

БІОСЕНСОРИ

BIOSENSORS

УДК 619:616-076:579.842.14:681.7

ОПТИЧНИЙ ІМУННИЙ БІОСЕНСОП «PLASMONOTEST» ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ *SALMONELLA TYPHIMURIUM*

Ю. О. Огороднійчук¹, Т. С. Лебедева², П. Б. Шпильовий², М. Ф. Стародуб¹

¹Національний університет біоресурсів і природокористування України
вул. Героїв Оборони, 15., Київ, 03041 Україна, тел. (+38) (044) 527-88-32

²Інститут кібернетики ім. В.М. Глушкова НАН України
просп. Академіка Глушкова, 40., Київ, 03680 Україна, тел. (+38) (044) 526-20-08
ogorodniichuk@mail.ru, tetyana_leb@mail.ru, shpylovy@mail.ru, nikstarodub@yahoo.com

ОПТИЧНИЙ ІМУННИЙ БІОСЕНСОП «PLASMONOTEST» ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ *SALMONELLA TYPHIMURIUM*

Ю. О. Огороднійчук, Т. С. Лебедева, П. Б. Шпильовий, М. Ф. Стародуб

Біосенсори на основі поверхневого плазмонного резонансу (ППР) є ефективним інструментальним засобом для здійснення моніторингу патогенних мікроорганізмів, оскільки вони мають високу специфічність, чутливість, прості у використанні і не вимагають значних витрат часу для проведення аналізу. Нами було розроблено портативний імунобіосенсор на основі ППР і проведено визначення наявності та концентрації *Salmonella typhimurium* у модельних розчинах. Також було вдосконалено методику попередньої підготовки поверхні трансдюсера для підвищення рівня чутливості біосенсору.

Ключові слова: оптичний імуносенсор, поверхневий плазмонний резонанс, реакція антиген-антитіло, *Salmonella typhimurium*

OPTICAL IMMUNE BIOSENSOR «PLASMONOTEST» FOR THE DETECTION OF *SALMONELLA TYPHIMURIUM*

Y. Ogorodniichuk, N. Starodub, T. Lebedeva, P. Shpylovy

Biosensors based on the principles of surface plasmon resonance (SPR) are the effective tool for providing monitoring of pathogenic microorganisms because of their specificity, sensitivity, easy use and short time of analysis. We have developed a portable immunosensor based on SPR and detected *Salmonella typhimurium* presence and concentration in model solutions. In addition, the methodology

of transducer surface pre-treatment has been improved that provides higher sensitivity of the biosensor.

Keywords: optical immunosensor, surface plasmon resonance, antigen-antibody reaction, *Salmonella typhimurium*

ОПТИЧЕСКИЙ ИММУННЫЙ БИОСЕНСОР «PLASMONOTEST» ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ *SALMONELLA TYPHIMURIUM*

Ю. А. Огороднийчук, Т. С. Лебедева, П. Б. Штилевой, Н. Ф. Стародуб

Биосенсоры на основе поверхностного плазмонного резонанса (ППР) являются эффективным средством для проведения мониторинга патогенных микроорганизмов, поскольку имеют высокую специфичность, чувствительность, просты в использовании и не требуют значительных затрат времени для проведения анализа. Нами был разработан портативный иммунобиосенсор на основе ППР и проведено определение наличия и концентрации *Salmonella typhimurium* в модельных растворах. Также было усовершенствовано методику предварительной подготовки поверхности трансдюсера для повышения уровня чувствительности биосенсора.

Ключевые слова: оптический иммуносенсор, поверхностный плазмонный резонанс, реакция антиген-антитело, *Salmonella typhimurium*

Вступ

Захворювання, спричинені патогенними мікроорганізмами, становлять проблему світового масштабу. Визначення бактеріального забруднення об'єктів навколишнього середовища є дуже важливим для захисту здоров'я населення. Більше того, багато з них є патогенними для людини і тварин і потрапляючи в організм викликають важкі отруєння і захворювання, які часто призводять до смерті. Така ситуація характерна не лише для країн, що розвиваються, а є світовою проблемою, над вирішенням якої працюють учені всіх провідних країн світу [1,2].

Для захисту населення від патогенних мікроорганізмів потрібно проводити постійний моніторинг об'єктів навколишнього середовища. Нажаль, більшість відомих на сьогодні методів визначення мікроорганізмів вимагають або великих проміжків часу, або ж дорогого обладнання і реактивів. У зв'язку з цим розробка нових недорогих, швидких та дешевих методів визначення патогенних мікроорганізмів у навколишньому середовищі є дуже актуальним питанням. Водночас, ці методи по-

винні мати високу чутливість і специфічність оскільки інфекційна доза для таких патогенних видів як *E. coli* O157:H7 або *Salmonella* становить менше ніж 10 клітин на 100 мл [2].

Salmonella spp. – це група патогенних мікроорганізмів, представники якої найчастіше спричиняють харчові токсикоінфекції і завдають значної шкоди харчовій промисловості. Більшість представників роду *Salmonella* являються патогенними для людини і тварин, але у епідеміологічному відношенні лише деякі з них займають вагоме місце і спричиняють 85-91% випадків сальмонельозів серед яких *S. typhimurium*. Інфекції зазвичай швидко розповсюджуються, важко піддаються лікуванню і можуть уражувати великі кількості людей і тварин [1]. Інша значна небезпека – це стійкість *Salmonella spp.* до антибіотиків. Близько 180 сирих проб, що включають курятину, яловичину, свинину та ракоподібних, майже половина виділених культур були стійкими як мінімум до одного з антибіотиків. Більше того, з усіх типів харчових продуктів було виділено мультистійкі культури, що проявляли стійкість мінімум до трьох різних класів антибіотиків [3]. Зазначений факт ускладнює лікування за-

хворювань, викликаних представниками роду *Salmonella* та робить можливим використання стійких сальмонел в якості біологічної зброї.

Традиційні методи визначення *S. typhimurium* не можуть у повній мірі задовольнити потреби практики, оскільки представляють собою послідовний, складний процес, який включає попереднє збагачення, селективне збагачення, біохімічне тестування та серологічне підтвердження. Така технологія введення в чисту культуру для визначення *Salmonella spp.* потребує 3 – 4 дні для надання попередніх результатів, та додаткових 1 – 2 дні для подальшого біохімічного підтвердження [4].

Альтернативними методами, що часто застосовуються для визначення *Salmonella* є твердофазний імуоферментний аналіз (ELISA) та різні види полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Але ці методи також мають ряд недоліків. Для ELISA це перш за все високий поріг чутливості $>10^5$ КУО/мл [5], кросреактивність [6], зміна антигенів у зв'язку з ацилюванням і зміна розпізнавальної здатності антитіл [7]. ПЛР метод досить чутливий і специфічний, але потребує досить багато часу та спеціального обладнання і може використовуватися лише для проведення якісного аналізу. До того ж ці методи потребують декількох етапів попереднього збагачення проб, які є досить рутинними та потребують значних затрат часу.

Достовірність і діагностична точність лабораторних методів може бути покращена за рахунок використання інструментальних аналітичних приладів на основі принципів біосенсорики. Серед значної кількості різних типів біосенсорів особлива увага приділяється тим, що базуються на принципі ППР, вони набули широкого промислового виробництва: BIACORE (Швеція), Spreeta (США) [8,9] і їх використовують в якості основної реєструючої частини для розробки нових методів аналізу і пристроїв. Нами було розроблено портативний імунобіосенсор на основі ППР зі змінними чіпами та методику визначення *S. typhimurium* у модельних розчинах. Також було проаналізовано чутливість приладу в залежності від попередньої підготовки поверхні трансдюсера.

Матеріали і методи

«Plasmonotest» – це оптичний пристрій на базі ППР, оснащений CCD матрицею на 2048 пікселів, який з'єднується безпосередньо з комп'ютером, реєструє і обробляє отриманий оптичний сигнал (Рис.1).



Рис. 1. Загальний вигляд імунобіосенсору «Plasmonotest».

Однією з відмінностей даного приладу є те, що чутливий шар формується на скляній пластинці, поверхня якої покрита 1-2 нм адгезійним шаром ніобію та та 50 нм плівкою золота, яка забезпечує виникнення поверхневого плазмонного резонансу. Пластинка поєднується з призмою за допомогою імерсійної рідини. Такий підхід є зручнішим, тому що скляні пластинки можна легко замінювати та/або регенерувати. Більше того, за такого підходу можливо заздалегідь забезпечити попередню підготовку чутливої поверхні. Схему робочого модулю «Plasmonotest» з проточною коміркою зображено на рисунку 2.

Проблему обробки інформації та накопичення даних було вирішено шляхом розробки програмного забезпечення інженерами Інституту кібернетики [10]. Чутливість приладу становить 0,001 градуса. Проточна комірка дозволяє регулювати об'єм та швидкість прокачування рідини, а також дозволяє швидко стабілізувати температуру нововведеної рідини, що значною мірою прискорює процес проведення аналізу та полегшує інтерпретацію результатів. Точність стабілізації температури в проточній комірці становить менше ніж 0.1 °C.

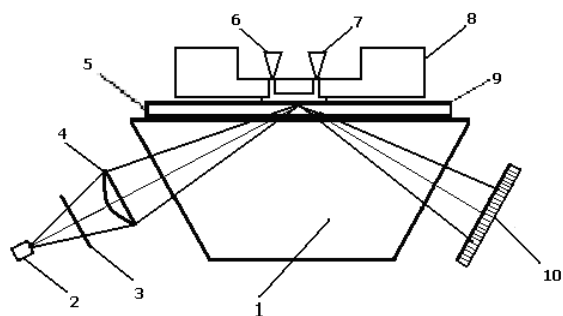


Рис. 2. Схема біосенсора «Plasmonotest» з проточною коміркою:

1 – призма; 2 – світлодіодна лампа; 3 – поляризатор; 4 – лінза; 5 – скляна пластинка; 6 – отвір для внесення рідини; 7 – отвір для відведення рідини; 8 – проточна комірка; 9 – шар золота; 10 – світлочутлива лінійка.

У багатьох дослідженнях доведено ефективність використання імунного біосенсора на основі ППР для реєстрації специфічної взаємодії антиген-антитіло [11]. Для цього на поверхню перетворювача іммобілізують специфічні антитіла, що забезпечує селективне зв'язування відповідного антигену з привнесеного розчину. Але виявилось, що результати аналізу істотно залежать від того, яким чином підготовлено шар золота на скляній поверхні, в який спосіб ця поверхня піддавалась попередній обробці та який стан іммобілізованого біологічного матеріалу на поверхні трансдюсера.

Нанесення на поверхню золота різних покриттів дозволяє збільшити чутливість біосенсора. Зокрема, за іммобілізації біологічних молекул звичайною фізичною адсорбцією на чистій поверхні золота, або ж попередньо обробленій додекантіолом, чи поліелектролітами [12,13] досить значна їх частина може бути блокована внаслідок контакту активних центрів (наприклад антиген-зв'язуючих сайтів) з поверхнею. Щоб уникнути цього недоліку використовують різні підходи, серед яких найбільш поширенішими є орієнтоване включення біологічних молекул у плівки Ленгмюр-Блоджет різного складу [14] або ж попередня іммобілізація на поверхні білку А з *Staphylococcus aureus* [13] та лектинів [15,16], що мають спорідненість до F_c-фрагменту IgG, або ж до його карбогідратного компонента [17].

Схематично проведення імунологічної реакції з попередньою обробкою поверхні золота ПАА та зі специфічними антитілами осадженими на поверхні шару білка А представлено на рис.3, А та рис.3, Б, відповідно.

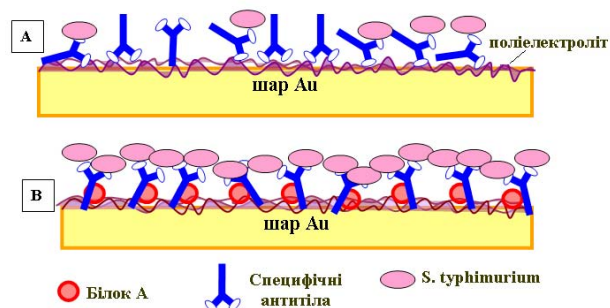


Рис. 3. Схема проведення імунологічної реакції

(А) – зв'язування *S. typhimurium* зі специфічними антитілами, нанесеними на золоту поверхню, попередньо оброблену ПАА;

(Б) – зв'язування *S. typhimurium* зі специфічними антитілами осадженими на поверхні шару білка А.

Поліелектролітна нерозчинна плівка на золотій поверхні формувалась з використанням поліаліламіну гідрохлориду (ПАА). Поліелектроліт використовували в концентрації 1 мг/мл. Час експозиції розчину становив 10 хвилин при температурі 25°C. Поверхню промивали дистильованою водою. У результаті було отримано зміну резонансного кута в межах 0,1 градуса.

Потім на поверхню, вкриту плівкою поліелектроліту, здійснювали нанесення розчину білку А. Білок А – видоспецифічний антиген для *Staphylococcus aureus*. Він має здатність адсорбувати з розчинів до 90 % імуноглобулінів класу G у тому числі й неспецифічні. Молекула білку А має 4 домени, кожен з яких містить неспецифічний рецептор для зв'язування Ig. Він зв'язує F_c-фрагменти імуноглобулінів, забезпечуючи реакцію антиген-антитіло, яка не носить специфічного характеру [18]. Таким чином на золотій поверхні перетворювача формується орієнтований шар антитіл, які мають вільні антиген-зв'язуючі сайти, що значно підвищує кількість адсорбованого антигену, і водночас величину відгуку приладу.

Розчин білку А було приготовано в трис НСІ буфері (рН 7,4) концентрацією 1 мг/мл. Нанесення здійснювали протягом 30 хв за температури 25°C, після чого здійснювали промивання комірки 0,9% фізіологічним розчином (ФР). У результаті було отримано зміну резонансного кута в межах 0,4 градуса.

Після нанесення білку А здійснювали адсорбцію поліклональних антитіл (Ab), специфічних до *Salmonella typhimurium*. Антитіла, використані в досліджах, були надані Державним науково-дослідним контрольним інститутом ветеринарних препаратів та кормових добавок. Розчин антитіл було приготовано в трис НСІ буфері (рН 7,4).

Нанесення антитіл здійснювали протягом 30 хв за температури 25°C, після чого здійснювали промивання комірки ФР. У результаті було отримано зміну резонансного кута в межах 0,6 градуса.

Наступним етапом було проведено нанесення бичачого сироваткового альбуміну (BSA) для блокування можливих порожніх ділянок на золотій поверхні.

Розчин BSA, отриманого від Sigma (США), готували, використовуючи трис НСІ буфер (рН 7,4) концентрацією 1 мг/мл. Нанесення здійснювали протягом 10 хв при температурі 25°C, після чого здійснювали промивання комірки ФР. В результаті було отримано зміну резонансного кута в межах 0,05 градуса.

Обробка поверхні 1% розчином BSA після сорбції антитіл не вносить суттєвих змін у величину резонансного кута, що реєструється. Це означає, що на поверхні практично не залишались вільні місця зв'язування, а концентрація антитіл була достатньою для створення максимально щільного шару.

Наступним етапом експерименту було здійснення нанесення розчинів *Salmonella typhimurium* з різною концентрацією антигену (Ag) на попередньо підготовлену поверхню перетворювача. Розчин *S. typhimurium* був наданий Державним науково-дослідним контрольним інститутом ветеринарних препаратів та кормових добавок. З вихідного розчину було приготовано 6 робочих розчинів різної концентрації, а саме від 10^1 – до 10^6 кліт/мл. Розведення вихідного розчину здійснювали ФР.

Нанесення розчинів антигену проводили послідовно по мірі зростання концентрації. Швидкість осідання антигену на поверхні трансдюсера відслідковували по зміні кута відбиття на сенсорограмі приладу. Час експозиції кожного розчину становив 10 хвилин за температури 25°C, оскільки надалі зміна кута відбиття не спостерігалася (Рис. 4)

На кожному етапі здійснювали промивання комірки ФР. У разі нанесенні кожного наступного робочого розчину спостерігалася зміна резонансного кута, що свідчить про закріплення шару Ag на поверхні перетворювача та можливість використання даної методики для виявлення *S. typhimurium* в розчинах.

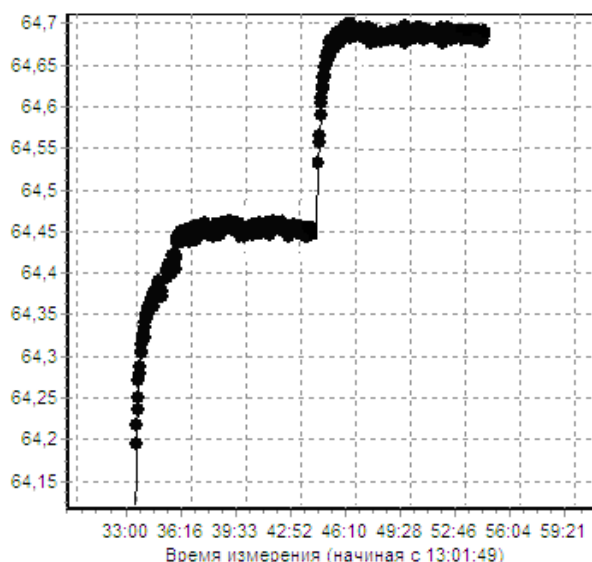


Рис. 4. Сенсорограма біосенсору «Plasmonotest» при визначенні *S. typhimurium* в модельних розчинах концентрацією 10^1 – 10^2 клітин/мл.

Результати та обговорення

За визначення *S. typhimurium* у модельних розчинах чутливість біосенсору «Plasmonotest» знаходилася в межах 10^1 – 10^6 клітин/мл (Рис. 5). Було доведено, що на рівень чутливості приладу значною мірою впливає попередня підготовка робочої поверхні, метою якої є створення орієнтованого шару антитіл. В результаті фізичної адсорбції антитіл безпосередньо на золотій поверхні трансдюсера чутливість приладу становила 10^4 - 10^6 клітин/мл (Рис. 6). Та разом з тим, такої чутливості недостатньо для

більшості практичних ситуацій визначення мікроорганізмів. Попередньо нами було проведено визначення *S. typhimurium* у модельних розчинах з використанням імунобіосенсору на базі оптичного модулю Spreeta, еліпсометрії повного внутрішнього віддзеркалення (ЕПВВ) та іон-селективних польових транзисторів (ІСПТ) [19-21]. Необхідно зазначити, що за допомогою імунобіосенсору «Plasmonotest» було досягнуто вищої чутливості за визначення *S. typhimurium* ніж у випадку використання модулю Spreeta, але імунобіосенсори на базі ЕПВВ та ІСПТ продемонстрували значно вищу чутливість, що знаходилася в межах декількох клітин. Разом з тим, досягти покращення рівня чутливості приладу можна використовуючи для аналізу моноклональні антитіла.

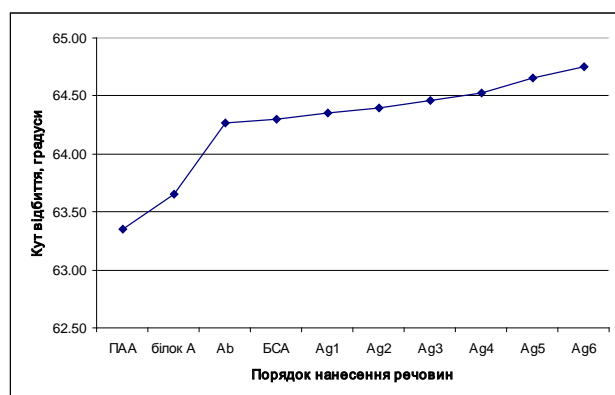


Рис. 5. Діаграма аналізу розчинів *S. typhimurium* з використанням біосенсору «Plasmonotest» (Ag – ряд модельних розчинів *S. typhimurium* від 10^1 – 10^6 клітин/мл).

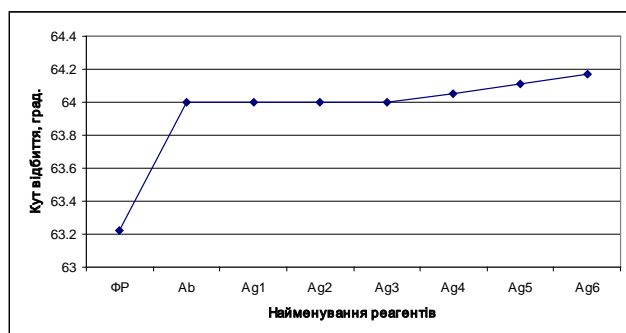


Рис. 6. Діаграма аналізу розчинів *S. typhimurium* з використанням біосенсору «Plasmonotest» без попередньої підготовки трансдюсера (Ag – ряд модельних розчинів *S. typhimurium* від 10^1 – 10^6 клітин/мл).

Таблиця 1.
Порівняння чутливості імуних обіосенсорів при визначенні концентрації *S. typhimurium* в модельних розчинах.

№ п/п	Тип імуного біосенсору	Рівень чутливості	Діапазон чутливості
1	ППР, проміжні шари – поліелектроліт, білок А)	$10^3 - 10^4$ кліт./мл	$10^3 - 10^7$ кліт./мл
2	ППР, проміжні шари – поліелектроліт, білок G)	$2 \times 10^2 - 10^3$ кліт./мл	$2 \times 10^2 - 10^7$ кліт./мл
3	ППР, проміжні шари – додекантіол, білок А)	$5 \times 10^3 - 10^4$ кліт./мл	$5 \times 10^3 - 10^7$ кліт./мл
4	ППР, проміжні шари – меркаптодеканова кислота, білок G (Oh Yuung-Keum та ін., 2004)	10^2 кліт./мл	$10^2 - 10^9$ кліт./мл
5	Віасоре, розгалуджені декстрини (Gertie та ін., 2003)	1.7×10^3 кліт./мл	-
6	ППР, проміжний шар – неутравідін (Son та ін., 2007)	10^5 кліт./мл	-
7	ППР, пряма фізична адсорбція (Кубова та ін., 2001)	1×10^6 кліт./мл	-
8	ППР (Lan Yu-bin та ін., 2008)	1×10^6 кліт./мл	-

Також особливу увагу необхідно приділити методам попередньої підготовки зразків, особливо тим, що спрямовані на концентрування бактеріальних клітин у розчині. Концентрування проб можна добитися, попередньо пропустивши розчин через афінну колонку або за використання магнітних частинок.

Нами було здійснено порівняння отриманих результатів з описаними в літературі даними по визначенню *S. typhimurium* у модельних розчинах з використанням ППР імуносенсорів. Yuung-Keun Oh та ін. описали імуносенсор на основі ППР для визначення *S. typhimurium*, використовуючи білок G і отримали чутливість приладу в межах $10^2 - 10^9$ кліт./мл [25]. Vokken та ін. використовували Віокоре для визначення представників роду *Salmonella*. Мінімальна кількість клітин для отримання чіткого сигналу відповідала $1,7 \times 10^3$ кліт./мл [26]. У таблиці

ці 1 представлені результати визначення *S. typhimurium* в модельних розчинах з використанням біосенсорів на основі ППР, отримані іншими авторами.

Висновки

Наші дослідження були спрямовані на розробку високочутливого та специфічного біосенсору для визначення *Salmonella typhimurium* у модельних розчинах. Було проаналізовано залежність чутливості біосенсору від попередньої підготовки робочої поверхні трансдюсера. Запропонована методика підготовки поверхні дозволила значно підвищити чутливість приладу порівняно з прямою адсорбцією препаратів на поверхню трансдюсера. Чутливість імунобіосенсору «Plasmonotest» знаходилася в межах 10^1 – 10^6 клітин/мл, тоді як максимальна чутливість ППР імунобіосенсорів за умов інших методик попередньої підготовки поверхні трансдюсера становить 10^2 клітин/мл. Порівнюючи з результатами, отриманими іншими авторами за визначення *S. typhimurium* з використанням біосенсорів на базі ППР, можна зробити висновок, що прилад демонструє на порядок вищу чутливість. Підвищення чутливості імунобіосенсору «Plasmonotest» для максимально ефективного практичного використання може забезпечити використання моноклональних антитіл для проведення аналізу, а також попереднє концентрування антигену в досліджуваних зразках шляхом використання афінних колонок або магнітних частинок.

Список літератури

1. Зарицкий А.М., Сальмонеллезы.– К.: Здоровья, 3 1988. – 160с.
2. D. Ivnitski, I. Abdel-Hamid, P. Atanasov, E. Wilkins Biosensors for detection of pathogenic bacteria // J. Biosensors & Bioelectronics, 1999, v 14, pp. 599–624.
3. Thi Thu Hao Van, George Moutafis et al., Detection of Salmonella spp. in Retail Raw Food Samples from Vietnam and Characterization of Their Antibiotic Resistance // Applied and environmental microbiology – 2007. Vol. 73, No. 21 pp. 6885–6890.
4. M. Isabel Pividori, Arben Merkoci, Jordi Barbe, Salvador Alegret, PCR-Genosensor Rapid Test for Detecting Salmonella // J Electroanalysis, 2003, №15, P. 23-24.
5. Cox N.A., Salmonella methodology update / Poultry Science – 1988. 67, pp. 921-927.
6. Westerman R.B., He Y., Keen J.E., Littlelike E.T., Kwang J., Production and characterization of monoclonal antibodies specific for the lipopolysaccharide of Escherichia coli O157. // J Clin Microbiol. – 1997, 35(3) pp. 679-84.
7. Kim M.L., Slauch J.M., Effect of acetylation (O-factor 5) on the polyclonal antibody response to Salmonella typhimurium O-antigen. // FEMS Immunol Med Microbiol. – 1999, 26(1) pp. 83-92.
8. Son J. R., Kim G., Kothapalli A., Morgan M.T., Ess D., Detection of Salmonella enteritidis using a miniature optical surface Plasmon resonance biosensor // J. Physics, 2007, v. 61, pp. 1086-1090.
9. Betty G. M., Gortemaker J., Goverde R. L. J., Knapen F., Bergwerff A.A., Surface plasmon resonance (BIACORE) detection of serum antibodies against Salmonella enteritidis and Salmonella typhimurium // J. Immunol. Methods, 2002, v. 266, pp. 33-44.
10. Budnyk M., Frolov Yu., Kurlov S., Lebedyeva T., Minov Yu., Sutkovyy P., Shpylovyy P., Modeling and Data Processing for Thin-Film Optical Sensors // Proc. of the 6-th IEEE Intern.Conf. on Intelligent Data Acquisition and Advanced Computing Systems: Technology and Applications IDAACS'2011, Sept. 15-17, 2011, Prague, Czech Republic, V.1, P.119-124.
11. Пирогова Л.В., Нагаєва Л.І., Стародуб М.Ф., Експресна діагностика лейкозу великої рогатої худоби за допомогою імуноного сенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу

- cy // Укр. Біохім. Журнал 2002, т 74. № 3, с.88-92.
12. Starodub N. F., Starodub V. M., Ultrathin Multilayer Polyelectrolyte Films on Gold, Novel Processes and Control Technologies in the Food Industry: NATO Proceedings // Ed. F. Bozoglu et al. — Cluver Acad. Publ., 2001. — P. 63–94.
 13. Starodub N.F., Nabok A.V., Starodub V.M. et al, Immobilization of biocomponents for immune optical sensor // Ukr. Biochem. Zhurn. 2001. 73, № 4. С 55-64.
 14. Nakamura R., Muguruma H., Ikebukuro K. et al., A plasma polymerized film for surface plasmon resonance immunosensing // Anal. Chem. — V. 69. — 1997. — P. 4649–4652.
 15. Пирогова Л.В. Стародуб М.Ф., Імобілізація імуноглобулінів за допомогою лектинів при створенні імуних сенсорів на основі поверхневого плазмонного резонансу // Укр. Біохім. Журнал 2002, т 74. № 2, с. 45-50.
 16. Иммунология. Под. Ред. У. Пола в 3-х томах. 1987. Т.1. С. 255-313.
 17. Стародуб М. Ф., Стародуб В. М., Біосенсори: витоки, досягнення і перспективи // Укр. біохім. журн. — 2002. — Т. 74, №4–5.— С. 147–163.
 18. Вершигора А.Е., Общая иммунология. — К.: Выща школа, 1990 г, 736 с.
 19. Starodub N., Ogorodnijchuk Ju.O., Sitnik Ju.A., Slishik N.F., Biosensors for the control of some toxins, viral and microbial infections to prevent actions of bioterrorists. In Proceeding: “Portable Sensors for the Rapid Determination of Chemical and Biological Agents and other Weapons of Terrorism”, Ed. D. Nicolelies, NATO Ser. For Peace, Ser. B – Physics and Biophysics, Chapter 5, 2012, pp. 95-117.
 20. Starodub N.F., Ogorodnijchuk J. O., Immune Biosensor Based on the ISFETs for the Express Determination of *Salmonella typhimurium* // J. Electroanalysis, 24, 3, 600-606, 2012.
 21. Starodub N.F., Ogorodnijchuk J.O., Efficiency of immune biosensor based on total internal reflection ellipsometry at the determination of *Salmonella* // Abstract of Chemical Sensors, May 21, 2012, DOI 10.5162?IMCS2012/P1.1.24.
 22. Starodub N.F., Ogorodnijchuk Yu.A. et al., Optical immune biosensor based on the surface Plasmon resonance for the control o *Salmonella tiphimurium* level in solutions // Scientific Herald, 151, Ser. “vet. Med. And Biosafety of foods”, 2010, vol 2, pp 183–189
 23. Starodub N.F., Ogorodnijchuk Yu.A., Romanov V.A., Optical immune biosensors based on SPR for the detection of *Salmonella typhimurium* // “The SENSOR+TEST 2011-conference”, Nurenberg, 2011, P7.
 24. Oh B.K., Lee W., Kim Y.K., Lee W. H., Choi J.W. Surface plasmon resonance immunosensor using self-assembled protein G for the detection of *Salmonella paratyphi*. Journal of Biotechnology 111 (2004) 1–8.
 25. Oh, B.K., Kim, Y.K., K.W. Park, Lee, W.H., Choi, J.W., Surface plasmon resonance immunosensor for the detection of *Salmonella typhimurium* // Biosensors and Bioelectronics, 2004, v.19, pp. 1497–1504.
 26. Gertie C.A.M. Bokken, Ronald J. Corbee, Frans van Knappen, Aldert A. Bergwerff, Immunochemical detection of *Salmonella* group B, D and E using an optical surface plasmon resonance biosensor // J FEMS Microbiology Letters, 2003, v. 222 pp 75 – 82.
 27. Kubova V., Karasova L. et al. Detection of foodborne pathogens using surface plasmon resonance diosensors // Sens Actuators B Chem, 2001, 74: 100-105.
 28. Yu-bin Lan, Shi-zhou Wang, Yongguang Yin, W. Clint Hoffmann, Xianzhe Zheng. Using a Surface Plasmon Resonance Biosensor for Rapid Detection of *Salmonella Typhimurium* in Chicken Carcass // Journal of Bionic Engineering, 2008, vol. 5, no. 3, pp. 239-246.