – 2012. – V. 13. – №4. – P. 4937–4948.

52. Jiao Y., Zeng X., Guo X. et al. Preparation and evaluation of recombinant severe fever with thrombocytopenia syndrome virus nucleocapsid protein for detection of total antibodies in human and animal sera by double-antigen sandwich enzyme-linked immunosorbent assay // *Clin Microbiol*. – 2012. – V. 50. – №2. – P. 372–377.

53. Karlsson C., Karlsson M.G. Effects of long-term storage on the detection of proteins, DNA, and mRNA in tissue microarray slides // *Histochem Cytochem*. – 2011. – V. 59. – №12. – P. 1113–1121.

54. Kissinger P.T. Biosensors – a perspective // *Biosens Bioelectron.* – 2005. – V. 20. – №12. – P. 2512–2516.
55. Köppel R., Eugster A., Ruf J., Rentsch J. Quantification of meat proportions by measuring DNA contents in raw and boiled sausages using matrix-adapted calibrators and multiplex real-time PCR // *AOAC Int.* – 2012. – V. 95. – №2. – P. 494–499.
56. Kulasekara B.R., Jacobs M., Zhou Y. et al. Analysis of the genome of the *Escherichia coli* O157:H7 2006 spinach-associated outbreak isolate indicates candidate genes that may enhance virulence // *Infect Immun.* – 2009. – V. 77. – №9. – P. 3713–3721.
57. Laxman B., Morris D.S., Yu J. et al. A first-generation multiplex biomarker analysis of urine for the early detection of prostate cancer // *Cancer Res.* – 2008. – V. 68. – №3. – P. 645–649.
58. Lee T.M.-H. Over-the-counter biosensors: past, present, and future // *Sensors.* – 2008. – V. 8. – №9. – P. 5535–5559.
59. Liao J.C., Mastali M., Li Y. et al. Development of an advanced electrochemical DNA biosensor for bacterial pathogen detection // *Mol Diagn.* – 2007. – V. 9. – №2. – P. 158–168.
60. Liu H., Yi Q., Liao Y. et al. Characterizing the role of mechanical signals in gene regulatory networks using Long SAGE // *Gene.* – 2012. – V. 501. – №2. – P. 153–163.
61. Llando J., Palfreyman J.J., Ionescu A., Barnes C.H. Magnetic biosensor technologies for medical applications: a review // *Med Biol Eng Comput.* – 2010. – V. 48. – №10. – P. 977–998.
62. Luo Y., Terkawi M.A., Jia H. et al. A double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of secreted antigen 1 of *Babesia microti* using hamster model // *Exp Parasitol.* – 2012. – V. 130. – №2. – P. 178–182.
63. Mach K.E., Du C.B., Phull H. et al. Multiplex pathogen identification for polymicrobial urinary tract infections using biosensor technology: a prospective clinical study // *J Urol.* – 2009. – V. 182. – №6. – P. 2735–2741.

64. Mach K.E., Wong P.K., Liao J.C. Biosensor diagnosis of urinary tract infections: a path to better treatment? // *Trends in Pharmacological Sciences*. – 2011. – V. 32. – №6. – P. 330–336.

65. Matsumura H., Urasaki N., Yoshida K. et al. SuperSAGE: powerful serial analysis of gene expression // *Methods Mol Biol*. – 2012. – V. 883. – P. 1–17.

66. Membrane-based Multiplex Kits / R&D Systems. – 2018 [Electronic resource]. – Access mode: www.rndsystems.com (retrieved: 11.03.2018).

67. Microplate-based Multiplex Kits / R&D Systems [Электронный ресурс]. – 2018. – URL: www.rndsystems.com (дата обращения: 11.03.2018).

68. Mistry J.H., Hauchman F.S., Rodgers M.R., Ashbolt N. The Virtual Environmental Microbiology Center – a social network for enhanced communication between water researchers and policy makers – 2009 [Electronic resource]. – Access mode: <http://www.epa.gov> (retrieved: 11.03.2018).

69. Mohamed A.M., Abdel-Rady A., Ahmed L.S., El-Hosary A. Evaluation of indirect TaSP enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of tropical theileriosis in cattle (*Bos indicus*) and water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Egypt // *Vet Parasitol*. – 2012. – V. 186. – №3–4. – P. 486–489.

70. Moreno I.M., Herrador M.Á., Atencio L. et al. Differentiation between microcystin contaminated and uncontaminated fish by determination of unconjugated MCs using an ELISA anti-Adda test based on receiver-operating characteristic curves threshold values: application to *Tinca tinca* from natural ponds // *Environ Toxicol*. – 2011. – V. 26. – №1. – P. 45–56.

71. Multiplex bead array / Dept. of flow and image cytometry. – 2018 [Electronic resource]. – Access mode: www.rpciflow.org (retrieved: 11.03.2018).

72. Newman J.D., Setford S.J. Enzymatic biosensors // *Mol Biotechnol*. – 2006. – V. 32. – №3. – P. 249–268.

73. Pickering J.W., Hill H.R. Measurement of antibodies to pneumococcal polysaccharides with Luminex xMAP microsphere-based liquid arrays // *Methods Mol Biol*. – 2012. – №808. – P. 361–375.

74. Pyo D., Hahn J.H. Determination of trace amount of cyanobacterial toxin in water by microchip based enzyme-linked immunosorbent assay // *Immunoassay Immunochem.* – 2009. – V. 30. – №1. – P. 97–105.

75. Qiu X., Guo S., Wu H. et al. Identification of Wnt pathway, uPA, PAI-1, MT1-MMP, S100A4 and CXCR4 associated with enhanced metastasis of human large cell lung cancer by DNA microarray // *Minerva Med.* – 2012. – V. 103. – №3. – P. 151–164.

76. Rapp B.E., Gruhl F.J., Länge K. Biosensors with label-free detection designed for diagnostic applications // *Anal Bioanal Chem.* – 2010. – V. 398. – №6. – P. 2403–2412.

77. Ricci F., Adornetto G., Moscone D. et al. Quantitative, reagentless, single-step electrochemical detection of anti-DNA antibodies directly in blood serum // *Chem Commun (Camb).* – 2010. – V. 46. – №10. – P. 1742–1744.

78. Rider T.H., Petrovick M.S., Nargi F.E. et al. A B cell-based sensor for rapid identification of pathogens // *Science.* – 2003. – V. 301. – №5630. – P. 213–215.

79. Ronkainen N.J., Halsall H.B., Heineman W.R. Electrochemical biosensors // *Chem Soc Rev.* – 2010. – V. 39. – №5. – P. 1747–1763.

80. Selvarajah S., Chatterji U., Kuhn R. et al. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for dengue capsid // *Open Virol J.* – 2012. – №6. – P. 29–37.

81. Shuralev E., Quinn P., Doyle M. et al. Application of the Enfer chemiluminescent multiplex ELISA system for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in goats // *Vet Microb.* – 2012. – V. 154. – №3–4. – P. 292–297.

82. Smits G.P., van Gageldonk P.G., Schouls L.M. et al. Development of a bead-based multiplex immunoassay for simultaneous quantitative detection of IgG serum antibodies against measles, mumps, rubella, and varicella-zoster virus // *Clin Vaccine Immunol.* – 2012. – V. 19. – №3. – P. 396–400.

83. Taniuchi M., Walters C.C., Gratz J. et al. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. and

its evaluation on colonies, culture broths, and stool // *Diagn Microbiol Infect Dis.* – 2012. – V. 73. – №2. – P. 121–128.

84. Tian J., Zhou L., Zhao Y. et al. Multiplexed detection of tumor markers with multicolor quantum dots based on fluorescence polarization immunoassay // *Talanta.* – 2012. – V. 92. – P. 72–77.

85. Trøstrup H., Lundquist R., Christensen L.H. et al. S100A8/A9 deficiency in nonhealing venous leg ulcers uncovered by multiplexed antibody microarray profiling // *Br J Dermatol.* – 2011. – V. 165. – №2. – P. 292–301.

86. Tsutsui M., Taniguchi M., Kawai T. Single-molecule identification via electric current noise // *Nat Commun.* – 2010. – V. 1. – P. 138.

87. Turner M. Microbe outbreak panics Europe // *Nature.* – 2011. – V. 474. – №7350. – P. 137.

88. Valério E., Chambel L., Paulino S. et al. Multiplex PCR for detection of microcystins-producing cyanobacteria from freshwater samples // *Environ Toxicol.* – 2010. – V. 25. – №3. – P. 251–260.

89. Velasco-Garcia M.N., Mottram T. Biosensor Technology addressing Agricultural Problems // *Biosystems Engineering.* – 2003. – V. 84. – №1. – P. 1–12.

90. Wang J. Electrochemical biosensors: towards point-of-care cancer diagnostics // *Biosens Bioelectron.* – 2006. – V. 21. – №10. – P. 1887–1892.

91. Warita K., Mitsuhashi T., Tabuchi Y. et al. Microarray and gene ontology analyses reveal downregulation of DNA repair and apoptotic pathways in diethylstilbestrol-exposed testicular Leydig cells // *Toxicol Sci.* – 2012. – V. 37. – №2. – P. 287–295.

92. Washington Environmental Biomonitoring Survey – 2014 [Electronic resource]. – Access mode: <https://www.doh.wa.gov/Portals/1/Documents/1500/WEBSFactSheet.pdf> (retrieved: 11.03.2018).

93. Wasniewski M, Cliquet F. Evaluation of ELISA for detection of rabies antibodies in domestic carnivores // *J Virol Methods.* – 2012. – V.179, №1. – P. 166–175.

94. Wei D., Oyarzabal O.A., Huang T.S. et al. Development of a surface plasmon resonance biosensor for the identification of *Campylobacter jejuni* // *Microbiol Methods*. – 2007. – V. 69. – №1. – P. 78–85.
95. Whelan C., Shuralev E., Kwok H.F. et al. Use of a multiplex enzyme-linked immunosorbent assay to detect a subpopulation of *Mycobacterium bovis*-infected animals deemed negative or inconclusive by the single intradermal comparative tuberculin skin test // *J Vet Diagn Invest*. – 2011. – V. 23. – №3. – P. 499–503.
96. Whelan C., Shuralev E., O’Keeffe G. et al. Multiplex immunoassay for serological diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle // *Clin Vaccine Immunol*. – 2008. – V. 15. – №12. – P. 1834–1838.
97. Yamazaki T., Muramoto M., Okitsu O. et al. Discovery of a novel neuroprotective compound, AS1219164, by high-throughput chemical screening of a newly identified apoptotic gene marker // *Eur J Pharmacol*. – 2011. – V. 669. – №1–3. – P. 7–14.
98. Yanagisawa N., Mecham J.O., Corcoran R.C., Dutta D. Multiplex ELISA in a single microfluidic channel // *Anal Bioanal Chem*. – 2011. – V. 401. – №4. – P. 1173–1181.
99. Yang J.Y., He X. A multistep protein lysate array quantification method and its statistical properties // *Biometrics*. – 2011. – V. 67. – №4. – P. 1197–1205.
100. Yu D., Wu S., Wang B. et al. Rapid detection of common viruses using multi-analyte suspension arrays // *Virol Methods*. – 2011. – V. 177. – №1. – P. 64–70.
101. Yu L., Yu P.S., Yee Yen Mui E. et al. Phage display screening against a set of targets to establish peptide-based sugar mimetics and molecular docking to predict binding site // *Bioorg Med Chem*. – 2009. – V. 17. – №13. – P. 4825–4832.
102. Zhu C., Liu J., Ling Y. et al. Evaluation of the clinical value of ELISA based on MPT64 antibody aptamer for serological diagnosis of pulmonary tuberculosis // *BMC Infect Dis*. – 2012. – V. 12. – №1. – Article: 96.

Мукминов Малик Нилович – д-р биол. наук, профессор кафедры прикладной экологии Института экологии и природопользования ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Россия, Казань.

Шуралев Эдуард Аркадьевич – канд. ветеринар. наук, доцент кафедры прикладной экологии Института экологии и природопользования ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Россия, Казань.
