

Budapesti Corvinus Egyetem
Élelmiszertudományi Kar
Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszék



**ÉLELMISZER-BIZTONSÁGI SZEMPONTBÓL JELENTŐS BAKTÉRIUMOK
KIMUTATÁSA, PCR-ALAPÚ MOLEKULÁRIS AZONOSÍTÁSA ÉS TÍPIZÁLÁSA**

Belák Ágnes

Doktori értekezés tézisei

Budapest

2009

A doktori iskola


megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

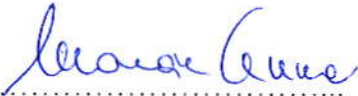
tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: Fodor Péter, DSc
Egyetemi tanár
Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar
Alkalmazott Kémia Tanszék

Témavezető: Maráz Anna, CSc
Egyetemi tanár
Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar
Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszék

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, a műhelyvita során elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés védési eljárásra bocsátható.


.....
Az iskolavezető jóváhagyása


.....
A témavezető jóváhagyása

1. BEVEZETÉS

Az élelmiszer-biztonság napjaink egyik legfontosabb kérdése. A fogyasztók növekvő igénye a biztonságos, jó minőségű és egészséges élelmiszerek iránt fokozott kihívást jelent a termelők, a gyártók és a forgalmazók számára, ugyanakkor jelentős feladatot ró a hatóságokra, valamint a tudományos élet résztvevőire. Az elmúlt években az élelmiszer-előállítás jelentős növekedésével a higiéniai szabályok be nem tartása, a nem megfelelő hőkezelés vagy hűtés, illetve egyéb technológiai és más tényezőre visszavehető okokból kifolyólag számos élelmiszer eredetű megbetegedés történt. Ennek hátterében az esetek többségében mikrobiológiai szennyeződés áll.

A kórokozó mikroorganizmusok kimutatása és vizsgálata hagyományos módszerekkel hosszú múltra tekint vissza, azonban ezen eljárások igen idő- és munkaigényesek, ezért számos olyan új gyorsmódszert fejlesztettek ki az elmúlt évtizedekben, amelyek alkalmazása a rutinszerű vizsgálatok során is széles körben alkalmazható. A gyors vizsgálati eljárások közül a nukleinsav alapú molekuláris biológiai módszerek egyre szélesebb körben, egyre nagyobb teret hódítanak. A polimeráz láncreakción (PCR-en) alapuló technikák mára már nemcsak a kutató laboratóriumok nélkülözhetetlen és rendszeresen alkalmazott eljárásai közé tartoznak, hanem az élelmiszerek vizsgálatával foglalkozó mikrobiológiai laboratóriumok körében is egyre nagyobb népszerűsége tesztek szert. Az élelmiszerekben előforduló patogén mikroorganizmusok azonosítására és törzs szintű jellemzésére (tipizálására) kidolgozott nukleinsav alapú molekuláris biológiai módszerek alkalmazása jelentősen hozzájárulnak ezen mikrobák eredetének és terjedési útvonalának feltérképezéséhez.

Az élelmiszer-biztonsági szempontból lényeges kórokozó baktériumok közül a kampilobakterek által okozott megbetegedések száma igen jelentős. Magyarországon a termofil *Campylobacter* fajok által okozott fertőzések aránya jóval magasabb az Európai Unió átlagánál, azonban a bejelentett esetek száma az utóbbi időben csökkenő tendenciát mutat. A kampilobakterek által okozott humán megbetegedések több mint 95 %-át *C. jejuni* törzsek okozzák, míg a többi esetért elsősorban a *C. coli* fajba tartozó törzsek a felelősek. A *Campylobacter* fajok egyértelmű azonosítása azonban bonyolult, mivel lassan növekvő, igényes szervezetek. Elkülönítésükre korábban csak fenotípus alapú módszereket alkalmaztak, az így elvégzett identifikálás azonban gyakran téves eredményekhez vezethet. Ez is hozzájárult ahhoz, hogy megnőtt az igény az olyan, elsősorban DNS alapú módszerek kidolgozása és alkalmazása iránt, amelyek segítségével a humánpatogén *Campylobacter* fajok kimutatása,

azonosítása, tipizálása, valamint terjedési útvonaluk feltérképezése gyorsan és hatékonyan megvalósítható.

Humán egészségügyi szempontból szintén jelentős baktériumok az *Escherichia coli* faj Shiga-toxin termelő (STEC) törzsei, amelyek számos virulencia faktoruk által, továbbá toxin termelésük révén súlyos megbetegedéseket okozhatnak. A STEC csoporton belül az enterohemorragiás *E. coli* (EHEC) törzsek kimutatása az általuk előidézett vérzéses bélgyulladás, vesegyulladás, illetve vérzéses húgyúti fertőzés miatt kiemelt jelentőséggel bír. Az elmúlt években számos olyan PCR-alapú diagnosztikai módszert dolgoztak ki, amelyek célszekvenciái különböző virulencia gének voltak, mint például a Shiga toxin, az intimin, vagy akár az enterohemolizin gének. Az *Escherichia coli* faj törzseinek azonban élelmiszer-biztonsági vonatkozásain kívül élelmiszer-higiéniái szempontból is nagy a jelentőségük, mivel élelmiszerek esetén a friss, fekáliás szennyezettség indikátorai, így a faj különböző törzseinek élelmiszerekből történő kimutatása igen jelentős.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkám során célul tűztem ki élelmiszer-biztonsági szempontból jelentős baktériumok (termofil *Campylobacter* és *Escherichia coli* törzsek) kimutatását, azonosítását és jellemzését, ezáltal hozzájárulva a kórokozók élelmiszerekből történő gyorsabb detektálásához, diverzitásának és epidemiológiájának pontosabb meghatározásához.

A megvalósítandó feladatok és a fő lépések az alábbiak voltak:

1. Élelmiszer-biztonsági szempontból jelentős baktériumok (*Escherichia coli* és *Campylobacter* spp.) izolálása élelmiszerekből.
2. Az *E. coli* izolátumok molekuláris biológiai módszerekkel történő azonosítása és tipizálása. Az *Escherichia coli* fajba tartozó izolátumok pontos azonosításához, illetve a faj O157:H7 szerotípusú törzseinek kimutatásához duplex PCR módszer kidolgozása; az izolált baktériumok azonosítása a kidolgozott PCR-alapú módszer segítségével, illetve az izolátumok tipizálása RAPD-PCR eljárással.
3. Élelmiszer-biztonsági szempontból jelentős termofil *Campylobacter* (*C. coli* és *C. jejuni*) fajok esetén a szelektív dúsítás hatásának vizsgálata, amelynek során célt volt a vizsgált törzsek szaporodási görbéjének meghatározása, valamint az eltérő fajtól származó törzsek szaporodási képességének vizsgálata szelektív dúsítóban történő együttes tenyésztés során.

4. Eltérő eredetű *Campylobacter* izolátumok azonosítása, majd az izolátumok vizsgálatára alkalmas PCR-alapú molekuláris biológiai módszerek adaptálása, fejlesztése és alkalmazhatóságának összehasonlítása diszkriminációs képességük alapján.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A munkám során vizsgált törzsek egy részét élelmiszerekből, illetve élelmiszerek környezetéből izoláltam, míg számos *Campylobacter* és *Escherichia coli* törzs humán, illetve állati eredetű volt.

Az *E. coli* faj pontos azonosításához és a faj O157:H7 törzseinek kimutatásához meghatározott szerotípusú, elsősorban Shiga toxin-termelő törzsek segítségével **duplex PCR módszert** dolgoztam ki, majd ezen eljárást alkalmaztam az általam izolált törzsek faji hovatartozásának megerősítéséhez. Az izolátumok jellemzéséhez használt **RAPD-PCR analízis** során eltérő szekvenciájú miniszatellit és random primereket alkalmaztam.

A baromfi eredetű humánpatogén *Campylobacter coli* és *C. jejuni* törzsek **szelektív dúsítási vizsgálata** során BIOSCREEN készülékkel meghatároztam az egyes törzsek szaporodási görbéit, majd az EN ISO 10272-1:2006 szabvány szerint Bolton-féle szelektív dúsító folyadékot alkalmazva vizsgáltam az izolátumok egymáshoz viszonyított szaporodási képességét 41,5 °C-os tenyésztési hőmérsékleten. A vizsgálatok során a szelektív dúsító folyadékot a két faj egy-egy törzsének eltérő arányú sejtszámmal való oltását követően inkubáltam, majd az inkubációs idő leteltével a szelektív táptalajon kifejlődött telepeket hippurát hidrolízis teszttel azonosítottam. Az eredmények statisztikai értékeléséhez Student-féle t-tesztet alkalmaztam.

Az eltérő eredetű *Campylobacter* izolátumok **faj szintű azonosításához** szakirodalomban publikált primereket alkalmaztam, amelyeket a négy legjelentősebb termofil *Campylobacter* faj típus- és referencia törzseivel teszteltem.

A faj szinten pontosan meghatározott *Campylobacter* izolátumok **tipizálásához** hat különböző PCR-alapú módszert alkalmaztam. A 16S rDNS RFLP vizsgálata során négy különböző restriktív endonukleázt használtam az amplikonok hasításához, míg három enzimet alkalmaztam a flagellin fehérjét kódoló *flaA* gén RFLP vizsgálatához. A *flaA* és *flaB* gének közötti intergénikus szekvencia (IGS) denaturáló grádiens gélelektroforézissel (DGGE) történő vizsgálata során először merőleges DGGE módszerrel meghatároztam az optimális denaturálószer koncentrációt, majd párhuzamos DGGE analízissel kerestem a különbségeket

az egyes izolátumok közel azonos méretű fragmentumai között. A heteroduplex mobilitási analízis (HMA) során a teszt és referencia törzsek intergénikus régiójának denaturálását, majd hibridizálását követően a homoduplex és az esetlegesen létrejött heteroduplex molekulák elektroforetikus mozgékonyágát vizsgáltam. Az izolátumok RAPD-PCR analíziséhez három random primert alkalmaztam. Valamennyi vizsgálati módszer esetén a kapott eredmények alapján szoftverek segítségével dendogramokat készítettem és meghatároztam az eljárások diszkriminációs képességét a Simpson-féle diverzitási indexek kiszámításával. Az izolátumok *fla*-IGS szekvenciájának pontos nukleotid sorrendjét meghatározva értékeltem a DGGE és heteroduplex mobilitási vizsgálatok eredményeit.

4. EREDMÉNYEK

4.1. *Escherichia coli* törzsek izolálása és molekuláris biológiai vizsgálata

Élelmiszerekből, illetve élelmiszerek környezetéből összesen 22 feltételezeten az *E. coli* fajba tartozó izolátumot gyűjtöttem. Az izolátumok faji hovatartozásának pontos meghatározásához, továbbá a faj O157:H7 szerotípusú törzseinek kimutatásához egyetlen PCR reakcióban megvalósítható eljárást kívántam alkalmazni. Ehhez a szakirodalomban publikált primer párok segítségével olyan duplex PCR módszert dolgoztam ki, amely optimálásához és alkalmazhatóságának teszteléséhez nagyszámú, elsősorban STEC és EHEC törzset vizsgáltam. Az optimálás során meghatározott primer koncentráció a fajspecifikus primerek esetében 0,25 μ M, míg a szerotípusra specifikus primereknél 0,125 μ M volt. A 22 izolátum optimált duplex PCR módszerrel kapott eredményei alapján elmondható, hogy valamennyi baktérium az *E. coli* fajba tartozott, azonban mivel egyetlen izolátum sem adott jelet az O157:H7 szerotípusra specifikus primer párral megállapítható, hogy a faj ezen patogén szerotípusa nem fordult elő az általam izolált törzsek között. Az izolátumok tipizálásához különböző szekvenciájú random primerek tesztelését követően három primert választottam ki, amelyekkel elvégezve a törzsek jellemzését megállapítottam, hogy a vizsgált *E. coli* izolátumok nagyfokú változatosságot mutattak, továbbá, hogy a különböző *E. coli* törzsek jelenléte, túlélése és terjedési útvonala igen jelentős.

4.2. A szelektív dúsítás hatása termofil *Campylobacter* törzsekre

A nagyszámú enterális megbetegedés kialakulásáért felelős termofil *Campylobacter* fajok között a dúsítás során esetlegesen fellépő versengés meghatározásához első lépésben elkészítettem a vizsgált nyolc törzs (négy *C. coli* és négy *C. jejuni*) szaporodási görbéjét a korai stacioner fázis eléréséhez szükséges idő megállapítása céljából. A meghatározás során azt tapasztaltam, hogy 41,5 °C-os inkubációs hőmérsékletet alkalmazva mindkét faj törzsei 18 óra után elérték ezt a szakaszt, azonban lényeges eltéréseket figyeltem meg a lappangási fázisok időtartamai között. Az azonos szaporodási fázisban lévő sejtekkel elvégzett dúsítási vizsgálatok jelentős részében a szelektív dúsítóba párokban oltott kampilobakterek közül a *C. coli* törzsek jobban szaporodtak a *C. jejuni* izolátumokhoz képest, csupán egyetlen kombinációban lehetett a *C. jejuni* jobb szaporodási képességét kimutatni. Student-féle t-teszttel megvizsgálva a dúsítás hatását a vizsgált izolátumokra megállapítottam, hogy a kezdeti és a dúsítást követő *C. jejuni* és *C. coli* sejtszám arányok jelentősen különböztek, vagyis a dúsítás során valamelyik vizsgált izolátum mindig jobban szaporodott a vele párban beoltott, másik fajhoz tartozó törzshöz képest. Mivel az élelmiszer és egyéb minták esetében csupán öt vagy annál kevesebb telep visszaizolálása történik a szelektív agarokról, vizsgálati eredményeim azt mutatják, hogy *C. jejuni*-t és *C. coli* kevert tenyészetét tartalmazó minta esetén a *C. coli* nagyobb valószínűséggel lesz kimutatható, mint a *C. jejuni*, így következtetéseink a domináns *Campylobacter* fajt tekintve helytelenek lehetnek.

4.3. *Campylobacter* izolátumok vizsgálata PCR-alapú molekuláris módszerekkel

A különböző eredetű *Campylobacter* izolátumok azonosításához szakirodalomban publikált specifikus primer párokat választottam. A vizsgált 55 izolátumból 24 a *C. jejuni*, míg 31 a *C. coli* fajba tartozott. A faj szinten pontosan meghatározott izolátumok molekuláris vizsgálatához alkalmazott 16S rDNS-RFLP módszerről megállapítottam, hogy nem alkalmas a *C. jejuni* és *C. coli* törzsek molekuláris jellemzésére, amelyre nagyon kis diverzitási indexe is utalt. A FlaA fehérjét kódoló *flaA* gén RFLP vizsgálata az izolátumok törzs szinten való elkülönítésére alkalmasnak bizonyult; a módszer Simpson-féle diverzitási indexe 0,989 volt. A *fla*-IGS párhuzamos DGGE analízissel történő vizsgálatához a 20-40 %-os denaturáló komponens koncentráció bizonyult alkalmasnak, az izolátumok tipizálásával kapott eredmények alapján azonban megállapítottam, hogy a *fla*-IGS DGGE eljárás a *flaA*-RFLP módszerhez képest kevésbé diszkriminatív technika. A heteroduplex mobilitási vizsgálat

során szinte valamennyi izolátum képzett heteroduplexeket a típus/referencia törzsekkel, ami a vizsgált, mintegy 180-200 bázispár hosszúságú DNS darabok szekvencia polimorfizmusára utal. A heteroduplex analízis Simpson-féle diverzitási indexe 0,872 volt, amely tükrözi a módszer alkalmazhatóságát az egyes törzsek jellemzésére, faj alatti elkülönítésére, azonban az eljárás a DGGE módszerhez hasonlóan faji azonosításra nem alkalmas. A RAPD-PCR vizsgálat a kiválasztott három primer együttes alkalmazásával a törzsek tipizálásán túl lehetőséget adott a *Campylobacter* fajok egyértelmű elkülönítésére is.

A *fla*-IGS bázissorrendjének direkt szekvenálással történő vizsgálata során kapott eredményeimet összehasonlítva a heteroduplex mobilitási vizsgálat és a DGGE módszerrel kapott eredményeimmel megállapítottam, hogy a két módszer rövidebb génszakaszok közötti szekvencia különbségek kimutatására jól alkalmazható, tipizálásra azonban csak korlátozottan.

Ismereteim szerint a szakirodalmakban nem lelhetők fel olyan adatok, amelyek szerint hazai forrásokból származó *Campylobacter* izolátumok tipizálását több különböző PCR-alapú molekuláris biológiai módszerrel korábban elvégezték volna, így a munkám során kapott eredmények a magyarországi *Campylobacter jejuni* és *C. coli* fajba tartozó törzsek jellemzésére vonatkozóan újdonságnak tekinthetők.

4.4. Az eredmények hasznosítási és továbbfejlesztési lehetőségei

Az alacsony infekciós dózissal jellemezhető termofil *Campylobacter* fajok kimutatása egy komplex élelmiszer mátrixból vagy egy klinikai mintából versengő mikrobióta mellett is megvalósítható szelektív dúsítás folyamán. Az epidemiológiai és zoonózis vizsgálatok szempontjából azonban nem lényegtelen, hogy egy mintából, amely *C. coli* és *C. jejuni* törzseket egyaránt tartalmaz, melyik faj lesz kimutatható abban az esetben, ha a feltételezett alacsony sejtszám miatt szelektív dúsítást kell alkalmazni. A dolgozatomban bemutatott munka folytatásaként további kísérleteket elvégezve élelmiszerminták, illetve a kompetitív mikrobióta és más *C. jejuni/C. coli* törzsek bevonásával a jelenség 'in vivo' körülmények közötti előfordulását is érdemes lenne megvizsgálni.

Az enterohemorragiás *E. coli* (EHEC) törzsek közül elsősorban az O157:H7 és az O157:H szerotípusú törzsek azonosítása az általuk okozott igen súlyos megbetegedések miatt igen jelentős. Az *Escherichia coli* faj, valamint az EHEC és egyes Shiga toxin-termelő *E. coli* (STEC) törzsek detektálására kidolgozott duplex PCR módszer alkalmazása az iparban és a

diagnosztikai laboratóriumokban egyaránt nagy előnyt jelenthet a termékek friss, fekáliás szennyezettségének kimutatása, illetve élelmiszer-biztonsági szempontból történő megítélése szempontjából. Mivel az EHEC törzsek infekciós dózisa kicsi és az élelmiszer esetleges fertőzöttsége nagy veszélyt jelent a fogyasztóra nézve, ezért különösen fontos az élelmiszer fertőzöttségének vagy patogén mentességének gyors és megbízható kimutatása. A vizsgált célszekvenciákra (*malB* és *hlyA*) specifikus próbák tervezésével és az eljárás további optimalizálásával olyan duplex real-time PCR reakciót lehetne kifejleszteni, amelynek segítségével az *E. coli* törzsek detektálása valós időben történhetne meg.

A termofil *Campylobacter* fajok, illetve törzsek azonosítása és tipizálása, valamint terjedési útvonaluk feltérképezése megfelelő molekuláris biológiai módszerekkel fontos feladatunk. Az emberi megbetegedéseket okozó törzsek pontos identifikálása elsősorban a klinikai mikrobiológiában jelentős, mivel a betegség kezelésére alkalmazható antibiotikum típusa függ a kiváltó fajtól. A két faj, valamint a fajok törzseinek elkülönítése továbbá azért is fontos, mert egyes *C. jejuni* törzsek igen súlyos szövődményekkel járó idegrendszeri megbetegedéseket is okozhatnak, míg a *C. coli* törzsek kevésbé hozhatók összefüggésbe súlyos klinikai tünetek kialakításával. Ugyancsak fontos annak pontos feltérképezése, hogy a két faj milyen eredetű élelmiszerekkel kerül be az élelmiszerláncba, mivel így a zoonózisokkal kapcsolatosan is pontosabb információk állnak rendelkezésre, és ez megkönnyíti az ellenük való védekezést. Fontos lenne a két vizsgált termofil *Campylobacter* fajon kívüli egyéb fajok kimutatására hasonlóan megbízható és gyors PCR-alapú technikákat kifejleszteni, mivel ezek hiányában pontos faji identifikálásuk - főként a rutin vizsgálatok esetében - és jellemzésük nehezen valósítható meg.

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

(1) Kidolgoztam az *E. coli* faj és annak O157:H7 szerotípusának együttes kimutatására alkalmas duplex PCR módszert, amelynek során az izolátumok gyors és pontos azonosítását két specifikus primer pár segítségével, egyetlen PCR reakcióban lehet megvalósítani. A módszer segítségével a friss, fekáliás szennyezettségre utaló *E. coli* és az élelmiszer-biztonsági szempontból igen jelentős EHEC (enterohemorragiás *Escherichia coli*) törzsek mellett néhány szintén fontos STEC (Shiga toxin-termelő *E. coli*) törzs is kimutatható.

- (2) Összehasonlítva különböző *Campylobacter jejuni* és *C. coli* törzsek szaporodási képességét a Bolton féle szelektív dúsítás során megállapítottam, hogy a *C. coli* törzsek a dúsítás alatt az esetek többségében gyorsabban szaporodnak, mint a *C. jejuni* törzsek, ezért az élelmiszervizsgálat során alkalmazott szelektív dúsítást követő faji identifikálás a két faj együttes előfordulása esetén hamis eredményekhez vezethet.
- (3) Az általam vizsgált *Campylobacter* izolátumok *flaA* és *flaB* gének közötti intergénikus nukleotid szekvenciáját összehasonlítva jelentős eltéréseket találtam az egyes törzsek között. Kimutattam, hogy a szekvencia polimorfizmusok mögött egyedi nukleotid eltérések, valamint néhány tíz bázispárnyi inszerciók, illetve deléciók állnak. Ezen intergénikus szekvencia DGGE (denaturáló grádiens gélelektroforézis) analízise, valamint a korábban még nem alkalmazott heteroduplex mobilitási vizsgálata az izolátumok hasonló szintű elkülönítését tette lehetővé, ami a módszerek megfelelő érzékenységére utal egy adott gén polimorfizmusának vizsgálata esetén.
- (4) A Simpson-féle diverzitási index meghatározásával összehasonlítottam a *Campylobacter coli* és *C. jejuni* izolátumok tipizálására alkalmazható PCR-alapú molekuláris módszereket. Megállapítottam, hogy diszkriminációs képesség szempontjából mindkét faj tipizálására legalkalmasabb eljárás a RAPD-PCR analízis. Ezt követi a *flaA* gén RFLP analízise, amely mind a *C. coli*, mind pedig a *C. jejuni* törzsek tipizálására jól alkalmazható eljárásnak bizonyult. Eredményeim szerint a *flaA*-IGS szekvencia tipizálás a *Campylobacter jejuni* esetében kiváló, míg a *C. coli* esetében elfogadható diszkriminációs képességgel rendelkezik, ezért a gyakorlat számára általános tipizálási módszerként javaslom. A *flaA*-IGS DGGE (denaturáló grádiens gélelektroforézis) és *flaA*-IGS HMA (heteroduplex mobilitási vizsgálat) eredményezették a legkisebb, azonban a gyakorlat szempontjából még kielégítő diszkriminációs indexet.
- (5) A kapott tipizálási eredményeket főkomponens analízissel kiértékelve megállapítottam, hogy annak ellenére, hogy az alkalmazott molekuláris tipizálási módszerek nem eredményeztek a két faj identifikálására alkalmazható specifikus mintázatokat, a főkomponens analízis során a két fajhoz tartozó izolátumok mégis eltérő csoportokba kerültek. Ez azt jelzi, hogy a tipizálás során vizsgált genomszekvenciák alapján az azonos fajhoz tartozó törzsek nagyobb genom szintű hasonlóságot mutatnak egymáshoz képest, mint az eltérő faj törzseihez viszonyítva.

6. PUBLIKÁCIÓS TEVÉKENYSÉG

FOLYÓIRATCIKKEK

IF-es folyóirat cikk

Majoros, L., Kardos, G., **Belak, A.**, Maraz, A., Asztalos, L., Csánky, E., Barta, Z. and Szabó, B. (2003) Restriction enzyme analysis of ribosomal DNA shows that *Candida inconspicua* clinical isolates can be misidentified as *Candida norvegensis* with traditional diagnostic procedures. *Journal of Clinical Microbiology* **41**: 5250-5253. (IF/2006: 3,445)

Senses-Ergul, S., Agoston, R., **Belak, A.**, Deak, T. (2006) Characterisation of some yeasts isolated from foods by traditional and molecular tests. *International Journal of Food Microbiology* **108**: 120-124. (IF/2006: 2,608)

Nem IF-es folyóirat cikk (magyar)

Belák, Á., Deák, T. (2007) Gyors mikrobiológiai meghatározó módszerek fejlődése az elmúlt öt évben. *Élelmezési ipar* 61 (7):203-205.

Belák, Á., Deák, T. (2007) A molekuláris módszerek újabb lehetőségei. *Ásványvíz, üdítőital, gyümölcsle* 8 (2): 24-26.

KONFERENCIA KIADVÁNYOK

Magyar nyelvű (abstract)

Belák Á., Maráz A. (2002) Takarmányok jellemző élesztőbiótájának diverzitása (A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2002. évi Nagygyűlése, Balatonfüred, Absztraktkönyv, 13. oldal)

Belák Á., Kiss O., Kiss R., Maráz, A. (2003) Állati és humán eredetű *Campylobacter* törzsek szerotipizálása és molekuláris analízise („Lippay János-Ormos Imre-Vas Károly” Tudományos Ülésszak, Budapest, Absztraktkönyv, 136. oldal)

Belák Á., Maráz A. (2003) Élesztőgombák izolálása takarmányból és identifikálásuk molekuláris módszerekkel (26. Országos Tudományos Diákköri Konferencia, Kaposvár, Absztraktkönyv)

Belák, Á., Kiskó, G., Mohácsiné Farkas Cs., Kun Sz., Rezessyné Szabó J., Maráz A. (2004) A kompetitív mikrobiota vizsgálata bifidobaktériummal erjesztett sárgarépalében (A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2004. évi Nagygyűlése és a X. Fermentációs Kollokvium, Keszthely, Absztraktkönyv, 10. oldal)

Belák, Á., Maráz A. (2006) A denaturáló gradiens gélelektroforézis (DGGE) és a heteroduplex analízis (HDA) összehasonlítása *Campylobacter* izolátumok elkülönítésében (A

Magyar Mikrobiológiai Társaság 2006. évi Nagygyűlése, Keszthely, *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 53: 250-251.)

Belák, Á., Cenić, S., Gyenge, L., Maráz, A. (2007) Csirkehús romlási baktériumainak vizsgálata és jellemzése. (Hungalimentária 2007 Tudományos Konferencia, Budapest. Absztraktkönyv pp. 72.)

Márta, D., Horváth, K., **Belák, Á.,** Andrassy É., Farkas, J., Maráz, A. (2007) Hűtve tárolt sertéshús romlási folyamatának modellezése és a pszeudomonasz populációk vizsgálata molekuláris módszerekkel. (Hungalimentaria 2007, Budapest, Absztraktkönyv, 75. oldal)

Belák, Á., Cenić, S., Kovács, M., Holczman, Á.N., Maráz, A. (2007) Physiological and biochemical characterisation of spoilage microbiota originated from chicken meat. („Lippay Janos-Ormos Imre-Vas Karoly” Tudományos Ulesszak, Budapest, Absztraktkönyv, 44-45. oldal)

Belák, Á., Mohácsi-Farkas, Cs., Kiskó, G., Rezessy-Szabó, J., Kun, Sz., Maráz, A. (2007) Determination of microbiological safety of bifidobacterium fermented carrot juice with the application of PCR-based molecular techniques. („Lippay János-Ormos Imre-Vas Károly” Tudományos Ülésszak, Budapest, Absztraktkönyv, 42-43. oldal)

Belák, Á., Márta, D., Krascenics, K., Cenić, S., Maráz, A. Physiological characterisation and molecular typing of poultry meat spoiling bacteria. (A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2008. évi Nagygyűlése és a XI. Fermentációs Kollokvium, Keszthely, Absztraktfüzet 10. oldal)

Belák, Á., Maráz, A. (2009) *Campylobacter coli* és *C. jejuni* törzsek szelektív dúsítása és PCR-alapú molekuláris jellemzése. (Hungalimentaria 2009, Budapest, Absztraktkönyv)

Nemzetközi konferencia (abstract)

Belak, A., Kiss, O., Kiss, R. and Maraz, A. (2003) Genotyping and serotyping of *Campylobacter* isolates originated from human and animal sources (EU-RAIN Conference - Catering Food Safety A Responsibility Ignored?, Budapest, Book of abstracts, p.12.)

Maraz, A., **Belak, A.** (2003) Molecular genotyping of *Campylobacter species* by PCR-based techniques. (23rd Food Microbiology Symposium, University of Wisconsin, River Falls, Book of abstracts)

Belak, A., Kiss, O., Kiss, R. and Maraz, A. (2003) PCR-based molecular techniques for detection and typing of *Campylobacter* and *Yersinia* (14th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Balatonfüred, Book of abstracts, p.14.)

Belak, A., Maraz, A. (2003) Molecular characterisation of yeasts isolated from feed (23rd International Specialised Symposium on Yeasts, Budapest, Book of abstracts, p.85.)

Belak, A., Kiss, O., Kiss, R. and Maraz, A. (2003) Detection and typing of *Campylobacter* and *Yersinia* isolates by PCR-based molecular techniques (SAFE Seminar, Brussels, Book of abstracts, p.28.)

Belak, A. and Maraz, A. (2004) Molecular typing of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* by PCR-based RFLP and DGGE analysis of FlaA gene (The 19th International ICFMH Symposium-FoodMicro 2004, Portorož, Book of abstracts, p.163)

Belak, A., Kiss, O., Kiss, R. and Maraz, A. (2004) Molecular identification and typing of *Campylobacter* spp. already characterised by serotyping (2nd Central European Congress on Food, Budapest, Book of abstracts, p.210.)

Belak, A. and Maraz, A. (2005) Molecular detection of *E. coli* 0157:H7 in carrot juice fermented with *Bifidobacterium bifidum* (First Central European Forum for Microbiology – CEFORM, Keszthely, *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* **52**: 13-14., Supplement)

Belak, A. and Maraz, A. (2005) Comparison of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and heteroduplex analysis (HA) for discrimination of *Campylobacter* isolates originated from different sources (25th Food Microbiology Symposium, University of Wisconsin, River Falls, Book of abstracts)

Belak, A., Jørgensen, F., Corry, J.E.L. (2006) Effect of enrichment on types of campylobacter isolated from poultry-related samples (FoodMicro 2006, Bologna, Book of abstracts, p.134.)

Maraz, A., **Belak, A.** (2007) Present status and future prospects in molecular diagnosis of food-born pathogens. (Power of Microbes in Industry and Environment 2007, Zadar, Book of abstracts, p.28.)

Belak, A., Jørgensen, F., Corry, J.E.L. (2007) Comparison of multiplication ability of poultry-related campylobacters during enrichment (15th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest, *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* **54**:13., Supplement)

Belak, A., Cenic, S., Marsi, B., Gyenge, L., Maraz, A. (2008) Physiological and biochemical characterisation of spoilage bacteria originated from chicken meat. (The 21st International ICFMH Symposium - FoodMicro 2008, Aberdeen, Scotland. Program and Abstract Book pp. 465.)