การพัฒนาวิธีตรวจสอบอย่างรวดเร็วสำหรับเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร*Campylobacter jejuni*

Development of Rapid Detection Method for Foodborne Pathogenic Bacteria *Campylobacter jejuni*

พัชราภรณ์ ท้วมแก้ว[1*]และปรียาพร เกิดฤทธิ์[2]

Phatcharaporn Thuamkaew[1*]andPreeyapornKoedrith[2]

[1*]*นักศึกษาปริญญาโท หลักสูตรเทคโนโลยีที่เหมาะสมและนวัตกรรมเพื่อความมั่นคงด้านสิ่งแวดล้อมคณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดลถนนพุทธมณฑลสาย 4 ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม 73170.*

[2]*อาจารย์ประจำหลักสูตรเทคโนโลยีที่เหมาะสมและนวัตกรรมเพื่อความมั่นคงด้านสิ่งแวดล้อมคณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพุทธมณฑลสาย 4 ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม 73170.*

[1*]*Graduate student in Master of Science Appropriate Technology and Innovation for Environmental Security, Facultyof Environmental and Resource Studies, MahidolUniversity, Phuttamonthon 4 Road, Salaya, NakhonPathomThailand73170*

[2]*Lecturer in Master of Science Appropriate Technology and Innovation for Environmental Security, Facultyof Environmental and Resource Studies, Mahidol University, Phuttamonthon 4 Road, Salaya, NakhonPathomThailand 73170*

[*]*Corresponding author, E mail: snowb4954@gmail.com*

บทคัดย่อ

Campylobacter spp.เป็นเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคอุจจาระร่วงในคนที่สำคัญของประเทศกำลังพัฒนา โดยสามารถติดเชื้อจากการปนเปื้อนของ*Campylobacter*ในผลิตภัณฑ์อาหารเช่นสัตว์ปีกสุกร โค และกระบือ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาชุดทดสอบอย่างรวดเร็วสำหรับการตรวจสอบ *C. jejuni* โดยใช้เทคนิคชีววิทยาโมเลกุลร่วมกับอนุภาคนาโนแมกเนติก (Magnetic Nanoparticles; MNPs) ซึ่งมีการเติมหมู่ฟังก์ชัน *N*-methylimidazolium (MIm-MNPs) เพื่อจับกับแบคทีเรียเป้าหมาย *C.jejuni*ในการศึกษานี้ใช้วิธี PCR ทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อเชื้อ *C.jejuni* ร่วมกับวิธี dot blot hybridization ในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว จากผลการทดลองพบว่า โดยวิธี dot blot มีความไวในการตรวจสอบ (sensitivity) เท่ากับ 25นาโนกรัมดีเอ็นเอต่อไมโครลิตร ซึ่งจากผลการศึกษานี้คาดว่าจะสามารถพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อดังกล่าวได้อย่างว่องไว รวดเร็ว มีประสิทธิภาพและเชื่อถือได้ เพื่อช่วยลดความเสียหายและอุบัติการณ์การติดเชื้อที่เกิดจากการปนเปื้อนของ *C. jejuni* ในอาหาร อีกทั้งใช้เป็นเครื่องมือในการป้องกันการติดเชื้อต่อ C. *jejuni* ที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของประชาชนได้

คำสำคัญ:*แคมไพโรแบคเตอร์เจจูไน,N-methylimidazolium,อนุภาคนาโนแมกเนติก, พีซีอาร์, ดอทบลอทไฮบริดไดเซชัน*

Abstract

Campylobacter spp. can cause food borne diarrheal illness and have been recognized as an important cause of morbidity and mortality among children in developing countries. The primary source of human campylobacter infections is contaminated food products, as the bacteria are normal flora in livestock, including poultry, pigs and cattle. Therefore, this research is aimed at developing rapid tests for detecting *C. jejuni* by using molecular biology-based techniques. Magnetic Nanoparticles (MNPs) were functionalized with *N*-methylimidazolium ion (so called MIm-MNPs) acting as capturing component in the testing system would be subjected to examine for capturing capacity with target bacterium *C. jejuni*. The combinations of molecular methods of PCR and dot blot wereused forbacterial detection. Using PCR-based method,*C. jejuni*-specific primers of interest were initially tested for their specificity. After MIm-MNPs based bacterial capture and PCR-based amplification of target DNA, the dot blot-based method showed a detection sensitivity of 25 ng/ul for sensing amplified PCR product using a biotin-labelled probe for hybridization. This result of study would be useful for further development of a rapid sensitive reliable detection method in order to reduce the damage and infectious incidence caused by the contamination of *C. jejuni* in food, as well as to be used as a preventive tool toward *C. jejuni* infection and related diseases from food contamination.

Keywords:*C. jejuni, N-methylimidazolium, Ferromagnetic nanoparticles, Polymerase chain reaction, Dot blot hybridization.*

1. บทนำ

ในปัจจุบันมีความระมัดระวังเกี่ยวกับการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคในอาหารที่ทำให้เกิดอาการป่วยและเป็นสาเหตุของการตายได้ *Campylobacter*spp. เป็นสาเหตุของโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันที่พบบ่อยในคนโดยการศึกษาทางระบาดวิทยาพบว่าการสัมผัสหรือบริโภคสัตว์ปีกนั้นเป็นสาเหตุหลักในการก่อโรค Campylobacteriosisโดยมาจากการได้รับเชื้อ*C. jejuni* และ*C. coli* (FSAI, 2002) และเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อในห่วงโซ่อาหารและมีความสัมพันธ์กับการก่อโรคในคน (Coker, 2000) ดังนั้นจึงต้องมีการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยโรคให้รวดเร็วทันท่วงที เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคได้ ซึ่งวิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *C. jejuni*ตามมาตรฐานดั้งเดิม (conventional method) ประกอบด้วยหลายขั้นตอน คือ การเพิ่มจำนวนเชื้อการทำให้บริสุทธิ์ การเขี่ยเชื้อเพื่อดูลักษณะโคโลนี การตรวจสอบการติดสีแกรมและลักษณะเซลล์ การเพาะเชื้อบนอาหารแข็งหลังจากทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์ การทดสอบทางชีวเคมี การทดสอบเพื่อยืนยันผลการทดสอบทางชีวเคมี โดยขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ใช้เวลานานและสิ้นเปลืองแรงงานในปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคในอาหารที่รวดเร็วและเชื่อถือได้เช่นกัน เช่น LAMP, ELISA, immunomagnetic separation เป็นต้นซึ่งต้องอาศัยเทคโนโลยีที่ทันสมัยโดยเฉพาะอย่างยิ่งเทคโนโลยีชีวภาพ นอกจากนี้สาขาวิชาทางด้าน immunology, molecular biology, automation and computer technology ที่ได้รับการปรับปรุง ย่อมส่งผลเชิงบวกต่อการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ในสาขาวิชาจุลินทรีย์

อาหาร (food microbiology) ให้มีความสะดวก รวดเร็ว ไวต่อการตรวจสอบ และประสิทธิภาพดียิ่งขึ้นดังนั้นจึงต้องการวิธีที่รวดเร็วในการตรวจหาชนิดและปริมาณของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคโดยใช้เทคโนโลยีชีวโมเลกุลร่วมกับอนุภาคนาโนแมกเนติกเพื่อใช้ตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่ให้ผลรวดเร็ว ซึ่งคาดว่าจะสามารถป้องกันและเฝ้าระวังการระบาดได้ดีขึ้น ทั้งยังสามารถใช้ในการประเมินคุณภาพทางแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ ได้เพื่อเพิ่มความมั่นใจในความปลอดภัยของอาหารและระบบตรวจติดตามเฝ้าระวังโรค

2. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจหา *C. jejuni* ได้อย่างรวดเร็วโดยใช้เทคโนโลยีชีวโมเลกุลร่วม (PCR &Dot blot hybridization) กับอนุภาคนาโนแมกเนติกซึ่งถูกเติมหมู่ฟังก์ชั่นที่เหมาะสมต่อการจับเชื้อ *C. jejuni*

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

C. jejuni ATCC 33560เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ mCCDA โดยบ่มเพาะเชื้อที่ 42 องศาเซลเซียสภายใต้บรรยากาศที่มีออกซิเจนต่ำ (10% CO_2, 5% O_2 และ 85% N_2)

3.2การจับเซลล์แบคทีเรียด้วยอนุภาคนาโนแมกเนติกที่เติมหมู่ฟังก์ชัน*N*-methylimidazolium(MIm-MNPs)

ทำการดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวอนุภาคให้เกิด chloropropyl group โดยนำอนุภาค MNPs (S.M. Chemical co. Ltd, Thailand) มาทำให้กระจาย (disperse) ใน toluene เติม 3 -chloropropyltrimethoxysilane ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง magnetic stirrer จากนั้นทำการ refluxed ที่อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ล้างอนุภาคด้วย toluene และนำไปอบที่ 60 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แล้วทำการดัดแปลงพันธะเคมีที่ผิวอนุภาคให้เกิด N-methylimidazolium โดยนำอนุภาค chloropropyl modified MNPs ที่ผ่านการดัดแปลงพันธะเคมีแล้วมาทำให้กระจาย (disperse) ใน toluene และ N-methylimidazole เขย่าสารให้เข้ากัน ทำการ refluxed ที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ล้างอนุภาคด้วย methanol และ deionized water นำไปอบที่ 50 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมงนำ MIm-MNPs มาทำให้กระจายตัวในน้ำด้วยเครื่องกำเนิดคลื่นความถี่สูง (ultrasonicator) นาน 15 นาที ก่อนนำไปใช้จับเซลล์แบคทีเรียในระบบบัฟเฟอร์ (Wang et al., 2014) โดยเริ่มจากการเจือจางแบคทีเรียในบัฟเฟอร์ PBS ซึ่งเทียบเท่ากับ mcfarland standard no. 0.5 และเติม MIm-MNPs ปริมาตร 25 ul ในแต่ละหลอดการทดลอง นำไปบ่มที่อุณภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างอนุภาคด้วยบัฟเฟอร์PBST 1 ครั้งและ PBS 2 ครั้งๆละ 10 นาที จากนั้นนำแบคทีเรียที่เกาะติดบนอนุภาคนาโนแมกเนติกมาสกัดดีเอ็นเอต่อไป

3.3การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อ *C. jejuni* ที่ถูกจับได้บนอนุภาคนาโนฯ ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.2 มาทำปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย ตัวอย่างดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร, 10X PCR buffer 2.5 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์CI1 (5’ CTT GCT TGT GAC TCT TAA CAA TG 3’) และ CI2(5’ CTG ATA AGG GTG AGG TCA CAA GT 3’)อย่างละ 0.5 ไมโครลิตรและ 50 mM, Taqpolymerase (5u/ul) 0.125 ไมโครลิตรปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบดังต่อไปนี้อุณหภูมิสำหรับแยกสายดีเอ็นเอที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5

นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นใช้อุณหภูมิสำหรับ denaturation, annealing และ extension ที่อุณหภูมิ 95, 60 และ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา1 นาที,30 วินาทีและ 30 วินาที ตามลำดับ จำนวน 35 รอบและใช้อุณหภูมิสำหรับเพิ่มปริมาณขั้นสุดท้ายที่ 72องศาเซลเซียส เป็นเวลา7 นาที จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปแยกแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค 1.5% agarose gel electrophoresis ใน 1X TBE buffer ผ่านกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที จากนั้นตรวจดูแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วย gel documentation

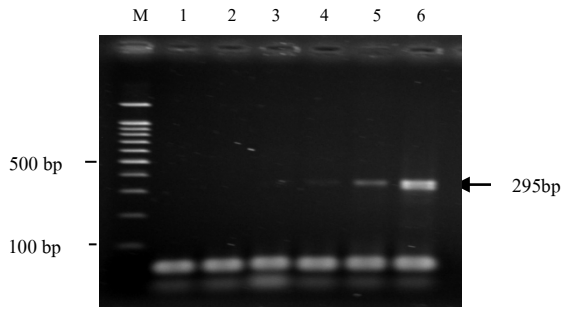
3.4การตรวจสอบปริมาณของ *C. jejuni*ด้วยวิธี Dot blot hybridization

นำ PCR product มาแยกสายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา10 นาที จากนั้นหยดลงบนไนลอนเมมเบรน (Hybond N^+) ที่มีขนาด 1 × 10 เซนติเมตร และตรึงบนเมมเบรนโดยนำไป cross-linked by UV light เป็นเวลา 10 นาที ต่อมานำแผ่นเมมเบรนไป prehybridization ใน Biotin Easy Hyb buffer เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ63 องศาเซลเซียสต้ม biotin-labelled probe ที่อุณหภูมิ95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีแล้วหยดลงบนแผ่นเมมเบรน 1 ไมโครลิตร จากนั้นนำไป hybridization ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 16-18 ชั่วโมงล้างเมมเบรน ด้วย 2x SSC และ 0.1% (w/v) SDS เป็นเวลา5 นาที 2 ครั้ง เขย่าที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย 0.5x SSC และ 0.1% (w/v) SDS นาน 15 นาที 2 ครั้งเขย่าที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส แช่เมมเบรนใน 1x washing buffer เป็นเวลา 5 นาทีโดยเขย่าที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำเมมเบรนไปแช่ใน1x blocking solution เป็นเวลา 30 นาที โดยเขย่าที่อุณหภูมิห้อง แล้วแช่เมมเบรนใน Antibiotin-AP อัตราส่วน 1: 15,000ใน blocking buffer เป็นเวลา 30 นาทีเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ล้างเมมเบรนด้วย washing buffer 2 ครั้งๆละ 15 นาที เขย่าที่อุณหภูมิห้องแล้วแช่เมมเบรนใน 1x detection buffer เป็นเวลา5 นาที เขย่าที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นตรวจหาปริมาณแถบดีเอ็นเอเป้าหมายบนเมมเบรนโดยเติมNBT/BCIP ใน1x detection buffer ในที่ไม่มีแสง

4. ผลการวิจัย

4.1การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของ*C. jejuni* ที่ถูกจับได้บนอนุภาคนาโนฯ ด้วยวิธี PCR

จากการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างเชื้อ *C. jejuni* ที่ถูกตรึงบนอนุภาคนาโนแมกเนติก และนำมาทำการเจือจางในอัตราส่วนต่างๆ แล้วนำมาทำปฏิกิริยา PCR ด้วยยีนที่จำเพาะต่อเชื้อ*C. Jejuni* พบว่าไพรเมอร์ที่ใช้มีความจำเพาะต่อเชื้อ*C. Jejuni* ซึ่งจะเห็นแถบดีเอ็นเอของพีซีอาร์มีขนาด 295bp ที่เจือจางในอัตราส่วนดีเอ็นเอ (เซลล์ *C. jejuni*) 10^5-10^1 cell/ml ตามลำดับ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจได้เท่ากับ 10^3cfu/ml (ภาพที่ 1) และไม่พบแถบดีเอ็นเอพีซีอาร์ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่ใช้เป็นตัวควบคุม



รูปที่ 1 แถบดีเอ็นเอขนาด 295 bp บน agarose gel จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของ *C. jejuni*ที่ถูกจับได้บนอนุภาคนาโนฯ ด้วยวิธี PCR

M: 100bp DNA ladder

2: ดีเอ็นเอ (เซลล์ *C. jejuni*) 10^1 cell/ml

3: ดีเอ็นเอ (เซลล์ *C. jejuni*) 10^2 cell/ml

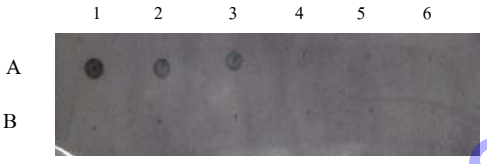
4: ดีเอ็นเอ (เซลล์ *C. jejuni*) 10^3 cell/ml

5: ดีเอ็นเอ (เซลล์ *C. jejuni*) 10^4 cell/ml

6: ดีเอ็นเอ (เซลล์ *C. jejuni*) 10^5 cell/ml

4.2การตรวจสอบปริมาณของ *C. jejuni*ด้วยวิธี Dot blot hybridization

ภายหลังการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อเป้าหมายโดยเทคนิค PCR ทำการตรวจเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว ด้วยเทคนิค dot blot โดยใช้โพรบติดฉลากด้วยไบโอติน (biotin-labelled probe) 1 ng/ul หยดลงบนเมมเบรนที่มีดีเอ็นเอจากพีซีเอาร์ความเข้มข้นต่างๆ กัน (ภาพที่ 2, แถว A) พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถ ตรวจได้เท่ากับ 25 นาโนกรัมดีเอ็นเอต่อไมโครลิตรและไม่พบผลบวกในเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นที่ใช้เป็นตัวควบคุม



รูปที่ 2 sensitivityจากการตรวจสอบปริมาณของ *C. jejuni* ด้วยวิธี Dot blot โดยใช้ biotin-labelled probeที่ความเข้มข้น ดังนี้ แถว A; 1: 300ng/ul; 2:100 ng/ul; 3: 50 ng/ul;4:25 ng/ul; 5: 10ng/ul และ6: 0 ng/ul
แถว B; 1: *E. coli*; 2: *Salmonella*sp; 3: *Enterococcus* sp.; 4: *Staphylococcus aureus*; 5:*Listeria sp.*

5. การอภิปรายผล

จากการทดสอบการจับเซลล์แบคทีเรีย *C. jejuni* ด้วยอนุภาคนาโน MIm-MNPs (พัฒนาจากวิธีของ Wanget al., 2014) แล้วนำแบคทีเรียดังกล่าวที่ถูกตรึงบนอนุภาคนาโนฯ มาสกัดดีเอ็นเอ เพื่อทำ PCR และ Dot blothybridization แสดงให้เห็นว่า สายนิวคลีโอไทด์ของยีนเป้าหมายมีความจำเพาะและสามารถใช้เป็น probe ของยีนเป้าหมายจำเพาะต่อเชื้อ *C. jejuni* (Fontanot et al., 2014) และสามารถตรวจสอบเชื้อก่อโรคดังกล่าวในระบบบัฟเฟอร์ ที่ความเข้มข้นของเซลล์ต่ำสุด25 นาโนกรัมดีเอ็นเอต่อไมโครลิตร โดยข้อดีของการใช้อนุภาคนาโนแมกเนติกคือเมื่อจับเชื้อแล้วสามารถนำมาตรวจ (detection หรือ visualization) ร่วมกับวิธีอื่นๆ เช่น การเพาะเลี้ยงบนอาหารจำเพาะ mCCDA หรือการใช้งานร่วมกับอนุภาคซิลิกานาโนซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวแสดงสัญญาณ (signal reporter) หรือวิธี PCR ทำให้สามารถบ่งชี้เชื้อเป้าหมายที่ปนเปื้อนมากับอาหารได้ (Le Ly Thuy et al., 2012) ในอนาคตชุดตรวจสอบนี้มีความน่าจะเป็นในการพัฒนาต่อยอดโดยนำมาประยุกต์ใช้กับอนุภาค Fluorescent ติดฉลากบนสายนิวคลีโอไทด์ และใช้เป็น reporter/detection probe ได้อย่างรวดเร็ว มีความไวสูงและน่าเชื่อถือ

6. บทสรุป

การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียเป้าหมาย อาศัยหลักการดีเอ็นเอไฮบริดไดเซชัน (DNA hybridization) ด้วยเทคนิค Dot blot ร่วมกับเทคนิค PCR เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจจับโดยทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแบคทีเรียเป้าหมายในขั้นต้นก่อนจะนำมาตรึงบนเมมเบรนที่มีคุณสมบัติเหมาะสม สำหรับการศึกษาการพัฒนาชุดตรวจเชื้อ *C. jejuni* ในระบบบัฟเฟอร์ ทั้งในรูปแบบเชื้อบริสุทธิ์และในสภาพเชื้อผสมนี้จะสามารถช่วยพัฒนาต่อยอดในการตรวจหาเชื้อดังกล่าวทั้งในตัวอย่างจริง เพื่อลดการสูญเสียค่าใช้จ่ายในการผลิตและการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ รวมถึงลดปัญหาการติดเชื้อก่อโรคในอาหารในผู้บริโภคและปัญหาด้านสาธารณสุข

7.กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณรศ. ดร.ประเวทย์ ตุ้ยเต็มวงศ์ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี และรศ.

ดร. ชื่นจิตต์ บุญเฉิดภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้สนับสนุนอุปกรณ์และสถานที่ในการทำวิจัยและ อ.ยอดยศ ศรีตังนันท์ ที่ให้คำแนะนำในการทำวิจัย

8. เอกสารอ้างอิง

Coker, A.O. (2000). Incidence, trends and sources of Campylobacteriosis in developing countries - An overview, pp. 44-48. In: Proceedings of a WHO Consultation of Experts, Copenhagen, Denmark, 21-25 November 2000. Available from: http://www.who.int/emcdocuments/ zoonoses/whocdscsraph20017c.html(2004, June 15)

FSAI (Food Safety Authority of Ireland). (2002). Control of *Campylobacter* species in the food chain. Available from:http://www.fsai.ie/ publications/ report/ Campylobacter_report. pdf (2004, June 15)

Fontanot, M., Iacumin, L., Cecchini, F., Comi, G., Manzano, M. (2014. Rapid detection and differentiation of important Campylobacter spp. in poultry samples by dot blot and PCR. Food microbiology. 43:28-34.

Le Ly ThuyTrama., CuongCaoa., Jonas Høgberga., Anders Wolffb& Dang Duong Banga. (2012). Isolation and detection of *Campylobacter jejuni* from chicken fecal samples by immunomagnetic separation-PCR., Food control. Vol.24, pp. 23-28.

Wang, Y., Deng, M., Jia, L. (2014). N-methylimidazolium functionalized magnetic particles as adsorbents for rapid and efficient capture of bacteria. MicrochimicaActa. 181(11-12):1275-83.