

Оценка корреляции сигналов «электронного носа» для носовой слизи и конденсата выдыхаемого воздуха телят с клиническими и лабораторными показателями

Т.А. Кучменко¹, *А.А. Шуба¹, Р.У. Умарханов¹, А.Е. Черницкий²

¹Воронежский государственный университет инженерных технологий, Российская Федерация, 394000 Воронеж, пр. Революции, 19

²Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии, Научно-исследовательский центр клинической фармакологии и терапии, качества и безопасности сырья и продукции

Российская Федерация, 394087 Воронеж, ул. Ломоносова, 114Б

* Адрес для переписки: Шуба Анастасия Александровна, E-mail: an-mishina@yandex.ru

Поступила в редакцию 18 ноября 2019 г., после исправления – 2 декабря 2019 г.

Обсуждается взаимосвязь первичных выходных данных массива сенсоров (площади многомерных аналитических сигналов сенсоров – «визуальных отпечатков») в парах биопроб телят (носовая слизь, конденсат выдыхаемого воздуха) с клиническими и лабораторными показателями, связанными с воспалением или наличием возбудителей инфекций, сопровождающим поражение органов дыхания животных. Установлено, что многомерные аналитические сигналы массива сенсоров для разных видов биопроб не коррелируют между собой, но по показателю доли трудно десорбирующихся веществ (кислоты, разветвленные алифатические, циклические амины) в общей смеси легколетучих соединений положительно оценена возможность замены проб конденсата выдыхаемого воздуха на пробы носовой слизи, которая отбирается быстро и менее травматично, для мониторинга состояния здоровья верхних дыхательных путей молодняка крупного рогатого скота. Установлена статистически значимая корреляция между откликами массива сенсоров для проб носовой слизи и биохимическими показателями повреждения клеток респираторного тракта в конденсате выдыхаемого воздуха (активность аспартатаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы и концентрация креатинина), индексом дыхательной недостаточности, содержанием лейкоцитов в крови. Отклики сенсоров для проб носовой слизи являются более информативными для ранней диагностики респираторных заболеваний у телят.

Ключевые слова: пьезосенсоры, «электронный нос», коэффициент корреляции, носовая слизь, конденсат выдыхаемого воздуха, диагностика, респираторные заболевания телят, маркеры воспаления

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2019, vol. 23, no. 4, pp. 557-562

DOI: 10.15826/analitika.2019.23.4.014

“Electronic nose” signals correlation evaluation for nasal mucus and exhaled breath condensate of calves with the clinical and laboratory indicators

T.A. Kuchmenko, *A.A. Shuba¹, R.U. Umarkhanov¹, A.E. Chernitskii²

¹Voronezh State University of Engineering Technologies”, pr. Revolutsii, 19, Voronezh, 394000, Russian Federation

²All-Russian Scientific Research Veterinary Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy”, Research Center of Clinical Pharmacology and Therapy, Quality and Safety of Raw Materials and Products, st. Lomonosova, 114b, Voronezh, Russian Federation

*Corresponding author: Anastasia A. Shuba, E-mail: an-mishina@yandex.ru

Submitted 18 November 2019, received in revised form 2 December 2019

In this article the “electronic nose” system (SNT LLC, Russia) with an array of 8 differently selective piezoelectric sensors (nanobio array) was used to assess the health and functioning of the respiratory organs in young cattle by the fraction of volatile compounds over bioassays (exhaled breath condensate and nasal mucus). The sorption of the volatile fraction of substances vapors from the two types of bioassays was studied for 80s with the frontal effortless injection of vapors into the near-sensor space of the detection cell of the “electronic nose” at 20 ± 1 °C with the subsequent fixation of the spontaneous desorption for 120s - total measurement time 200s. The simplest analytical signals of the “electronic nose” (S_z и S_{neg}) recorded and calculated in the software for the samples were proposed suitable for assessing the health of the respiratory organs in calves. A significant correlation was found between the analytical signals of the “electronic nose” and the established informative indicators of bovine respiratory diseases: increased activity of aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, creatinine in samples of exhaled breath condensate, respiratory failure index, and leukocyte count. The samples of nasal mucus were better used for the health assessment of the respiratory system using the nanobio array of sensors. Despite the initial small number of samples, the approach is universal and could be extended to the studies of other animals.

Key words: piezosensors, “electronic nose”, correlation coefficient, nasal mucus, exhaled breath condensate, diagnosis, bovine respiratory disease, markers of inflammation

ВВЕДЕНИЕ

Одной из современных научных тенденций в аналитической химии является разработка и применение новых тест-систем для решения задач диагностики в ветеринарии и медицине [1]. Получение значимых и воспроизводимых сигналов для таких систем при работе с реальными объектами (биопробами) является сложной задачей, из-за того, что их состав может значительно меняться от момента отбора пробы до измерения аналитического сигнала. Причины нестабильного состава биопроб могут быть как внутренними (жизнедеятельность микроорганизмов, деструктивные процессы нативных соединений во времени), так и внешними (изменение условий отбора пробы, реактивов и их чистоты при пробоподготовке). Наиболее быстро изменяется фракция легколетучих соединений биопробы, которая является самой информативной для оценки состояния и функционирования отдельного органа или системы внутренних органов. Поэтому для быстрого мониторинга изменения летучих соединений биопробы применяют аппаратные системы на основе высокочувствительных газовых сенсоров [2]. К таким приборам относятся системы «электронный нос» на основе масс-чувствительных сенсоров. При этом важным является получение сигналов сенсоров, отражающих изменения информативных клинических и лабораторных показателей, на основании которых, в последствие принимается решение о диагнозе заболевания.

Цель работы – оценить взаимосвязь сигналов массива сенсоров в парах биопроб верхних дыхательных путей (носовая слизь и конденсат выдыхаемого воздуха) с клиническими и лабораторными маркерами респираторных заболеваний у телят.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве объектов исследования выбраны пробы носовой слизи и конденсата выдыхаемого воздуха (КВВ) новорожденных телят (первые 5-9 дней жизни) красно-пестрой породы, содержащихся в хозяйстве (Воронежская область) в индивидуаль-

ных клетках. Общее клиническое состояние телят оценивали по балльной системе (**WI**), разработанной в Университете Висконсин-Мэдисон (США) [3], с обязательным лабораторным контролем гематологических и биохимических показателей воспаления в крови (лейкоцитоз, сдвиг лейкоцитарной формулы влево, повышенная концентрация гаптоглобина) и маркеров повреждения клеток респираторного тракта в пробах КВВ (повышенная активность аспартатаминотрансферазы (**AcAT**), аланинаминотрансферазы (**AlAT**), гамма-глутамилтрансферазы, щелочной фосфатазы, содержание мочевины и креатинина) в ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии», дополнительно определяли индекс дыхательной недостаточности (**ИДН**) [4]. По результатам клиничко-лабораторных исследований телята были разделены на две диагностические группы: «здоровые со стороны дыхательной системы» (инв. номера 2444, 2671) и «с признаками респираторных заболеваний» (инв. номера 2666, 2667, 2668, 2669, 2670, 2672). КВВ у животных ($n = 8$) объемом 10 см³ собирали в утренние часы до кормления с помощью специального устройства (патент РФ на полезную модель № 134772) с учетом объема выдыхаемого воздуха. Пробы носовой слизи у телят отбирали по собственной разработанной методике с помощью стерильных ватных тампонов-зондов, которые используют при отборе материала для бактериологических исследований, в течение 4-5 секунд. Не менее, чем через 20 минут после отбора пробы носовой слизи последовательно извлекались из стерильных пробирок, переносились на стеклянную подложку – чашку Петри – и далее проводилось измерение их легколетучих соединений. Время между извлечением ватного тампона из пробирки и измерением составляло 1 минуту и строго контролировалось. Параллельно исследовали состав газовой фазы над конденсатом выдыхаемого воздуха.

Оба вида проб изучали при фронтальном естественном напуске паров от биопробы в около-сенсорное пространство ячейки детектирования при 20 ± 1 °C на анализаторе газов «МАГ-8» с массивом

8 разно селективных пьезосенсоров (ООО «СНТ», Россия). Фиксировали хроночастотограммы в течение 200 с и шагом в 1 с, по которым в программном обеспечении «MAG-Soft» рассчитывали площади «визуальных отпечатков» (S_{Σ} , S_{neg} , Гц×с) [5].

В качестве селективных покрытий пьезокварцевых резонаторов, ПКР (ОАО «Пьезо», Москва, базовая частота 10.0 -14.0 МГц) для создания сенсоров выбраны покрытия с низким шумом и дрейфом базовой линии, в том числе пленки нитрата оксида циркония, карбоксилированные углеродные нанотрубки, синтезированные в Институте особо чистых материалов (г. Черноголовка), свежееосажденный биогидроксипатит (оптимизированная методика [6]) различных масс в интервале от 1 до 5 мкг. Изготовление пьезосенсоров осуществляли по описанной ранее методике [7]. Ранее было показано, что эти покрытия имеют высокую чувствительность к биомолекулам и перспективно применение этих покрытий в диагностике состояния биопроб [8].

Для статистической оценки различий по клиническим и лабораторным показателям между диагностическими группами в виду их малой выборки рассчитывали критерий Манна-Утти (U) [9]. Степень взаимосвязи между сигналами сенсоров и клиническими и лабораторными показателями оценивали по коэффициенту ранговой корреляции Спирмена (ρ) [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

КВВ в неинвазивной диагностике используется довольно часто из-за своей представительности для оценки состояния органов дыхания [10-12]. Однако отбор даже 3-5 мл конденсата выдыхаемого воздуха у новорожденных телят связан с определенными сложностями и достаточно длителен (около 20 минут). Метод пьезокварцевого микровзвешивания с применением массива высоко чувствительных по массе газовых сенсоров позволяет существенно уменьшить объем анализируемых проб, поэтому в качестве альтернативной биопробы для оценки респираторных заболеваний предложено применять носовую слизь.

Одной из информативных интегральных характеристик состава легколетучей фракции газовой фазы над биопробами, фиксируемой набором химических сенсоров является площадь фигуры «визуального отпечатка» сигналов всех сенсоров за полное время измерения (S_{Σ} , Гц×с), фактически площадь суммы хроночастотограмм, пропорциональных массе сорбируемых аналитов.

При этом программное обеспечение анализатора газов «MAG-8» позволяет выделить отдельные участки на хроночастотограммах, связанные с особенностями изменения интенсивности сорбции и десорбции легколетучих молекул, отражающие их природу. Так, появление в газовой фазе над биопробой заметного количества кислот, алифатических и циклических аминов значительно изменяют

форму десорбционной части хроночастотограмм (рисунок а). Эти биомолекулы являются маркерами многих воспалительных и деструктивных процессов в организме [13].

На рисунке а показано, что десорбция аминов (после 80 с) с селективных слоев сенсоров является длительной с небольшим изменением частот колебаний сенсоров ($-\Delta F$, Гц). На примере хроночастотограмм для проб носовой слизи видно, что в одном случае (рисунок б) сразу после окончания сорбции газов и паров веществ идет резкое и значительное уменьшение частоты колебаний сенсоров, а во втором случае (рисунок в) изменения частот колебаний сенсоров в десорбционной части хроночастотограммы не столь значительны и формы кривых (рисунок в) идентичны по форме хроночастотограммам сорбции-десорбции аминов (рисунок а). Такой характер хроночастотограмм, соответствующий десорбции аналитов (самопроиз-

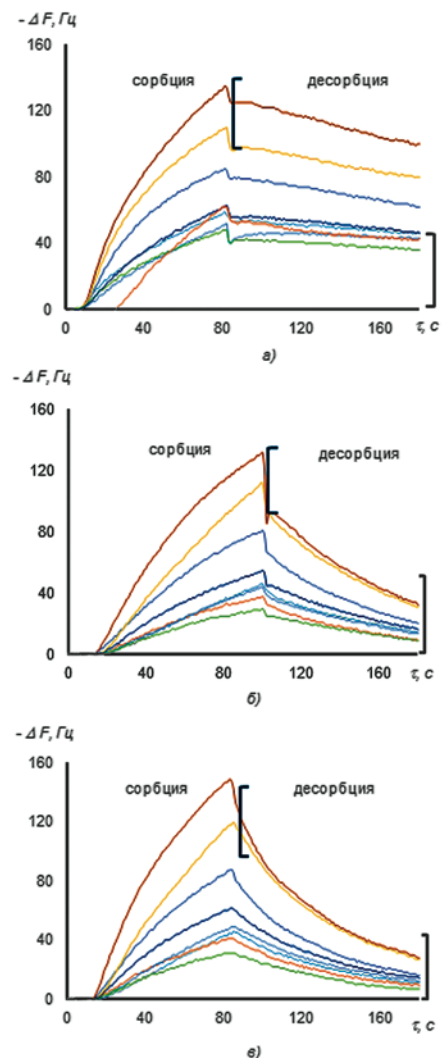


Рисунок. Хроночастотограммы сигналов массива сенсоров при взаимодействии с парами аминов (а) и проб носовой слизи (б, в).

Figure. Time dependence of signals from the array of sensors interacting with vapors of amines (а) and nasal mucus samples (б, в).

вольной разгрузки сенсоров), является первичным признаком присутствия в легколетучей фракции биопроб аминов разного строения. При этом, чем больше молярная масса алифатических, циклических аминов, тем меньше скорость десорбции и выше отклики сенсоров на момент окончания цикла измерения (200 с).

Введем дополнительный дифференцирующий параметр S_{neg} (негативная), Гц×с – площадь части хроночастотограмм, отражающая особенности самопроизвольной десорбции аналитов (рисунок, выделено областями). Увеличение доли S_{neg} в общей S_{Σ} является дополнительным критерием оценки патологических процессов, так как отражает увеличение концентрации «негативных» биомолекул в общей смеси летучих соединений биопроб. Важны не только абсолютные величины площадей фигур интегрального аналитического сигнала массива сенсоров, но и доля трудно десорбирующихся веществ в общей смеси сорбатов ($w, \%$), что отражает, по нашему мнению, S_{neg} .

В табл. 1 представлены значения S_{Σ} и S_{neg} и ее доля ($w, \%$) для «визуальных отпечатков» сигналов сенсоров в газовой фазе над пробами КВВ и носовой слизи, отобранных последовательно в один день у группы новорожденных телят. Из-за быстрого изменения состава газовой фазы повторное измерение для одной пробы нельзя усреднять с первичными результатами.

На первом этапе по коэффициенту ранговой корреляции оценили тесноту связи между однотипными сигналами массива сенсоров для проб конденсата выдыхаемого воздуха и носовой слизи. При этом ставилась задача замены проб КВВ более просто и атравматично отбираемой пробой (слизь) для оценки наличия поражения органов дыхания у телят по сигналам газовых сенсоров «электронного носа». Для некоторых проб носовой слизи, отобранных из левой и правой ноздри, значения откликов «электронного носа» существенно различались, поэтому для расчетов использовали усредненные значения S_{Σ} и S_{neg} (табл. 1). Установлено, что какая-либо статистически

значимая и сильная корреляция между идентичными параметрами для проб носовой слизи и КВВ отсутствует. Применение критерия Манна-Уитни (U) для сравнения доли негативных веществ маркеров от общего числа сорбатов для проб носовой слизи и конденсата выдыхаемого воздуха у малой выборки телят показало, что расчетное значение U -критерия равно 30, а критическое значение при заданной численности сравниваемых групп составляет 13. Следовательно, различия в доли трудно десорбирующихся веществ в общей смеси сорбатов ($w, \%$) между сравниваемыми группами статистически не значимы ($p > 0,05$). Это значит, что носовая слизь и конденсат выдыхаемого воздуха несут разнозначную диагностическую информацию, в частности о содержании аминов, кислот и особенно при больших концентрациях их в пробах, что является отражением негативных процессов в органах верхних дыхательных путей телят. Поэтому можно заменить пробы КВВ носовой слизью, что существенно упростит процедуру отбора пробы и сократит время анализа.

На втором этапе по критерию Манна-Уитни (U) оценивали значимость разделения телят на диагностические группы по клиническим и лабораторным показателям (табл. 2). Установлено, что статистически значимо разделение проб на диагностические группы по показателям: кашель, WI, ИДН и некоторым биохимическим для проб КВВ (АсАТ, АлАТ, креатинин), для которых рассчитанный U -критерий меньше $U_{критический} = 6$ ($p > 0,05$). Поэтому на следующем этапе оценивали степень корреляции площадей «визуальных отпечатков» сигналов сенсоров с этими клиническими и лабораторными показателями, отражающими наличие поражения органов дыхания у телят (табл. 3).

Установлена слабая связь между площадью «визуальных отпечатков» сигналов массива сенсоров S_{neg} , отражающей часть смеси легколетучих соединений, для проб КВВ и клиническими, лабораторными показателями, и только площадь «визуальных отпечатков» сигналов сенсоров за полное время измерения S_{Σ} статистически значимо

Таблица 1

Интегральные аналитические сигналы сенсоров ($S_{\Sigma}, S_{neg}, \text{Гц}\cdot\text{с}$) в парах проб носовой слизи и КВВ телят и доля ($w, \%$) S_{neg} в общей площади «визуальных отпечатков» S_{Σ}

Table 1

Integral analytical signals of sensors ($S_{\Sigma}, S_{neg}, \text{Hz}\cdot\text{s}$) in vapors of samples of nasal mucus and exhaled breath condensate of calves and the proportion ($w, \%$) S_{neg} in the total area of “visual prints” S_{Σ}

Инв. номер	Для проб носовой слизи			Для проб конденсата выдыхаемого воздуха		
	$S_{\Sigma}, \text{Гц}\cdot\text{с}$	$S_{neg}, \text{Гц}\cdot\text{с}$	$w, \%$	$S_{\Sigma}, \text{Гц}\cdot\text{с}$	$S_{neg}, \text{Гц}\cdot\text{с}$	$w, \%$
2444	4421	423	9.6	30557	3611	11.8
2666	6944	323	4.7	20851	1920	9.2
2667	3147	108	3.4	4568	93	2.0
2668	4469	321	7.2	13063	956	7.3
2669	8818	724	8.2	36963	753	2.0
2670	5096	314	6.2	283	17	6.0
2671	6697	343	5.1	2768	239	8.6
2672	12625	915	7.2	7233	426	5.9

Таблица 2

Некоторые клинические и лабораторные показатели состояния здоровья телят

Table 2

Some clinical and laboratory indicators of calves' health

Инв. № пробы	Клинические показатели			Лабораторные показатели сыворотки крови		Биохимические показатели проб КВВ		
	Кашель, баллы	Wl, баллы	ИДН, усл. ед.	с(гапто-глобина), г/л	с(лейкоцитов), 10 ⁹ /л	АсАТ, Е/л	АлАТ, Е/л	Креатинин, мкМ/л
2444	0	2	2.10	4.14	10.6	2.4	2.5	0.27
2666	1	3	2.15	4.76	10.6	5.6	4.8	0.31
2667	3	4	2.50	4.26	9.0	9.9	20.8	0.29
2668	1	2	2.30	4.37	9.0	6.9	4.8	0.27
2669	2	4	1.56	4.95	6.6	15.5	1.7	0.32
2670	1	3	2.64	3.99	5.8	6.8	7.9	0.27
2671	0	2	1.82	4.37	11.0	11.5	0.2	0.27
2672	1	2	1.71	4.41	4.6	15	0.8	0.29
<i>U</i>	0	0.5	4	6.5	6	4	2	2

Таблица 3

Коэффициенты ранговой корреляции Спирмена (ρ) сигналов массива сенсоров при анализе биопроб телят с клиническими и лабораторными показателями

Table 3

Spearman's rank correlation coefficients (ρ) of the sensor array signals in the analysis of biosamples from calves with clinical and laboratory parameters

Показатель	Для проб носовой слизи		Для проб конденсата выдыхаемого воздуха	
	S_z , Гцхс	S_{neg} , Гцхс	S_z , Гцхс	S_{neg} , Гцхс
Кашель	0.055	-0.314	0.138	-0.267
Wl	0.012	-0.176	0.155	-0.250
ИДН	-0.690	0.520	-0.550	-0.360
АсАТ	0.550	0.400	-0.238	-0.400
АлАТ	-0.626	-0.840	-0.197	-0.221
Креатинин	0.543	0.328	-0.386	0.174

Примечание: жирным выделены статистически значимые коэффициенты ранговой корреляции $\rho > \rho_{0.05;16} = 0.497$

коррелирует с ИДН, как интегральным показателем дыхательной недостаточности у телят (табл. 3).

Площади «визуальных отпечатков» сигналов массива сенсоров (S_z и S_{neg}) для проб носовой слизи умеренно или сильно связаны с результатами клинико-лабораторных испытаний. При этом сильная значимая отрицательная корреляция установлена для S_{neg} проб носовой слизи и биохимическим показателем АлАТ. Связь с показателем АсАТ прямая, что указывает на сорбцию массивом сенсоров газов, связанных также метаболическими путями с данными ферментами. Установлена значимая корреляция площадей «визуальных отпечатков» сигналов сенсоров для проб носовой слизи и ИДН, однако для S_z связь с ИДН обратная, а для S_{neg} – прямая. Это подтверждает обоснованность введения данного параметра (S_{neg}), по которому из всей совокупности сигналов сенсоров выделяются только информативные для диагностики патологических изменений в органах дыхания у телят. Также достоверная и статистически значимая корреляция между S_{neg} для проб носовой слизи и содержанием лейкоцитов в крови $\rho = 0.498 > \rho_{0.05;16}$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования получены результаты, позволяющие сделать следующие выводы для дальнейшей разработки нового метода мониторинга состояния органов дыхания:

Предложены наиболее простые регистрируемые и рассчитываемые в программном обеспечении аналитические сигналы «электронного носа» (S_z и S_{neg}) для проб, которые пригодны для оценки состояния органов дыхания у телят;

Различия в значениях доли трудно десорбирующихся веществ в общей смеси легколетучих соединений над пробами носовой слизи и конденсата выдыхаемого воздуха незначительны, что позволяет заменить пробы КВВ носовой слизью для оценки состояния органов дыхания;

Установлена значимая корреляция аналитических сигналов «электронного носа» с информативными показателями повреждения клеток респираторного тракта (активность АлАТ, АсАТ и концентрация креатинина в КВВ), дыхательной

недостаточности (ИДН) и воспаления (повышение содержания лейкоцитов в крови);

Несмотря на первичную малую выборку, считаем, что подход универсальный и может быть распространен на исследования других животных.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 18-76-10015.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by the Russian Science Foundation (grant number 18-76-10015).

ЛИТЕРАТУРА

1. Золотов Ю.А. Перспективы развития аналитической химии // Журнал аналит. химии. 2019. Т. 74, № 9 Приложение. С. 3-5.
2. Wilson A.D. and Baietto M. Advances in Electronic-Nose Technologies Developed for Biomedical Applications // *Sensors*. 2011. V. 11. P. 1105-1176.
3. McGuirk S.M. Disease management of dairy calves and heifers // *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 2008. V. 24, № 1. P. 139-153.
4. Методическое пособие по прогнозированию и ранней диагностике респираторных болезней у телят / А.Е. Черницкий [и др.]. Воронеж, Издательство «Истоки». 2013. 48 с.
5. Кучменко Т.А. Инновационные решения в аналитическом контроле: учеб. пособие. Воронеж: Воронеж. гос. технол. акад., ООО «СенТех», 2009. 252 с.
6. Kuchmenko T.A., Lvova L.B. A Perspective on Recent Advances in Piezoelectric Chemical Sensors for Environmental Monitoring and Foodstuffs Analysis // *Chemosensors*. 2019. V. 7, № 3, P. 39-45.
7. Проблемы аналитической химии. В 17 т. Т. 14 Химические сенсоры на основе пьезокварцевых микровесов / Кучменко Т.А.; отв. ред. Ю.Г. Власова М.: Наука, 2011. С. 398.
8. Кучменко Т.А., Умарханов Р.У., Босикова Ю.Н., Шогенов Ю.Х. Особенности применения наноструктурированных фаз // Материалы V Всерос. симпозиума с международным участием «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии», Краснодар, 2018. С. 191.
9. Гланц С. Медико-биологическая статистика: пер. с англ. М.: Практика, 1999. 462 с.
10. Респираторные болезни телят: современный взгляд на проблему / С.В. Шабунин [и др.] // *Ветеринария*. 2015. № 5. С. 3-12.
11. Cathcart M.P., Hughes K.J. The application of exhaled breath gas and exhaled breath condensate analysis in investigation of lower respiratory tract in veterinary medicine: A review // *The Veterinary Journal*. 2012. V. 191, № 2. P. 282-291.
12. Zhou M., Liu Y., Duan Y. Breath biomarkers in diagnosis of pulmonary diseases // *Clinica Chimica Acta*. 2012. V. 413, № 21-22. P. 1770-1780.
13. Amann A. and Smith D. Volatile Biomarkers. Non-invasive diagnosis in physiology and medicine. Elsevier, 2013. p. 568.

REFERENCES

1. Zolotov Yu.A. [Prospects for the development of analytical chemistry]. *Zh. Analiticheskoi Khimii [Journal of Analyt. Chemistry]*, 2019, vol. 74, no. 9 Appendix, pp. 3-5. doi: 10.1134/S0044450219090251
2. Wilson A. D. and Baietto M. [Advances in Electronic-Nose Technologies Developed for Biomedical Applications] *Sensors*, 2011, vol. 11, pp. 1105-1176. doi: 10.3390 / s110101105
3. McGuirk S.M. [Disease management of dairy calves and heifers] *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 2008, vol. 24, no. 1, pp. 139-153. doi: 10.1016/j.cvfa.2007.10.003.
4. Chernitskii A.E., Efanova L.I., Zolotarev A.I., Shakhov A.G., Shabunin S.V., Retskii M.I. *Metodicheskoe posobie po prognozirovaniu i rannei diagnostike respiratornykh boleznei u teliat [Methodical manual for predicting and early diagnosis of respiratory diseases in calves]*. Voronezh, Istoki Publ., 2013. 48 p. doi: 10.13140/RG.2.2.11326.28481 (in Russian).
5. Kuchmenko T.A. *Innovatsionnye resheniia v analiticheskoi kontrole: uchebnoe posobie [Innovative solutions in analytical control: textbook]*. Voronezh, Voronezh. state technol. acad., LLC SenTech, 2009. 252 p.
6. Kuchmenko T.A., Lvova L.B. A Perspective on Recent Advances in Piezoelectric Chemical Sensors for Environmental Monitoring and Foodstuffs Analysis. *Chemosensors*, 2019, vol. 7, no. 3, pp. 39-45. doi.org/10.3390/chemosensors7030039.
7. Kuchmenko T.A. *Problemy analiticheskoi khimii. Kn. 14. Khimicheskie sensory na osnove p'ezokvartsevykh mikrovesov [Problems of analytical chemistry. Vol.14. Chemical sensors based on piezoelectric quartz microbalances]* Ed. Yu.G. Vlasov, Moscow: Nauka Publ., 2011. 398 p. (in Russian).
8. Kuchmenko T. A., Umarkhanov R.U., Bosikova Yu.N., Shogenov Yu.Kh. [Features of the application of nanostructured phases]. *Materialy V Vseros. simpoziuma s mezhdunarodnym uchastiem «Razdelenie i kontsentrirovanie v analiticheskoi khimii i radiokhimii» [Materials of the V All-Russian Symposium with international participation "Separation and Concentration in Analytical Chemistry and Radiochemistry"]*. Krasnodar, 2018, p. 191 (in Russian).
9. Glantz S.A. *Primer of Biostatistics*. 4th ed. McGRAW-HILL, 1994. 462 p. (Russ. ed.: Glants S. *Mediko-biologicheskai statistika*. Moscow: Praktika Publ., 1999. 462 p.).
10. Shabunin S.V., Shakhov A.G., Chernitsky A.E., Zolotarev A.I., Retsky M.I. [Calf Respiratory Diseases: A Modern Look at the Problem]. *Veterinariia [Veterinary Medicine]*, 2015, no. 5, pp. 3-12 (in Russian).
11. Cathcart M.P., Hughes K.J. [The application of exhaled breath gas and exhaled breath condensate analysis in investigation of lower respiratory tract in veterinary medicine: A review]. *The Veterinary Journal*, 2012, vol. 191, no. 2, pp. 282-291. doi: 10.1016/j.tvjl.2011.08.016
12. Zhou M., Liu Y., Duan Y. [Breath biomarkers in diagnosis of pulmonary diseases] *Clinica Chimica Acta*, 2012, vol. 413, no. 10, pp. 1770-1780. doi: 10.1016/j.cca.2012.07.006
13. Amann A. and Smith D. eds. [Volatile Biomarkers. Non-invasive diagnosis in physiology and medicine]. Elsevier Publ., 2013. 568 p.