

ỨNG DỤNG KỸ THUẬT MULTIPLEX PCR PHÁT HIỆN GIEN ĐỘC TỐ CỦA VI KHUẨN *BACILLUS CEREUS* TRONG MỘT SỐ THỰC PHẨM CHẾ BIẾN TỪ NGŨ CỐC

NGUYỄN QUỐC ANH, NGUYỄN ÁNH TUYẾT, BÙI THỊ KIM NGÂN,
HÀ THỊ TƯỜNG VÂN, NGUYỄN LAN PHƯƠNG, BÙI THỊ MAI HƯƠNG
Viện Dinh dưỡng

TRẦN THỊ VÂN KHÁNH - Đại Học Y Hà Nội
TRẦN HUY HOÀNG - Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương

TÓM TẮT

Bacillus cereus thuộc nhóm vi khuẩn Gram dương, hình que, có khả năng sinh bào tử hình thành tác nhân gây bệnh. Các độc tố nội ruột của giện *B. cereus* (*bceT*, *nheA*, *hblA*, *hblD*) có thể gây ra các triệu chứng như đau bụng và tiêu chảy. Nghiên cứu được tiến hành trên 103 mẫu thực phẩm có thành phần từ gạo, để xác định mức độ ô nhiễm của vi khuẩn *B. cereus*. Các gen mã hóa độc tính của *B. cereus* (*bceT*, *nheA*, *hblA*, *hblD*) cũng được xác định bằng phương pháp multiplex-PCR. Kết quả cho thấy tỷ lệ các mẫu thực phẩm nhiễm khuẩn *B. cereus* trong nghiên cứu là rất cao (67.9 %), và 41 % tổng số mẫu nhiễm *B. cereus* là ở mức độ $\geq 10^3$ cfu/g, cặp gene *hblA* và *hblD* mã hóa protein HBL, độc tố nội ruột ly giải hồng cầu là phổ biến nhất lần lượt là 67.4 % và 54.3 % các mẫu được phát hiện bởi PCR.

Từ khóa: *Bacillus cereus*.

SUMMARY

Bacillus cereus is Gram-positive, rod-shaped bacteria, capable of spore forming pathogens. The Enterotoxins of *Bacillus cereus* (*bceT*, *nheA*, *hblA*, *hblD*) can cause symptoms such as abdominal pain and diarrhea. The prevalence of *B. cereus* contamination, in a total of 103 samples of cereal-related products was investigated. The genes encoding virulence strain of *B. cereus* (*bceT*, *nheA*, *hblA*, *hblD*) also were determined by multiplex-PCR. Results showed that the proportion of food samples contaminated *B. cereus* in this study was very high (67.9%), and 41% of the total sample of *B. cereus* contamination was at the level of $\geq 10^3$ cfu / g. The duo-genes *hblA* and *hblD* in which are encoding proteins HBL, a heat-labile Enterotoxins were the most prevalent genes.

Keywords: *Bacillus cereus*, cereal-related.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bacillus là nhóm vi khuẩn phân bố rộng rãi trong tự nhiên, được tìm thấy nhiều ở đất, thực vật, động vật và con người. Đa phần các chủng của trực khuẩn *Bacillus* không gây bệnh, tuy nhiên, một số chủng *Bacillus* tiêu biểu như *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* và *Bacillus anthracis* có thể sinh chất độc tính và có thể gây ra các bệnh khác nhau ở động vật và con người.[1][2][3]

Bacillus cereus thuộc nhóm vi khuẩn Gram dương, hình que, có khả năng sinh bào tử hình thành tác nhân gây bệnh. Ngộ độc thực phẩm có nguồn gốc từ

Bacillus thường xảy ra do sự tồn tại của các nội bào tử vi khuẩn khi thức ăn được nấu chín không đủ nhiệt độ. [4] Khi nhiệt độ nấu thức ăn thấp hơn hoặc bằng 100°C sẽ cho phép một số bào tử *B. cereus* sống sót. [5] Sau đó nếu thực phẩm không được bảo quản đúng cách trong tủ lạnh, các nội bào tử này sẽ có khả năng tái kích hoạt và nảy mầm để chuyển thành tế bào sinh dưỡng. [6] Quá trình nảy mầm và tăng trưởng của các nội bào tử *B. cereus* thường xảy ra ở nhiệt độ từ 10-50°C. Khi tăng trưởng, một số dòng *B. cereus* mang gene gây bệnh sẽ sản xuất độc tố bao gồm 2 thể chính Emetic Toxin (gây nôn mửa) và Enterotoxins (gây tiêu chảy). [7]

Về mặt dịch tễ, các dòng vi khuẩn *B. cereus* chứa genes sản xuất enterotoxins gây tiêu chảy được tìm thấy trên nhiều loại thực phẩm khác nhau. Ngộ độc nhóm này có biểu hiện là đau bụng và tiêu chảy, thời gian ủ bệnh là từ 8 – 16 giờ. Do thời gian ủ bệnh dài và triệu chứng lâm sàng tương tự, ngộ độc thực phẩm *B. cereus* mang gene độc tố ruột (enterotoxins) có thể bị nhầm lẫn với ngộ độc do *Clostridium perfringens*. [8]

Ngộ độc thể tiêu chảy do độc tố ruột thường xuất phát từ ba độc tố quan trọng và phổ biến nhất: độc tố ly giải hồng cầu không chịu nhiệt (Hbl), độc tố không ly giải hồng cầu chịu nhiệt (Nhe) và độc tố ruột T (*bceT*). Các gene mã hóa protein Nhe/HBL /*bceT* nằm trên nhiễm sắc thể của vi khuẩn. [9]

HBL bao gồm một thành tố protein B (*hblA* - 37,8 kDa), và 2 thành tố protein L: L1 (*hblD* - 38,5 kDa) và L2 (43,5 *hblC* - kDa). Sự tồn tại của 3 protein là không đồng nhất và phân bố không đều ở các chủng *B. cereus* khác nhau, và sự có mặt của cả 3 protein này là cần thiết để độc tố nội ruột có tối đa độc tính. [10] Tương tự HBL, NHE bao gồm các 3 thành phần: NheA (41 kDa), NheB (39,8 kDa), và NheC (36,5 kDa) và sự có mặt của cả 3 gene này là cần để độc tố nội ruột có tối đa được lực. [10] Độc tố ruột T được phân lập từ dòng B-4ac và trọng lượng phân tử được là 41-kDa polypeptide, mã hóa trong gene *bceT* (2,9 kb). [10]

Phương pháp truyền thống để xác định ô nhiễm *B. cereus* trong thực phẩm là nuôi cấy và phân lập vi khuẩn trong các môi trường dinh dưỡng. Ngoài ra, việc phát hiện độc tố ruột của *B. cereus* cũng đã được tiến hành bằng các phương pháp miễn dịch như ELISA. Một cách tiếp cận khác để phát hiện *B.*

cereus trong thực phẩm là phương pháp PCR đa môi (multiplex-PCR). Ưu điểm của phương pháp này so với các phương pháp truyền thống là nhanh và đặc hiệu đối với các gene sinh độc tố nội ruột, qua đó sẽ giúp việc kiểm tra thực phẩm bị ô nhiễm cũng như chẩn đoán nguyên nhân các vụ ngộ độc thực phẩm nhanh và chính xác hơn. Các nghiên cứu so sánh cũng cho thấy, ứng dụng PCR đa môi trong xác định gene gây sinh độc tố nội ruột của *B. cereus* cho kết quả tương đương và có thể thay thế các phương pháp truyền thống.

Ngộ độc thực phẩm vẫn đang diễn biến phức tạp và là một vấn đề cấp bách có tính xã hội ở Việt Nam. Phân tích nguyên nhân từ 2.1470 vụ NĐTP ghi nhận trong giai đoạn từ 2002–2010, một trong những nguyên nhân ngộ độc thực phẩm chính là do ô nhiễm vi sinh vật (chiếm 30.7 % số vụ). Do khuẩn *B. cereus* phân bố rộng khắp trong môi trường, vì thế đây là nhóm vi khuẩn quan trọng khi nhìn từ khía cạnh VSTP. Trên thực tế cũng đã ghi nhận nhiều trường hợp ngộ độc tập thể có liên quan đến *B. cereus* xảy ra gần đây. Hiện ở Việt Nam cũng chỉ có một vài nghiên cứu đánh giá về mức độ ô nhiễm và độc tính của *B. cereus* trong thực phẩm.

Nghiên cứu này khảo sát mức độ ô nhiễm của *B. cereus* trong các sản phẩm có nguồn gốc từ ngũ cốc trên thị trường Hà Nội. Nghiên cứu cũng đánh giá mức độ phổ biến của các gene mã hóa protein độc tố nội ruột (Nhe/HBL /bceT) trong các sản phẩm này.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu và phương pháp lấy mẫu

103 mẫu thực phẩm (nhóm 1: bún- bánh phở, Nhóm 2: Cơm, Nhóm 3: bánh dày-bánh bao) được lựa chọn ngẫu nhiên từ các chợ trên địa bàn Hà Nội. Tối đa 3 mẫu bất kỳ được lựa chọn ở cùng 1 chợ.

Khi tiến hành thu thập mẫu, các tiêu chuẩn sau được sử dụng:

Tối thiểu 100g/mẫu và là mẫu đại diện

Được đựng vào các túi vô trùng.

Các mẫu được giữ trong tủ lạnh ở -200°C nếu chưa tiến hành xét nghiệm ngay và tiến hành xét nghiệm sớm nhất có thể.

2. Trang thiết bị.

Máy luân nhiệt PCR, Máy điện di ngang, Máy soi gel và chụp ảnh tự động, Máy li tâm, Tủ lạnh sâu: -30°C, Tủ ấm 37°C, Máy đồng nhất mẫu, Lò vi sóng, Lò hấp ỨC, Túi đồng nhất mẫu, Pipet định mức, đầu côn các loại, ống PCR, ống eppendorf loại 1,5 ml, 0,2ml, ống Falcon 15ml, găng tay, giấy thấm.

3. Sinh phẩm và hóa chất.

Chủng vi khuẩn

- Chủng *B. cereus* chuẩn ATCC4342 có chứa 4 gene độc tố (bceT, nheA, hblA, hblD) được sử dụng làm chứng dương

Chủng *E. coli* không mang gen độc tố làm chứng âm.

Hóa chất.

- Các dung dịch đệm phosphat (PBS) pH: 7.4, Môi trường LB lỏng, Thạch LB, Dung dịch tách chiết DNA khuôn mẫu: TE (Tris-EDTA), Dung dịch MgCl₂-2 25mM, Taq DNA polymerase. Hỗn hợp dNTPs 2,5mM, Nước siêu sạch. Đệm tra mẫu: Gel Loading Buffer, Thạch điện di (electrophoresis agarose), Dung dịch đệm điện di TAE, Ethidium bromide, Thang chuẩn DNA (DNA ladder)

Các cặp mồi (Primers):

Bảng 1: Các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu này

| Tên mồi | Trình tự (5'-3') | Gen | Kích thước (bp) | Tài liệu tham khảo |
|---------|-----------------------------------|------------------------------------|-----------------|--|
| bceT-F: | CGT ATC GGT CGT TCA CTC GG | Độc tố nội ruột T | 622 | Genbank No: D17312 Jackson & Cs, 2008 |
| bceT-R: | GTT GAT TTT CCG TAG CCT GGG | | | |
| nheA-F: | TAC GCT AAG GAG GGG CA | Độc tố ruột không ly giải hồng cầu | 499 | Genbank No: Y19005 Jackson & Cs, 2008 |
| nheA-R: | GTT TTT ATT GCT TCA TCG GCT | | | |
| hblA-F: | GTG CAG ATG TTG ATG CCG AT | Độc tố ruột ly giải hồng cầu | 329 | Genbank No: L20441 Jackson & Cs, 2008 |
| hblA-R: | ATG CCA CTG CGT GGA CAT AT | | | |
| hblD-F: | AAT CAA GAG CTG TCA CGA AT | Độc tố ruột ly giải hồng cầu | 429 | Genbank No: U63928 Jackson & Cs, 2008 |
| hblD-R: | CAC CAA TTG ACC ATG CTA AT | | | |

4. Phương pháp.

Các loại sản phẩm có nguồn gốc từ gạo (bún, bánh phở, cơm, cơm nắm, cơm hộp, cơm rang, bánh dày, bánh bao, xôi) được kiểm tra định lượng *B. cereus* theo quy trình nuôi cấy phân lập chuẩn và được kiểm tra phát hiện gen độc tố Enteroxins bằng phương pháp PCR đa môi.

Phân lập *B. cereus* từ các mẫu thực phẩm

B. cereus trong các mẫu thực phẩm được phân lập dựa vào Quy trình của US FDA. Quy trình được tóm tắt như sau: Cân 10 gam mẫu thực phẩm +90 ml dung dịch đệm PBS cho vào túi đồng nhất mẫu. Đồng nhất mẫu bằng máy đồng nhất mẫu thu được dung dịch mẫu có độ pha loãng 10⁻¹. Pha loãng mẫu đồng nhất thêm 2 đậm độ pha loãng là 10⁻² và 10⁻³. Hút 0,1 ml dung dịch đồng nhất mẫu của các độ pha loãng 10⁻¹, 10⁻² và 10⁻³ lên các đĩa thạch MYP mỗi đậm độ loãng 2 đĩa. Khuẩn lạc *B. cereus* mọc trên các đĩa thạch MYP có màu hồng phấn. Đếm số lượng khuẩn lạc có màu hồng phấn mọc trên đĩa MYP và tính số khuẩn *B. cereus* trong 1 gram thực phẩm. Xác định các đặc

tính sinh hóa của các *B. cereus* phân lập được theo qui chuẩn.

Phương pháp tách chiết ADN

ADN được chiết dựa theo phương pháp được mô tả bởi Jackson và Cs. Phương pháp được tóm tắt như sau: Dung dịch đồng nhất mẫu được trộn với dung dịch LB theo tỷ lệ 1: 9 và được lắc ở 37°C trong vòng 4-5 giờ. Hút 2 ml dung dịch bề mẫu thực phẩm vào ống eppendorf 2 ml. Ly tâm 10000 vòng/ trong 10 phút. Bỏ dịch phía trên, cho thêm 200 µl dung dịch TE (Tris-ETDA). Và tiến hành ủ ở 98°C trong 10 phút. Ly tâm 1000 vòng/trong 10 phút, hút dịch nổi sang ống eppendorf mới, giữ ở -20°C để làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR.

Xác định gen độc tố *B. cereus* từ chủng chuẩn

Qui trình cấy chuẩn chủng chuẩn (ATCC 4342) và tách ADN được làm theo mô tả trong.

Kỹ thuật PCR đa mồi

Pha loãng khuôn mẫu DNA bậc 10 trong nước siêu sạch từ dung dịch đã được tách ADN ban đầu để tạo ra các nồng độ pha loãng là 10⁻¹; 10⁻²; 10⁻³; 10⁻⁴; 10⁻⁵; 10⁻⁶ và 10⁻⁷. Sử dụng ADN đã được pha loãng làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR tương ứng.

Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng 25µl: 10X buffer: 3 µl; 2,5mM dNTPs: 2.4 µl; 25 mM MgCl₂: 3 µl; mỗi (mỗi nồng độ 20 µM) bceT-F, bceT-R, nheA-F, nheA-R, hblA-F, hblA-R, hblD-F, hblD-R: 1µl cho mỗi loại; 2,5 U Taq polymerase: 0,3µl; Nước siêu sạch: 5,3µl và ADN khuôn mẫu: 3µl.

Chu trình nhiệt chạy PCR: 94°C: 5 phút; (94°C: 15 giây; 55°C: 45 giây; 72°C: 2 phút) X 30 chu kỳ; và 72°C: 10 phút, giữ ở 4 °C.

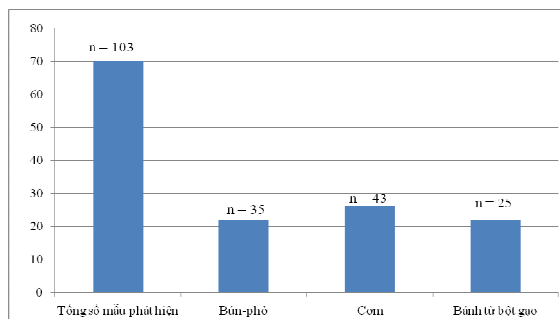
Điện di sản phẩm PCR trên thạch Agar 1,5% trong đệm TAE 1 X ở hiệu điện thế 100V trong 30 phút. Nhuộm gel bằng dung dịch Ethidiumbromide trong 5 phút, rửa gel trong 5 phút. Chụp gel, dựa vào thang DNA chuẩn để phân tích kết quả.

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

1. Mức phổ biến của độ ô nhiễm *Bacillus cereus* trong các sản phẩm có nguồn gốc từ gạo.

Trong 103 mẫu thực phẩm được tiến hành phân tích bằng phương pháp nuôi cấy, đã xác định 70/103 mẫu phát hiện *Bacillus cereus* (chiếm 67.9 %). Trong đó 22/35 mẫu ở nhóm Bún-phở (chiếm 62.8 %); 26/43 mẫu ở nhóm Cơm (chiếm 60.4 %); 22/25 (chiếm 88%) mẫu ở nhóm bánh - đã được phát hiện ô nhiễm vi khuẩn *Bacillus cereus*.

Đáng chú ý là 41 % tổng số mẫu nhiễm *Bacillus cereus* ở mức độ $\geq 10^3$ cfu/g (bảng 2). Đây là ngưỡng nguy hiểm vì theo nghiên cứu của Kramer và Gilbert (1989), cho thấy khi liều vi khuẩn *B. cereus* trong thực phẩm dao động ở mức 1,2 x 10³ - 10⁸ cfu /gsẽ gây đau bụng và tiêu chảy.



Biểu đồ 1: Số lượng các mẫu phát hiện *Bacillus cereus* trong các nhóm thực phẩm (N =103)

Phát hiện kiểu gene mang độc tố *Bacillus cereus* trong các sản phẩm có nguồn gốc từ gạo

Trong 103 mẫu thực phẩm được phân tích, 46 mẫu được xác định là bị ô nhiễm *B. cereus* và có chứa 1 trong 4 loại gene mã hóa protein độc chất (NheA / HblA/HblD /BceT);

Kết quả cho thấy không có sự khác biệt giữa kết quả phát hiện của 2 phương pháp đối với các mẫu âm tính với *B. cereus*. Điều này phân nào chứng tỏ tính đặc hiệu của các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu này đối với các gene độc tố của *B. cereus*. Tuy nhiên, ở các mẫu dương tính với *B. cereus* nhưng có mức ô nhiễm dưới 10³ cfu/g, thì PCR chỉ phát hiện được 10 trên tổng số 26 mẫu phát hiện được bằng phương pháp nuôi cấy. Điều này có ý nghĩa là hoặc các khuẩn *B. cereus* không chứa một trong các gene (NheA / HblA/HblD /BceT); hoặc giới hạn phát hiện của phương pháp là thấp hơn 10³ cfu/g. Với các mẫu có ô nhiễm *B. cereus* lớn hơn 10³ cfu/g, phương pháp PCR phát hiện được 36 mẫu so với 42 mẫu của phương pháp nuôi cấy. Điều này chứng tỏ có thể 6 mẫu nhiễm *B. cereus* mà không phát hiện được bằng PCR không chứa 1 trong các gene NheA / HblA/HblD /BceT. Về mặt xác xuất thống kê điều này đúng với tổng quan của Arun K. Bhunia, cho rằng sự phân bố của các gene mã hóa enterotoxins của *B. cereus* là đa dạng và phân bố không đều. [10]

Bảng 2: Kết quả phát hiện gene mang độc tố *Bacillus cereus* bằng phương pháp PCR đa mồi

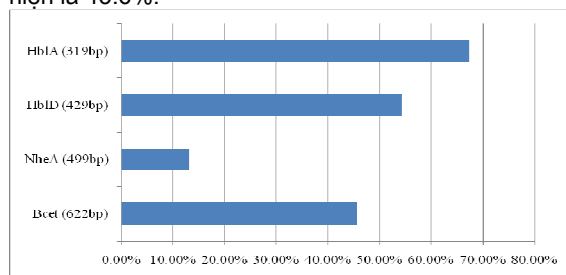
| Nhóm / Số lượng mẫu | Kết quả | | | | |
|---------------------------|----------|-----|------------|----------|--|
| | Âm tính | | Dương tính | | |
| | Nuôi cấy | PCR | Nuôi cấy | PCR* | |
| Bún - Phở N= 35 | 13 | 13 | 12 10 | 6 8 | < 10 ³ cfu/gr ≥ 10 ³ cfu/g |
| Cơm N = 43 | 17 | 17 | 9 15 | 3 12 | < 10 ³ cfu/gr ≥ 10 ³ cfu/gr |
| Bánh từ bột gạo N = 25 | 22 | 22 | 5 17 | 1 16 | < 10 ³ cfu/gr ≥ 10 ³ cfu/gr |
| Tổng số N = 103 | 52 | 52 | 26 42 | 10 36 | < 10 ³ cfu/gr ≥ 10 ³ cfu/gr |

*Mẫu có từ 1 gene độc tố trở nên là mẫu dương tính với kỹ thuật PCR

2. Phân bố và tần suất xuất hiện của các kiểu gene mang độc tố *Bacillus cereus*.

Kết quả của nghiên cứu cho thấy tần suất xuất hiện của các gene HblA/HblD độc tố nội ruột ly giải hồng cầu lần lượt là 67.4 % và 54.3 %. Đây là 2 gene phổ biến nhất trong các mẫu phát hiện bằng PCR. Theo nhiều nghiên cứu, HBL độc tố nội ruột ly giải hồng cầu bao gồm một thành tố protein B mã hóa bởi gene hblA, và 2 thành tố protein L: L1 mã hóa bởi gene hblD và L2 mã hóa bởi gene hblC [1][2][10]. Sự tồn tại của 3 gene này là cần thiết để tối đa độc tính. Tuy nhiên, theo Anja Kotiranta thì sự tồn tại của 2/3 gene có thể là chỉ thị của việc tạo thành HBL có độc tính. [20]

Gene NheA mã hóa 1 protein thành tố của độc tố nội ruột không ly giải hồng cầu (NHE) có tần suất xuất hiện thấp nhất (13 %). Trong khi đó gene (Bcet) mã hóa protein độc tính nội ruột T có tần suất xuất hiện là 45.6%.



Biểu đồ 2: Tần suất xuất hiện của các kiểu gene mang độc tố *Bacillus cereus* được phát hiện bằng PCR

KẾT LUẬN

Bài báo này trình bày kết quả khảo sát ban đầu về mức độ ô nhiễm của *Bacillus cereus* trong các sản phẩm có nguồn gốc tự gạo trên thị trường Hà Nội. Kết quả cho thấy tỷ lệ các mẫu thực phẩm nhiễm khuẩn *B. cereus* trong nghiên cứu là rất cao (67.9 %), và đáng lo ngại hơn 41 % tổng số mẫu nhiễm *Bacillus cereus* là ở mức độ $\geq 10^3$ cfu/g, ngưỡng giới hạn đủ để *Bacillus cereus* sinh độc tố.

Nghiên cứu cũng ứng dụng thành công phương pháp sinh học phân tử tiên tiến, multiplex-PCR để xác định 4 gene sinh độc tố của *B. cereus* (bceT, nheA, hblA, hblD). Kết quả bước đầu cho thấy, cặp gene hblA và hblD mã hóa protein HBL, độc tố nội ruột ly giải hồng cầu là phổ biến nhất.

Trong các nghiên cứu tiếp theo, nhóm nghiên cứu sẽ tiếp tục khảo sát ô nhiễm *B. cereus* và các kiểu phân bố gene của độc tố *B. cereus* trên các đối tượng mẫu khác. Nhưng nghiên cứu này có thể cung cấp những thông tin chính xác và cần thiết trong việc hoạch định chính lược ATTP hay cơ sở của các nghiên cứu đánh giá nguy cơ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Stenfors Arnesen LP, O'sullivan K, and Granum PE (2006) Food poisoning potential of *Bacillus* strains from Norwegian dairies. *Int J Food Microbiol* 116, 292-296.
2. Rowan NJ, Deans K, Anderson JG, Gemmell CG, Hunter IS, and Chaithong T (2001) Putative virulence factor expression by clinical and food isolates of *Bacillus* spp. after growth in reconstituted infant milk formulae. *Appl Environ Microb* 67, 3873-3881.
3. Turnbull PCB (1996). *Bacillus*. In: *Baron's Medical Microbiology* (Barron S et al., eds.) (4th ed.). Univ of Texas Medical Branch. ISBN 0-9631172-1-1. (via NCBI Bookshelf).
4. Roberts, T. A.; Baird-Parker, A. C.; Tompkin, R. B. (1996). *Characteristics of microbial pathogens*. London: Blackie Academic & Professional. p. 24. ISBN 0-412-47350-X
5. McKillip JL (2000). "Prevalence and expression of enterotoxins in *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp., a literature review". *Antonie Van Leeuwenhoek* 77 (4): 393-9. doi:10.1023/A:1002706906154. PMID 10959569.
6. Davis, Judi Ratliff; Lawley, Richard; Davis, Judy; Laurie Curtis (2008). *The food safety hazard guidebook*. Cambridge, UK: RSC Pub. p. 17. ISBN 0-85404-460-4. Retrieved 2010 Nov 25.
7. "Bacillus cereus". *Todar's Online Textbook of Bacteriology*.
8. Ehling-Schulz M, Fricker M, Scherer S (2004). "Bacillus cereus, the causative agent of an emetic type of food-borne illness". *Mol Nutr Food Res* 48 (7): 479-87. doi:10.1002/mnfr.200400055. PMID 15538709.
9. Guinebretière MH, Broussolle V, Nguyen-The C (August 2002). "Enterotoxigenic Profiles of Food-Poisoning and Food-Borne *Bacillus cereus* Strains". *J. Clin. Microbiol.* 40 (8): 3053-6. doi:10.1128/JCM.40.8.3053-3056.2002. PMC 120679. PMID 12149378.
10. Arun K. Bhunia. "Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis", Springer Publication (2008), XVIII, p.136