UNIWERSYTET
WARMIŃSKO-MAZURSKI
W OLSZTYNIE

WYDZIAŁ NAUKI O ŻYWNOŚCI

Dyscyplina: nauki rolnicze

Dziedzina: technologia żywności i żywienia

mgr inż. Arkadiusz Zakrzewski

Rozprawa doktorska

Warunki stresowe podczas otrzymywania produktów gotowych do spożycia z ryb i krewetek a możliwość przeżycia oraz odpowiedź komórkowa bakterii z rodzaju *Listeria* sp.

Stress conditions during the preparation of ready-to-eat products from fish and shrimps - the possibility of survival and cellular response of *Listeria* sp.

Praca wykonana w Katedrze Mikrobiologii Żywności, Technologii i Chemii Mięsa

Promotor: dr hab. inż. Anna Zadernowska, prof. UWM

Promotor pomocniczy: dr inż. Wioleta Chajęcka-Wierzchowska

Olsztyn 2024

Olsztyn, 26.03.2024
(miejscowość, data)

Arkadiusz Zakrzewski
(imię i nazwisko kandydata)

technologia żywności i żywienia
(dyscyplina naukowa)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
technologii żywności i żywienia
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak

OŚWIADCZENIE

o samodzielnym napisaniu rozprawy doktorskiej

Świadoma(-y) odpowiedzialności prawnej oświadczam, że rozprawa doktorska pod tytułem „**Warunki stresowe podczas otrzymywania produktów gotowych do spożycia z ryb i krewetek a możliwość przeżycia oraz odpowiedź komórkowa bakterii z rodzaju *Listeria* sp.**" została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona rozprawa nie jest i nie była wcześniej podstawą do ubiegania się o nadanie stopnia naukowego doktora.

Ponadto oświadczam, że treść rozprawy doktorskiej przedstawionej przez mnie do obrony, zawarta na przekazywanym nośniku elektronicznym, jest identyczna z jej wersją drukowaną.

W związku z powyższym oświadczam, że wyrażam zgodę na poddanie rozprawy doktorskiej procedurze antyplagiatowej.

Zakrzewski Arkadiusz

..

podpis kandydata

Olsztyn, 26.03.2024
(miejscowość, data)

dr hab. inż. Anna Zadernowska, prof. UWM
(stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko promotora/~~promotora pomocniczego~~*)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
technologii żywności i żywienia
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak

OŚWIADCZENIE

promotora/~~promotora pomocniczego~~* rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że rozprawa doktorska mgr inż. Arkadiusza Zakrzewskiego pod tytułem **„Warunki stresowe podczas otrzymywania produktów gotowych do spożycia z ryb i krewetek a możliwość przeżycia oraz odpowiedź komórkowa bakterii z rodzaju *Listeria* sp."** została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Anna Zadernowska

Podpis promotora

* *niepotrzebne skreślić*

Olsztyn, 26.03.2024
(~~miejscowość~~, data)

dr inż. Wioleta Chajęcka- Wierzchowska
(stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko ~~promotora~~/promotora pomocniczego*)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
technologii żywności i żywienia
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak

OŚWIADCZENIE

~~promotora~~/promotora pomocniczego* rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że rozprawa doktorska mgr inż. Arkadiusza Zakrzewskiego pod tytułem **„Warunki stresowe podczas otrzymywania produktów gotowych do spożycia z ryb i krewetek a możliwość przeżycia oraz odpowiedź komórkowa bakterii z rodzaju *Listeria* sp."** została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Wioleta Chajęcka-Wierzchowska
.....

Podpis promotora

* *niepotrzebne skreślić*

Informacja o finansowaniu badań

Badania prowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej zostały sfinansowane ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz Narodowego Centrum Nauki:

1) Finansowanie z projektu zewnętrznego przez **Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego** w ramach konkursu **Diamentowy Grant**, nr DI2017 013047, środki finansowe przeznaczone na tworzenie wybitnie uzdolnionym absolwentom studiów pierwszego stopnia lub studentom po ukończeniu trzeciego albo czwartego roku jednolitych studiów magisterskich warunków rozwoju przez umożliwienie im prowadzenia badań naukowych albo twórczości artystycznej pod kierunkiem opiekuna naukowego albo artystycznego; Tytuł projektu: Warunki stresowe podczas otrzymywania produktów sous vide i ceviche z ryb i krewetek a możliwość przeżycia oraz odpowiedź komórkowa bakterii wieloopornych; Pełniona funkcja: **kierownik projektu**; Okres trwania: 11.09.2018 - 10.03.2022; Wartość projektu: 220 000 zł.

2) Finansowanie z projektu zewnętrznego przez **Narodowe Centrum Nauki** w Krakowie w ramach konkursu **PRELUDIUM 20**, nr 2021/41/N/NZ9/00845, środki finansowe przeznaczone na wsparcie badań prowadzonych przez osoby rozpoczynające karierę naukową, nieposiadające stopnia naukowego doktora: Tytuł projektu: Charakterystyka biofilmu pałeczek *Listeria* na powierzchni muszli mięczaków: kolonizacja, zmiany w transkryptomie i możliwość przeżycia podczas procesów fizycznych; Pełniona funkcja: **kierownik projektu**; Okres trwania: 1.01.2022 - 31.12.2024; Wartość projektu: 209 986 zł.

3) Finansowanie z projektu zewnętrznego przez **Narodowe Centrum Nauki** w Krakowie w ramach konkursu **OPUS 15**, nr 2018/29/B/NZ9/00645: Tytuł projektu: Wpływ technologii płotków i obróbki sous vide na ekspresję czynników wirulencji i genów oporności na antybiotyki u *Listeria monocytogenes i Enterococcus* sp.; Pełniona funkcja: **wykonawca projektu**; Okres trwania: 10.01.2019 - 09.01.2024; Wartość projektu: 1 223 800 zł

Wykaz publikacji stanowiących przedmiot rozprawy doktorskiej

Przedmiotem rozprawy doktorskiej jest 5 publikacji stanowiących powiązany tematycznie cykl przeglądu literatury oraz badań laboratoryjnych na temat występowania i możliwości przeżycia pałeczek *Listeria* sp. podczas przygotowywania produktów z ryb i owoców morza:

P1: **Zakrzewski, A.,** Gajewska, J., Chajęcka-Wierzchowska, W., Załuski D. Zadernowska, A. (2023). Prevalence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in fish, fish products and fish processing environment: A systematic review and meta-analysis. *Science of The Total Environment*, 907, 167912. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167912 (MEiN: 200, IF: 9.8)

Wkład w powstanie publikacji polegał na opracowaniu koncepcji manuskryptu, współudziale w opracowaniu metodyki, wykonaniu analiz, wizualizacji wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 60%.

P2: **Zakrzewski, A. J**., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A., Podlasz, P. (2020). Virulence characterization of *Listeria* monocytogenes, *Listeria innocua*, and *Listeria welshimeri* isolated from fish and shrimp using in vivo early zebrafish larvae models and molecular study. *Pathogens,*, 9(12), 1028. https://doi.org/10.3390/PATHOGENS9121028 (MEiN: 100, IF: 3.492)

Wkład w powstanie publikacji polegał na opracowaniu koncepcji manuskryptu, zebraniu literatury, współudziale w opracowaniu metodyki, wykonaniu analiz, wizualizacji wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 60%.

P3: **Zakrzewski, A. J.,** Kurpas, M., Zadernowska, A., Chajęcka-Wierzchowska, W., Fraqueza, M. J. (2023). A comprehensive virulence and resistance characteristics of *Listeria monocytogenes* isolated from fish and the fish industry environment. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 3581. https://doi.org/10.3390/ijms24043581

(MEiN: 140, IF: 5.6)

Wkład w powstanie publikacji polegał na współudziale w opracowaniu koncepcji manuskryptu, opracowaniu metodyki, wykonaniu analiz, wizualizacji wyników oraz

uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 50%.

P4: **Zakrzewski, A. J.,** Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2022). Ceviche-natural preservative: possibility of microbiota survival and effect on *L. monocytogenes*. *Foods*, 11(6), 860. https://doi.org/10.3390/FOODS11060860

(MEiN: 100, IF: 5.2)

Wkład w powstanie publikacji polegał na współudziale w opracowaniu koncepcji manuskryptu, opracowaniu metodyki, wykonaniu analiz, wizualizacji wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

P5: **Zakrzewski, A**., Gajewska, J., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2023). Effect of sous vide processing of fish on the virulence and antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes*. *NFS Journal*, 31, 155–161. https://doi.org/10.1016/J.NFS.2023.05.003

(MEiN: 140, IF: 0.663)

Wkład w powstanie publikacji polegał na współudziale w opracowaniu koncepcji manuskryptu, opracowaniu metodyki, wykonaniu analiz, wizualizacji wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 60%.

Ogólna liczba punktów za cykl prac stanowiących rozprawę doktorską, według wykazu czasopism naukowych z MNiSW, zgodny z rokiem ukazania się pracy wynosi 680 punktów.

Sumaryczny Impact Factor (IF) za cykl prac stanowiących rozprawę doktorską zgodny z rokiem ukazania się prac wynosi 24,755.

W przypadku wyżej wymienionych prac eksperymentalnych miałem wiodący udział w badaniach, od udziału w opracowaniu koncepcji i metodologii poprzez udział w wykonaniu analiz, po opracowanie, interpretację i opublikowanie wyników. Prowadzone przeze mnie badania miały charakter interdyscyplinarny dlatego też zostały wykonane we współpracy z ekspertami z różnych obszarów nauk rolniczych, medycznych i weterynaryjnych. Badania zostały wykonane w ramach aż trzech projektów finansowanych ze źródeł zewnętrznych, w dwóch byłem kierownikiem: projekt „Warunki

stresowe podczas otrzymywania produktów sous vide i ceviche z ryb i krewetek a możliwość przeżycia oraz odpowiedź komórkowa bakterii wieloopornych" finansowany przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach programu Diamentowy grant oraz projekt „Charakterystyka biofilmu pałeczek *Listeria* na powierzchni muszli mięczaków: kolonizacja, zmiany w transkryptomie i możliwość przeżycia podczas procesów fizycznych" finansowany przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu PRELUDIUM 20, oraz trzeci projekt, kierowany przez dr hab. inż. Annę Zadernowską, prof. UWM pn. „Wpływ technologii płotków i obróbki sous vide na ekspresję czynników wirulencji i genów oporności na antybiotyki u *Listeria monocytogenes i Enterococcus* sp" finansowany przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu OPUS 16.

Podczas prowadzenia badań, których wyniki umożliwiły mi przygotowanie publikacji składających się na niniejszą rozprawę doktorską, współpracowałem z dr hab. inż. Dariuszem Załuskim, prof. UWM z Katedry Genetyki, Hodowli Roślin i Inżynierii Biosurowców, Wydziału Rolnictwa i Leśnictwa Uniwersytetu Warmińsko Mazurskiego (UWM) w Olsztynie, dr hab. Piotrem Podlaszem, prof. UWM z katedry Patofizjologii, Weterynarii Sądowej i Administracji, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM, dr Moniką Kurpas z Zakładu Immunologii i Mikrobiologii Środowiska w Instytucie Medycyny Morskiej i Tropikalnej Uniwersytetu Medycznego (GUMED) w Gdańsku, prof. Marią João Fraquezą z Faculty of Veterinary Medicine, Uniwersytetu w Lizbonie, Portugalia. Współpracowałem również z dr Kathrin Rychli oraz dr Evą Voglauer z Unit of Food Microbiology Uniwersytetu Medycyny Weterynaryjnej w Wiedniu. Współpraca z wymienionymi naukowcami obejmowała wykonanie badań i analiz, wykorzystanie sprzętu oraz pomoc w interpretacji otrzymanych wyników, a także przygotowaniu publikacji naukowych.

Spis treści

Pozostały dorobek naukowy 12

Wykaz skrótów 22

Streszczenie 23

Abstract 25

1. Wstęp – uzasadnienie podjęcia badań 26

1.1. *Listeria* species 26

1.2. *Listeria monocytogenes* 26

1.3. *Listeria* w przemyśle rybnym 29

1.4. Stres komórkowy 30

1.5. Ceviche 30

1.6. Sous vide 32

2. Hipotezy badawcze, cel główny i cele szczegółowe rozprawy doktorskiej 34

2.1. Hipotezy badawcze 34

2.2. Cel główny 34

2.3. Cele szczegółowe 34

3. Organizacja i metodyka badań 36

3.1. Organizacja badań 36

3.2. Materiały i metody 37

3.2.1 Metaanaliza 37

3.2.1.1 Strategia wyszukiwania 37

3.2.1.2 Kryteria kwalifikacji 37

3.2.1.3 Ekstrakcja danych 37

3.2.1.4 Model statystyczny 37

3.2.2 Analizy bioinformatyczne 38

3.2.2.1 Przygotowanie bibliotek 38

3.2.2.2 MLST i cgMLST 38
3.2.2.3 Identyfikacja genów wirulencji, antybiotykooporności i czynników stresowych 39
3.2.2.4 Identyfikacja profagów i plazmidów 39
3.2.3 Szczepy wykorzystywane w badaniach 39
3.2.4 Obróbka gastronomiczna 40
3.2.4.1 Minimalne medium z mięsa ryb 40
3.2.4.2 Ceviche 40
3.2.4.3 Sous vide 40
3.2.5 Analiza przeżywalności 40
3.2.5.1 Dostosowanie cytometru przepływowego 40
3.2.5.2 Ocena przeżywalności 41
3.2.6 Wpływ stresu związanego z obróbką 41
3.2.6.1 Badanie potencjału patogeniczności 41
3.2.6.1.1 Badanie potencjału patogeniczności przy użyciu larw ryb danio pręgowanego (*Danio rerio)* 41
3.2.6.1.2 Badanie potencjału patogeniczności przy użyciu larw barciaka większego (*Galleria mellonella)* 42
3.2.6.1.3 Oświadczenie etyczne 42
3.2.6.2 Badanie zmian profilu antybiotykooporności 42
3.2.6.3 Badanie zmian ekspresji pod wpływem stresu związanego z obróbka gastronomiczną 44
3.2.6.3.1 Izolacja RNA i odwrotna transkrypcja na cDNA 44
3.2.6.3.2 Analiza ekspresji genów 44
3.2.6.3 Analiza statystyczna 45
4. Rezultaty badań przedstawione w powiązanym tematycznie cyklu publikacji 46
4.1. Przegląd systematyczny i metaanaliza 46

4.2. Występowanie *L. monocytogenes* oraz *Listeria* sp. w rybach, produktach z ryb i środowisku przetwórczym 46
4.3. Analiza meta-regresji 47
4.4. Występowanie *L. monocytogenes* w rybach i produktach z ryb w subgrupach .. 48
4.5. Analiza MLST 49
4.6. Analiza cgMLST 49
4.7. Ocena wirulomu 49
4.8. Analiza rezystomu 50
4.9 Analiza potencjału chorobotwórczego szczepów *L. monocytogenes* 50
4.10 Przeżywalność szczepów *L. monocytogenes* podczas obróbki gastronomicznej 50
4.11 Zmiany potencjału chorobotwórczości pałeczek *L. monocytogenes* po działaniu stresu podczas obróbki gastronomicznej 51
4.12 Zmiany profilu anybiotykooporności pałeczek *L. monocytogenes* po działaniu stresu podczas obróbki gastronomicznej 52
4.13 Zmiany ekspresji genów wirulencji i antybiotykooporności pałeczek *L. monocytogenes* po działaniu stresu podczas obróbki gastronomicznej 52
5. Wnioski i podsumowanie badań 53
Literatura: 55
Spis tabel i rysunków 63
Załączniki 66

Pozostały dorobek naukowy

Publikacje w recenzowanych czasopismach

1. **Zakrzewski, A. J.**, Gajewska, J., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2024). Insights into the genetic diversity of *Listeria monocytogenes* from bivalves. *Science of The Total Environment*, 908, 168481. https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2023.168481 (IF: 9,80, MNiSW: 200)
2. Wiśniewski, P., **Zakrzewski, A.**, Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2024). Possibility of transfer and activation of 'silent' tetracycline resistance genes among *Enterococcus faecalis* under high-pressure processing. *Food Microbiology*, 120, 104481. https://doi.org/10.1016/J.FM.2024.104481 (IF: 5,30, MNiSW: 140)
3. Gajewska, J., **Zakrzewski, A. (**2024). Jakość mikrobiologiczna mleka i produktów mlecznych, *Przegląd Mleczarski*, 1/2024, 29-34
4. Adamski, P., Byczkowska-Rostkowska, Z., Gajewska, J., **Zakrzewski, A. J**., Kłębukowska, L. (2023). Prevalence and antibiotic resistance of *Bacillus* sp. isolated from raw milk. *Microorganisms*, 11(4), 1065. https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11041065 (IF: 4,93, MNiSW: 70)
5. Chajęcka-Wierzchowska, W., Gajewska, J., **Zakrzewski, A. J.,** Caggia, C., Zadernowska, A. (2023). Molecular analysis of pathogenicity, adhesive matrix molecules (MSCRAMMs) and biofilm genes of coagulase-negative staphylococci isolated from ready-to-eat food. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20(2), 1375. https://doi.org/10.3390/IJERPH20021375/S1 (IF: 4,61, MNiSW: 140)
6. Gajewska, J., **Zakrzewski, A.**, Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2023). Meta-analysis of the global occurrence of *S. aureus* in raw cattle milk and artisanal cheeses. *Food Control*, 147, 109603. https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2023.109603 (IF: 6,00, MNiSW: 140)
7. Gajewska, J., **Zakrzewski, A. J**., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2023). Impact of the food-related stress conditions on the expression of enterotoxin genes among *Staphylococcus aureus*. *Pathogens*, 12(7), 954. https://doi.org/10.3390/PATHOGENS12070954 (IF: 4,53, MNiSW: 100)
8. Modzelewska-Kapituła, M., Pietrzak-Fiećko, R., **Zakrzewski, A.,** Zakęś, Z. (2023). A comparative study of microwave and sous vide cooking effects on pikeperch fillets' fatty acid composition and quality attributes. *Applied Sciences*, 13(3), 1253. https://doi.org/10.3390/APP13031253 (IF: 2,84, MNiSW: 70)
9. **Zakrzewski, A. J.,** Chajęcka-Wierzchowska, W., & Zadernowska, A. (2022). Short communication: Low prevalence of clinically important antibiotic-resistant strains among non-pathogenic genera of the tribe *Klebsielleae. Foods* 2022, 11(15), 2270. https://doi.org/10.3390/FOODS11152270 (IF: 5,20, MNiSW: 100)
10. **Zakrzewski, A. J.,** Zarzecka, U., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2022). A comparison of methods for identifying *Enterobacterales* isolates from fish and prawns. *Pathogens*, 11(4), 410. https://doi.org/10.3390/PATHOGENS11040410 (IF: 4,53, MNiSW: 100)
11. **Zakrzewski, A**., Purkiewicz, A., Jakuć, P., Wiśniewski, P., Sawicki, T., Chajęcka-Wierzchowska, W., Tańska, M. (2022). Effectiveness of various solvent-produced thyme (*Thymus vulgaris*) extracts in inhibiting the growth of *Listeria*

monocytogenes in frozen vegetables. *NFS Journal*, 29, 26–34. https://doi.org/10.1016/J.NFS.2022.09.004 (IF: 0,66, MNiSW: 140)

12. Zarzecka, U., Chajęcka-Wierzchowska, W., **Zakrzewski, A.**, Zadernowska, A., Fraqueza, M. J. (2022). High pressure processing, acidic and osmotic stress increased resistance to aminoglycosides and tetracyclines and the frequency of gene transfer among strains from commercial starter and protective cultures. *Food Microbiology*, 107, 104090. https://doi.org/10.1016/J.FM.2022.104090 (IF: 5,30, MNiSW: 140)
13. Zarzecka, U., **Zakrzewski, A. J.,** Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2022). Linezolid-resistant *Enterococcus* spp. Isolates from Foods of Animal Origin - The Genetic Basis of Acquired Resistance. *Foods*, 11(7), 975. https://doi.org/10.3390/FOODS11070975 (IF: 5,20, MNiSW: 100)
14. Wiśniewski, P., **Zakrzewski, A. J.**, Zadernowska, A., Chajęcka-Wierzchowska, W. (2022). Antimicrobial resistance and virulence characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food and food processing environments. *Pathogens*, 11(10). https://doi.org/10.3390/PATHOGENS11101099 (IF: 4,53, MNiSW: 100)
15. Modzelewska-Kapituła, M., Pietrzak-Fiećko, R., **Zakrzewski, A.,** Więk, A. (2022). The influence of sous vide parameters on nutritional characteristics and safety of pikeperch fillets. *Foods*, 11(11), 1605. https://doi.org/10.3390/FOODS11111605 (IF: 5,20, MNiSW: 100)
16. Kurpas, M., Michalska, M., **Zakrzewski, A.**, Zorena, K. (2021). First report of the presence of *Vibrio vulnificus* in the Gulf of Gdansk. *International Maritime Health*, 72(4), 247–251. https://doi.org/10.5603/IMH.2021.0048 (IF: 1,26, MNiSW: 40)
17. Przemieniecki, S. W., Gorczyca, A., Matras, E., Krawczyk, K., Mastalerz, J., **Zakrzewski, A**. (2020). Bacteria isolated from the aeration chamber of wastewater treatment plants used in the biocontrol and promotion of wheat growth. *Agronomy*, 10(11), 1792. https://doi.org/10.3390/AGRONOMY10111792 (IF: 2,61, MNiSW: 100)
18. Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A., Zarzecka, U., **Zakrzewski, A.**, Gajewska, J. (2019). Enterococci from ready-to-eat food – horizontal gene transfer of antibiotic resistance genes and genotypic characterization by PCR melting profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(3), 1172–1179. https://doi.org/10.1002/JSFA.9285 (IF: 2,61, MNiSW: 100)
19. Zadernowska, A., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowski, M., **Zakrzewski, A**., Zarzecka, U. (2018). Challenge tests - przewidywanie i eliminacja potencjalnych zagrożeń mikrobiologicznych. *Przemysł Spożywczy*, 72(6), 16-18.

Rozdziały w monografiach pokonferencyjnych

1. Drężek, J., **Zakrzewski, A.,** Antibiotic resistance of *Hafnia alvei* isolated from food of animal origin, Młodzi Liderzy Jakości, 18-23, 2021.
2. Kucharczyk, D.J., **Zakrzewski, A.,** Antibiotic resistance of *Serratia* spp. isolated from food of animal origin, Młodzi Liderzy Jakości, 70-75, 2021.

3. **Zakrzewski, A.,** Wiśniewski, P., Purkiewicz, A., Jakuć, P., The ability of *Listeria monocytogenes* isolated from frozen vegetables to form biofilm, Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce; Żywność i żywienie, 138-148, 2020, Poznań.
4. Jakuć, P., Purkiewicz, A**., Zakrzewski, A.,** Wiśniewski, P., Phenolic content and antioxidant activity of thyme extracts (*Thymus vulgaris* L.) obtained with various solvents, Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce Żywność i żywienie, 98-105, Poznań 2020
5. Małachwiej, A., **Zakrzewski, A.,** Zarzecka, U., *Listeria monocytogenes* resistance to benzalkonic chloride and cadmium chloride", Ekologia żywności, środowiska i zdrowia człowieka, Międzynarodowe Seminarium Kół Naukowych w Olsztynie tom 1, 324-335, 2020.
6. Wiśniewski, P., **Zakrzewski, A**., Podobieństwo fenotypowe pałeczek *Listeria monocytogenes* izolowanych z mrożonych produktów przetwórstwa owocowo-warzywnego, Ekologia żywności, środowiska i zdrowia człowieka, Międzynarodowe Seminarium Kół Naukowych w Olsztynie tom 1, 405-414, 2020.
7. **Zakrzewski, A.,** Zarzecka, U., Antybakteryjne właściwości roślinnych olejków eterycznych wobec *Listeria* species izolowanych z żywności, Uwarunkowania bezpieczeństwa i jakości żywności w Polsce, 235-244, 2019.
8. Zarzecka, U., **Zakrzewski, A.,** Dubiejko, S., Hamowanie bakterii wielolekoopornych i patogenów przenoszonych przez żywność za pomocą substancji przeciwbakteryjnych wytwarzanych przez szczepy *Pseudomonas* sp. izolowane z ryb i krewetek, Uwarunkowania bezpieczeństwa i jakości żywności w Polsce, 243-252, 2019.
9. Małachwiej, A., **Zakrzewski, A**., Zarzecka, U. Oporność Listeria monocytogenes na chlorek benzalkoniowy i chlorek kadmu. Uwarunkowania bezpieczeństwa i jakości żywności w Polsce, s. 164-174. Olsztyn: Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, 2019
10. **Zakrzewski, A. J**., Chajecka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A., *Listeria monocytogenes* isolated from frozen vegetables - phenotypic and genotypic characteristics, Młodzi Naukowcy w Polsce – Badania i Rozwój, Gdańsk, 018, 2019
11. **Zakrzewski, A.** "Chorobotwórczy potencjał Cronobacter sakazakii" . W: Koła naukowe - szkołą twórczego działania. Tom 5. Nauki rolnicze i weterynaryjne, cz. 2, s. 271-278. Olsztyn: Wydawnictwo ABADA, 2018
12. **Zakrzewski, A.** Antybakteryjny potencjał ziołomiodów. Koła naukowe - szkołą twórczego działania: nauki rolnicze, T. 1, s. 147-152. Olsztyn: Wydawnictwo ABADA 2017
13. Zadernowska, A., Chajecka-Wierzchowska, W., **Zakrzewski, A**. Prevalence and biofilm forming ability of listeria monocytogenes isolated from meat, CBU Int. Conf. Proc., vol. 5, pp. 1104–1107, Sep. 2017.
14. Karbowska, K., **Zakrzewski, A.** Antybakteryjne właściwości miodu. XVL Międzynarodowe Seminarium Kół Naukowych "Koła Naukowe - Szkołą Twórczego Działania", Tom 5. Sekcja Nauk o Żywności, Sekcja Nauk Medycznych, Sekcja Biologii i Biotechnologii, s. 57-60, Olsztyn, 2016.

Doniesienia na konferencjach naukowych

1. Wiśniewski, P., **Zakrzewski, A**., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. "Wpływ paskalizacji na przeżywalność pałeczek *Listeria monocytogenes*". W: XVIII Konferencja Naukowa Młodych Badaczy. Bezpieczeństwo i jakość żywności, Olsztyn, 28 września 2021.
2. Wiśniewski, P., **Zakrzewski, A**., Zadernowska, A., Chajęcka-Wierzchowska, W. "Antimicrobial resistance characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food and food processing environments". W: PROTEINA - International Conference of Food Technology and Biology, Biochemistry and Biotechnology Sciences, 13-14 sierpnia 2022 r.
3. Kurpas, M., Michalska, M., **Zakrzewski, A.**, Zorena, K. "Izolacja *Vibrio vulnificus* z wody morskiej Zatoki Gdańskiej – badania pilotażowe". W: XI Ogólnopolska Konferencja Hydromikrobiologiczna, Sopot, 9-11.06.2021.
4. **Zakrzewski, A.,** Zadernowska, A., Chajęcka-Wierzchowska, W. "Virulence Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from fish and shrimp using in vivo early zebrafish larvae model". W: World Microbe Forum, online worldwide, 20-24.06.2021.
5. Drężek, J., **Zakrzewski, A**. "Antybiotykooporność *Hafnia alvei* w produktach spożywczych pochodzenia zwierzęcego". W: I Dni Młodych Liderów Jakości, Poznań, 10-11.06.2021.
6. Kucharczyk, D.J., **Zakrzewski, A**. "Antybiotykooporność bakterii z rodzaju *Serratia* w produktach spożywczych pochodzenia zwierzęcego". W: I Dni Młodych Liderów Jakości, Poznań, 10-11.06.2021.
7. **Zakrzewski, A.** "Oporność na kadm pałeczek *Listeria* sp. izolowanych z mięsa i muszli małż dostępnych na polskim rynku". W: I Dni Młodych Liderów Jakości, Poznań, 10-11.06.2021.
8. **Zakrzewski, A**., Zadernowska, A., Chajęcka-Wierzchowska, W. "Thermal inactivation of antibiotic resistance *Listeria* species during the sous vide process condition". W: XXV Jubileuszowa Sesja Naukowa Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ „Przyszłość w żywności - żywność w przyszłości", Wrocław, 20-21.05.2021.
9. **Zakrzewski, A.** "Gdzie czai się zło – stan mikrobiologiczny terminali w zakładach gastronomicznych". W: 49. Międzynarodowe Seminarium Kół Naukowych, Olsztyn, 24.09.2020.
10. **Zakrzewski, A**., Wiśniewski, P., Purkiewicz, A., Jakuć, P. "Zdolność tworzenia biofilmu przez pałeczki *Listeria monocytogenes* izolowane z warzyw mrożonych". W: XII Krajowa Konferencja Naukowa – Młodzi Naukowcy w Polsce – Badania i Rozwój, 22.03.2020.
11. Jakuć, P., Purkiewicz, A., **Zakrzewski, A.,** Wiśniewski, P. "Zawartość związków fenolowych i aktywność przeciwutleniająca ekstraktów z tymianku (*Thymus vulgaris L.*) otrzymanych za pomocą różnych rozpuszczalników". W: XII Krajowa Konferencja Naukowa – Młodzi Naukowcy w Polsce – Badania i Rozwój, 2222.03.2020
12. **Zakrzewski, A**., Zadernowska, A., Chajęcka-Wierzchowska, W. "Występowanie i zdolność wytwarzania biofilmu pałeczek *Listeria* sp. izolowanych z łososia atlantyckiego (*Salmo salar*)". W: XXIV Sesja Naukowa.

13. **Zakrzewski, A**., Zarzecka, U. "Antimicrobial properties of plant essential oils against *Listeria* sp. isolated from foodstuff". W: 48. Międzynarodowe Seminarium Kół Naukowych, Olsztyn, 11.04.2019.
14. Zarzecka, U., **Zakrzewski, A.,** Dubiejko, S. "Inhibition of multi-drug resistant bacteria and food-borne pathogens by antibacterial substances produced by *Pseudomonas* sp. strains isolated from fish and shrimps". W: 48. Międzynarodowe Seminarium Kół Naukowych, Olsztyn, 11.04.2019.
15. Małachwiej, A., **Zakrzewski, A**., Zarzecka, U. "Oporność *Listeria monocytogenes* na chlorek benzalkoniowy i chlorek kadmu". W: 48. Międzynarodowe Seminarium Kół Naukowych, Olsztyn, 11.04.2019.
16. **Zakrzewski, A.,** Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. "Pathogenicity of coagulase-negative staphylococci isolated from ready-to-eat food in Poland". W: VIII International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology BioMicroworld2018, Torremolinos, Malaga (Hiszpania), 24-25. 05.2018.
17. **Zakrzewski, A**., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. "*Listeria monocytogenes* izolowana z mrożonych warzyw- charakterystyka fenotypowa i genotypowa". W: VIII Krajowa Konferencja Naukowa – Młodzi Naukowcy w Polsce – Badania i Rozwój, Gdańsk, 26.11.2018.
18. **Zakrzewski, A**. "Chorobotwórczy potencjał *Enterobacter sakazakii*". XLVII Międzynarodowe Seminarium Kół Naukowych, Olsztyn, 26-27.04.2018
19. **Zakrzewski, A**. "Antybakteryjny potencjał ziołomiodów". W: XLVI Międzynarodowe Seminarium Kół Naukowych Olsztyn, 24-25.04.2017
20. Karbowska, K., **Zakrzewski, A.** "Antybakteryjne właściwości ziołomiodów". W: XLV Międzynarodowe Seminarium Kół Naukowych, Olsztyn, 25.04.2016
21. Zadernowska, A., Chajęcka-Wierzchowska, W., Kłębukowska, L., Poniatowski, K., **Zakrzewski, A**. "*Listeria monocytogenes* w mięsie - występowanie, hamowanie rozwoju poprzez zastosowanie kultur ochronnych". W: XXVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, Bydgoszcz, 25-27.09.2016.
22. Ejsmont, A., **Zakrzewski, A.** "Mikroflora powietrza lodówek studenckich". W: XLIV Międzynarodowe Seminarium Kół Naukowych, Olsztyn, 27-28.05.2015
    Ejsmont, A., **Zakrzewski, A**. "Wrogowie z lodówki". Sekcja posterowa, XLIV Międzynarodowe Seminarium Kół Naukowych, Olsztyn 2015

Udział w stażach naukowych

1. University of Veterinary Medicine Vienna (Austria), Unit of Food Microbiology
   Staż 60-dniowy
   - Opiekun stażu: dr. rer. nat. Kathrin Kober-Rychli
   - Październik-Grudzień 2021
2. University of Turku (Finlandia), Functional Food Forum
   Staż 90-dniowy
   - Opiekun stażu: prof. Seppo Salminen
   - Sierpień-Październik 2022
3. University of Lisbon (Portugalia), Faculty of Veterinary Medicine
   Staż 21-dniowy
   - Opiekun stażu: prof. Maria João Fraqueza

- Styczeń 2023

4. Alberts NV (Belgia), Food Qualty Department
   Staż 5-miesięczny
   - Opiekun stażu: dr Glenn Mathijssen
   - Sieprień- Grudzień 2023
5. Uniwersytet Medyczny w Gdańsku, Zakład Immunobiologii i Mikrobiologii Środowiska
   5 dniowy wyjazd badawczy
   - Opiekun stażu: prof. dr hab. Katarzyna Zorena
   - Czerwiec 2022

Udział w kołach i towarzystwach naukowych

1. International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics
2. Polskie Towarzystwo Technologów Żywności
3. Polskie Towarzystwo Mikrobiologów
   2023-2024- Członek Komisji Rewizyjnej oddziału Olsztyńskiego
4. Naukowe Koło Mikrobiologii Żywności „Kocuria”
   - 2015-2021- Przewodniczący Koła
   - 2021-2023- Wiceprzewodniczący koła
5. Koło Naukowe Gastronomii Sztuki Kulinarnej
   - 2015-2016- Przewodniczący Koła

Udział w projektach badawczych

1. Kierownik
   Preludium 20 | Narodowe Centrum Nauki
   Charakterystyka bioflimu pałeczek *Listeria* na powierzchni muszli mięczaków: kolonizacja , zmiany w transkryptomie i możliwość przeżycia podczas procesów fizycznych| 2021/41/N/NZ9/00845
2. Kierownik
   Diamentowy Grant | Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego
   Warunki stresowe podczas otrzymywania produktów sous vide i ceviche z ryb i krewetek a możliwość przeżycia oraz odpowiedź komórkowa bakterii wieloopornych | DI2017 013047
3. Autor i wykonawca
   Studenckie Koła Tworzą innowacje | Ministerstwo Edukacji i Nauki
   Postbiotyki- naturalna alternatywa dla zapewnienia bezpieczeństwa mikrobiologicznego serów zagrodowych| SKN/SP/569724/2023
4. Wykonawca w projekcie
   Opus 15| Narodowe Centrum Nauki
   Wpływ technologii płotków i obróbki sous vide na ekspresję czynników wirulencji i genów oporności na antybiotyki u *Listeria monocytogenes* i *Enterococcus* sp.
   Wykonawca w projekcie |2018/29/B/NZ9/00645
   Sonata 12| Narodowe Centrum Nauki

Zjadliwość, enterotoksyczność i antybiotykooporność szczepów gronkowców koaguloazo-ujemnych izolowanych z żywności z uwzględnieniem możliwości horyzontalnego transferu genów | 2016/23/D/NZ9/01404

5. Wykonawca w projekcie
   Preludium 20 | Narodowe Centrum Nauki
   Odpowiedź na warunki stresowe u *Staphylococcus aureus*: wpływ na entetotoksyczność i metycylinooporność w warunkach stresu istotnego dla rzemieślniczej produkcji sera | 2021/41/N/NZ9/00918
6. Wykonawca w projekcie
   Opus 23| Narodowe Centrum Nauki
   Wpływ zabiegów fotodynamicznych opartych na naturalnych (sono) foto-uczulaczach na Listeria monocytogenes |2022/45/B/NZ9/00299
7. Autor i wykonawca
   Studencki Grant Rektora III edycja | Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
   Ekstrakty z tymianku właściwego (*Thymus vulgaris*) jako naturalna alternatywa dla konserwantów w walce z patogenami *Listeria monocytogenes* w mrożonkach warzywnych

Udział w szkoleniach i kursach

1. Biological Sequence Analysis using R Programming- Nano Science and Technology Consortium, kurs online, 2024
2. How to pipette correctly: An expert guide to techniques and best practices- Select science, kurs online, 2021
3. Kurs techniki Real-time PCR TATAA Institute, Gotebrg, Szwecja, 2020
4. Szkolenie operacyjne z chromatografu cieczowego, 2019
5. Szkolenie z zakresu obsługi aparatu do automatycznej identyfikacji i określania lekowrażliwości drobnoustrojów, 2020
6. Szkolenie operacyjne z spektrometru masowego z technologia MALDI-TOF, 2020
7. Szkolenie operacyjne z cytometru przepływowego, 2020
8. Szkolenie w zakresie obsługi autoklawów z uwzględnieniem warunków BHP, 2019
9. Szkolenie z zakresu obsługi mikroskopu optycznego, 2019

Wykonane recenzje artykułów

Wykonanie 8 recenzji artykułów w następujących czasopismach:

1. Pathogens (MDPI) : 4
2. Microorganisms (MDPI) : 1
3. BMC Microbiology (Springer Nature) : 1
4. Functional & Integrative Genomics (Springer Nature) :1
5. Fishes (MDPI) :1

Wykłady

1. „Mikroorganizmy w żywności –wrogowie czy przyjaciele” dla uczniów Zespołu Szkół Mechaniczno-Energetycznych im. Tadeusza Kościuszki w Olsztynie, 27.04.2023
2. „Fermented foods in Eastern Europe” dla uczestników kursu Functional Microorganisms: Health Relevance and Potential Technological Applications in Food And Pharmaceutical Products w University of Turku, Finlandia, 10.05.2023
3. „Fermented foods in Eastern Europe” dla pracowników Valio, Helskinki, Finlandia 19.09.2022

Nagrody i wyróżnienia

1. Laureat Nagrody Santander dla studentów i doktorantów Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie 2023
2. Laureat konkursu w ramach programu Diamentowy Grant za projekt „Warunki stresowe podczas otrzymywania produktów sous vide i ceviche z ryb i krewetek a możliwość przeżycia oraz odpowiedź komórkowa bakterii wieloopornych” (MNiSW, Warszawa, 2018)
3. I miejsca w Sekcji Posterowej 48. Międzynarodowe Seminarium Kół Naukowych za poster Antimicrobial properties of plant essential oils against Listeria sp. isolated from foodstuff
4. Wyróżnienie za wystąpienie podczas Międzynarodowej Konferencji XXIV Sesja Naukowa Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ, "Żywność - wczoraj, dziś i na zdrowej jutro" za pracę występowanie i zdolność wytwarzania biofilmu u pałeczek Listeria sp. izolowanych z łososia atlantyckiego (Salmo salar)
5. Dyplom uznania Dziekana Wydziału Nauki o Żywności Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego prof. dr hab. Małgorzaty Darewicz za bardzo dobre wyniki w nauce (Olsztyn 2017)
6. I miejsce w konkursie międzynarodowym na najlepszą pracę badawczą podczas XLVI Międzynarodowego Seminarium Kół Naukowych: za referat „Antybakteryjny potencjał ziołomiodów” (Olsztyn, 2017)
7. III miejsce w konkursie międzynarodowym na najlepszą pracę badawczą podczas XLIV Międzynarodowego Seminarium Kół Naukowych za referat „Wrogowie z lodówki” (Olsztyn 2015)

Działalność organizacyjna i dodatkowa

1. Członek Rady Wydziału Nauki o Żywności 2018-2020
2. Członek Rady Dyscypliny technologii żywności i żywienia, 2020-2023
3. Przewodniczenie sesji posterowej podczas XXV Jubileuszowej Sesji Naukowej Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ- 2021
4. Udział w przygotowaniu Dni Otwartych UWM, Mikołajki z NoŻami

Całkowite zestawienie dorobku naukowego

(na dzień 21.03.2024)

Autorstwo/Współautorstwo w pracach naukowych			
Czasopismo	Rok wydania	Liczba punktów MEiN*	IF**
Science of The Total Environment	2024	200	9.80
Science of The Total Environment	2024	200	9.80
Food Microbiology	2024	140	5.30
Przegląd Mleczarski	2024	-	-
NFS Journal	2023	140	0.66
International Journal of Molecular Sciences	2023	140	6.21
Microorganisms	2023	70	4.93
International Journal of Environmental Research and Public Health	2023	140	4.61
Food Control	2023	140	6.00
Pathogens	2023	100	4.53
Applied Sciences	2023	70	2.84
Foods	2022	100	5.20
Foods	2022	100	5.20
Pathogens	2022	100	4.53
NFS Journal	2022	140	0.66
Food Microbiology	2022	140	5.30
Foods	2022	100	5.20
Pathogens	2022	100	4.53
Foods	2022	100	5.20
International Maritime Health	2021	40	1.26
Pathogens	2020	100	4.53
Agronomy	2020	100	3.42
Journal of the Science of Food and Agriculture	2019	100	2.61
Przemysł spożywczy	2018	12	-
Rozdziały w monografiach pokonferencyjnych	-	110	-
Suma		**2682**	**102.32**
Inne aktywności naukowe			
Kierowanie projektami badawczymi			2
Udział w projektach badawczych			5
Doniesienia na konferencjach naukowych			23
Udział w stażach naukowych			4
Udział w kołach i towarzystwach naukowych			5
Udział w szkoleniach			9
Wykonane recenzje artykułów			6
Wskaźniki oceny dorobku naukowego (Web of Science)			
H-indeks			6
Łączna liczba cytowań (bez auto cytowań)			106

*Liczba punktów zgodnie z załącznikiem do komunikatów Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz Ministerstwa Edukacji i Nauki zgodnie z datą opublikowania

**Impact Factor (IF) według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania

Wykaz skrótów

CC- clonal complex (kompleks klonalny)

cDNA – complementary DNA (komplementarny DNA)

cgMLST – core genome multilocus sequence typing (wieloogniskowe typowanie sekwencyjne opartne na genomie rdzeniowym)

CLSI - Clinical and Labolatory Standard Institute (Instytut Norm Klinicznych i Laboratoryjnych)

DNA- deoxyribonucleic acid (kwas deoksyrybonukleinowy)

EFSA- European Food Safety Authority (Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności)

LIPI - Listeria pathogenicity island (wyspa patogeniczności *Listeria*)

MALDI-TOF MS - matrix assisted laser desorption and ionisation (desorpcja/ jonizacja laserowa wspomagana matrycą z analizatorem czasu przelotu)

MIC – Minimal Inhibitory Concentration (Minimalne Stężenie Hamujace)

MLST - Multi-Locus Sequence Typing (wieloogniskowe typowanie sekwencyjne)

PA/PE - poliamid i polietylen

RGE

RNA - ribonucleic acid (kwasy rybonukleinowe)

ST- sequence type (typ sekwencyjny)

SVAC - Sous Vide Advisory Committee (Komitet Doradczy Sous Vide)

Streszczenie

Zdolność bakterii do percepcji zmian środowiskowych i adaptacji do nich jest kluczowa dla ich przetrwania. W odpowiedzi na łagodne i subletalne poziomy stresu, u *Listeria monocytogenes* aktywowane są systemy regulacyjne wpływające na ich potencjał wirulencji i profil antybiotykooporności. Badania nad wpływem stresu skupiają się na stresie związanym z przemysłowym przetwórstwem żywności, natomiast nieliczni badacze analizują odpowiedź komórkową na procesy gastronomiczne, co jest istotne z uwagi na fakt, że gotowanie zyskuje na popularności jako kreatywna i satysfakcjonująca forma spędzania czasu. W poszukiwaniu nowych smaków i doświadczeń kulinarnych, wiele osób eksperymentuje z zaawansowanymi technikami obróbki gastronomicznej, takimi jak sous vide, która polega na długotrwałym gotowaniu potraw w precyzyjnie kontrolowanej temperaturze wody. Równie dużo uwagi poświęca się tradycyjnym, ale wcześniej mniej znanym w niektórych regionach przepisom, jak na przykład ceviche - danie z surowej ryby marynowanej w soku cytrusowym, popularne w kuchniach Ameryki Łacińskiej. Ten rosnący entuzjazm do odkrywania nowych metod gotowania odzwierciedla globalny trend w docenianiu różnorodności kulinarnych oraz chęć rozszerzania osobistych umiejętności gastronomicznych.

Metody przygotowania pokarmów takie jak sous vide i ceviche mogą nie zapewniać wystarczającej ochrony przed pałeczkami *L. monocytogenes*, która jest przyczyną listeriozy. W przypadku ceviche, stosowanie słabych kwasów i niewielka ilość składników o działaniu antybakteryjnym może być niewystarczające, szczególnie przy bardzo krótkim czasie marynowania. Z kolei w metodzie sous vide, w przypadku surowców o niskiej zawartości tkanki łącznej jak ryby stosuje się niższe temperatury i krótki czas obróbki. Takie warunki, stanowiące subletalny stres dla patogenów mogą powodować odpowiedź komórkową zmieniającą potencjał wirulencji i oporność na antybiotyki.

Zaplanowane w niniejszej rozprawie doktorskiej badania opierają się na wiedzy nt. występowania *Listeria* sp. oraz *L. monocytogenes* w surowcu, gotowych do spożycia produktach z ryb i środowisku przetwórstwa rybnego co opisano w pracy przeglądowej. W części eksperymentalnej zastosowano unikalną kombinację metod, po raz pierwszy zbadano możliwość przetrwania procesów gastronomicznych przy pomocy cytometrii przepływowej, charakteryzującej się znacznie większa dokładnością niż metody tradycyjne. Dodatkowo analizowano cały genom nowoczesnymi technikami

sekwencjonowania, potencjał chorobotwórczy oraz wpływ obróbki sous vide i przygotowania ceviche na pałeczki *L. monocytogenes* nie tylko in vitro, ale również w modelu żywym.

Badania prowadzone w ramach rozprawy doktorskiej potwierdziły, że zarówno *Listeria* sp. oraz *L. monocytogenes* częściej występują w gotowych do spożycia produktach z ryb niż w surowcach. W badaniach wykazano, że szczepy pochodzące z ryb wykazują duży potencjał chorobotwórczy, co potwierdzono badaniami wirulomu. Analizując rezystom stwierdzono, że izolaty charakteryzowały się głównie opornością na tetracykliny. Dowiedziono ponadto, że stres wywołany obróbką gastronomiczną obniża potencjał chorobotwórczy ale może powodować wzrost oporności pałeczek z rodzaju *Listeria* sp. na tetracykliny.

Słowa kluczowe: *Listeria*; *L. monocytogenes*; sous vide; ceviche; wirulencja; oporność

Abstract

Cooking is gaining popularity as a creative and fulfilling leisure activity. In the quest for new flavors and culinary experiences, many individuals are experimenting with advanced techniques made more accessible by their prevalence, such as sous vide . This technique involves prolonged cooking of food at precisely controlled water temperatures. Equally, attention is being directed towards traditional yet previously less familiar recipes in certain regions, like ceviche—a dish made with raw fish marinated in citrus juice, celebrated in Latin American cuisines. This growing enthusiasm for exploring novel cooking methods reflects a global trend in appreciating culinary diversity and a desire to expand personal culinary skills.

Food preparation methods such as sous vide and ceviche may not provide adequate protection against *Listeria monocytogenes*, the causative agent of listeriosis. In the case of ceviche, the use of weak acids and a limited array of antibacterial components may be insufficient, particularly given the very short marination period. Conversely, the sous vide method, when applied to raw materials with low connective tissue content like fish, uses lower temperatures and shorter cooking times. Such conditions may favor variable virulence and antibiotic resistance in *L. monocytogenes*.

The research planned in this doctoral dissertation is based on knowledge about the occurrence of *Listeria* sp. and *L. monocytogenes* in raw materials, ready-to-eat fish products, and fish processing facilities, as reviewed in the literature. The experimental section examined the genome, pathogenic potential, and the effect of sous vide processing and ceviche preparation on L. monocytogenes strains.

Research carried out within the framework of the dissertation confirmed that both *Listeria* spp. and *L. monocytogenes* are more frequently found in ready-to-eat fish products than in raw materials. The strains derived from fish demonstrated a high pathogenic potential, as confirmed by virulome studies. Resistance analysis confirmed that the strains were mainly resistant to tetracyclines. The stress induced by culinary processing decreased the pathogenic potential, however, may cause an increase in tetracycline resistance.

Keywords: *Listeria; L. monocytogenes*; sous vide; ceviche; virulence; resistance

1. Wstęp – uzasadnienie podjęcia badań

1.1. *Listeria* species

Rodzaj *Listeria* obejmuje obecnie 28 uznanych gatunków (*L. aquatica, L. booriae, L. cornellensis , L. cossartiae, L. costaricensis, L. farberi, L. fleischmannii, L. floridensis, L. goaensis, L. grandensis, L. grayi, L. ilorinensis, L. immobilis, L. innocua, L. ivanovii, L. marthii, L. monocytogenes, L. newyorkensis, L. portnoyi, L. riparia, L. rocourtiae, L. rustica, L. seeligeri, L. swaminathanii, L. thailandensis, L. valentina, L. weihenstephanensis* oraz *L. welshimeri*). Są to bakterie Gram-dodatnie w formie pałeczki. Tylko dwa z tych gatunków, *L. monocytogenes* i *L. ivanovii*, są uważane za patogeny. *L. monocytogenes* jest ważnym ludzkim patogenem przenoszonym przez żywność i trzecią najczęstszą przyczyną zgonów spowodowanych przez spożywanie zanieczyszczonej żywności w USA (Orsi & Wiedmann, 2016).

Dwadzieścia dwa gatunki *Listeria* były opisywane od 2009 roku. Wcześniej ostatni opis nowego gatunku *Listeria* miał miejsce w 1984 r. (*L. ivanovii*) (Seeliger i in., 1984). Wszystkie te nowo rozpoznane gatunki zostały rzetelnie opisane w publikacjach w International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, a ich klasyfikacja gatunkowa jest poparta uznanymi kryteriami taksonomicznym (dane dotyczące ANib i/lub hybrydyzacji DNA-DNA) (Orsi & Wiedmann, 2016).

Gatunki należące do rodzaju *Listeria* można podzielić na dwie grupy (I) *Listeria sensu stricto*, która obejmuje *L. monocytogenes, L. seeligeri, L. marthii, L. ivanovii, L. welshimeri i L. innocua* (Chiara et al. 2015) oraz (II) *Listeria sensu lato*, która obejmuje pozostałe 22 gatunki (w tym *L. grayi* i 21 gatunków *Listeria* nowo opisanych od 2009 r.). Podział na te dwie grupy opiera się na pokrewieństwie gatunków z *L. monocytogenes*, który jest zarówno pierwszym sklasyfikowanym gatunkiem *Listeria*, jak i gatunkiem najważniejszym pod względem zdrowia publicznego.

1.2. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes jest Gram-dodatnią, fakultatywnie beztlenową, nie tworzącą przetrwalników pałeczką, wykazującą ruchliwość w temperaturze 20-25°C. Jest głównym czynnikiem etiologicznym listeriozy, choroby, którą charakteryzuje szereg możliwych objawów, od nudności po zapalenie opon mózgowych (EFSA, 2013; EFSA, 2018). Noworodki, osoby starsze, kobiety w ciąży i osoby z osłabionym układem odpornościowym są najbardziej narażone na zachorowania. Znaczenie *L. monocytogenes*

nie znajduje odzwierciedlenia w częstości występowania, która jest niska (0,49 na 100 000 w 2021 r.) w porównaniu z innymi patogenami przenoszonymi przez żywność, ale z wysoką śmiertelnością wynoszącą 8.98 % w 2021 roku (EFSA, 2022).

L. monocytogenes jest wysoce heterogenicznym genetycznie gatunkiem, który wykazuje klonalną strukturę populacji (Haase i in., 2014; Papić i in., 2019). W oparciu o antygeny somatyczne (O) i wiciowe (H), patogen ten jest klasyfikowany do czternastu serotypów, które są dalej pogrupowane w cztery zróżnicowane genetycznie linie, składające się z określonych serotypów i licznych typów MLST (*ang.* Multi-Locus Sequence Typing*)*, podzielonych na odrębne kompleksy klonalne (Muchaamba i in., 2022). Poszczególne linie charakteryzuje zmienność w obrębie cech filogenetycznych, ekologicznych i fenotypowych. Różnice te są powiązane z klonami epidemicznymi, które definiuje się jako blisko spokrewnione izolaty od prawdopodobnego wspólnego przodka związanego z kilkoma geograficznie i czasowo niepowiązanymi ogniskami listeriozy (Haley i in., 2015). Linia I jest najczęściej izolowana z klinicznych próbek ludzkich i z ognisk epidemicznych (Kuenne i in., 2013). W obrębie linii zawarte są serotypy 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e i 7, przy czym serotypy 1/2b i 4b kodują listeriolizynę S, bakteriocynę, która promuje kolonizację jelit poprzez zmiany składu mikrobioty jelitowej gospodarza nieobecną w pozostałych liniach (Matle i in., 2020; Meza-Torres i in., 2021). Linia II jest powszechnie izolowana z prób środowiskowych i próbek żywności. Występuje zarówno u ludzi, jak i u zwierząt i odpowiada serotypom 1/2a, 1/2c, 3a i 3c. U przedstawicieli linii II często stwierdza się plazmidy zawierające geny oporności, które kodują oporność na toksyczne metale, stres oksydacyjny i toksyczne peptydy (Matle i in., 2020). Linie III i IV są rzadsze i identyfikowane głównie u zwierząt, przy czym linia III zawiera serotypy 4a, 4b i 4c, podczas gdy atypowe serotypy 4b jak również serotypy 4a i 4c, zgrupowane są w linii IV (Matle i in., 2020). W ostatnich latach zidentyfikowany został nowy serotyp, 4h, składający się z hiperwirulentnych izolatów z hybrydowej podlinii II, (Yin i in., 2019). Chociaż wszystkie serotypy *L. monocytogenes* mogą wywoływać listeriozę, większość z przypadków chorób u ludzi jest wywoływana przez serotypy 1/2a, 1/2b i 4b, przy czym szczepy serotypu 4b są odpowiedzialne za większość ognisk chorób przenoszonych przez żywność (Varsaki i in., 2022).

Średni okres rozwoju listeriozy szacuje się na trzy tygodnie, a wynosi od 1 do 70 dni po spożyciu zakażonego produktu spożywczego (Matle i in., 2020; Varsaki i in., 2022). Z uwagi na fakt, że choroba może ujawnić się po długim czasie od spożycia często bardzo

trudno jest prześledzić źródło zakażenia. Minimalna dawka wymagana do wywołania zakażenia u ludzi nie została jeszcze jednoznacznie ustalona, natomiast ogólnie uważana jest za niską. Sporadyczne i epidemiczne przypadki listeriozy są spowodowane wysokimi liczebnościami *L. monocytogenes* w żywności co sugeruje, że mało prawdopodobne jest, aby dawki znacznie niższe niż 10^3 jtk/g były odpowiedzialne za wywołanie choroby (Muchaamba i in., 2022; Pouillot i in., 2016).

L. monocytogenes ma zdolność do infekowania różnych typów komórek i przekraczania najważniejszych barier obronnych, w tym barier jelitowych, krew-mózg i łożyskowych (Nikitas i in., 2011). Wraz ze spożytą żywnością bakterie przedostają się do jelita i poprzez transcytozę przekraczają barierę nabłonkową, atakując krezkowe węzły chłonne i powodując zakażenie ogólnoustrojowe (Nikitas i in., 2011). Chociaż inwazyjna listerioza może wystąpić u zdrowych osób, głównymi czynnikami ryzyka jej rozwoju są: wiek, osłabiony układ odpornościowy i ciąża. Ciężkie objawy listeriozy wynikają z obecności drobnoustroju we krwi (bakteriemii), który może prowadzić do posocznicy, zapalenia wsierdzia i zakażenia ośrodkowej tkanki nerwowej, przez co może powodować zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych (Wu i in., 2022). Mogą również wystąpić inne objawy kliniczne listeriozy, szczególnie u pacjentów, u których występują choroby współistniejące, takie jak listerioza skórna, septyczne zapalenie stawów, zapalenie wątroby, ropień wątroby, zapalenie otrzewnej, zakażenia dróg żółciowych i zapalenie kości i szpiku (Matle i in., 2020). U kobiet w ciąży listerioza może przebiegać subklinicznie, bezobjawowo lub dawać objawy grypopodobne, takie jak gorączka, dreszcze, złe samopoczucie, bóle stawów, bóle pleców i biegunka (Schlech, 2019). Ponadto *L. monocytogenes* może infekować tkankę łożyska, powodując zapalenie błon płodowych i bakteriemię, a także może przenikać przez łożysko i infekować płód, powodując poronienie, przedwczesny poród i posocznicę noworodków (Schlech, 2019).

Nieinwazyjna listerioza, zwana także gorączkowym zapaleniem żołądka i jelit, jest łagodną postacią choroby, która występuje głównie u osób z prawidłową odpornością, szybko po spożyciu pokarmów o wyższej liczbie *L. monocytogenes* niż te zgłaszane podczas ognisk inwazyjnej listeriozy, przy wartościach większych niż 10^9 jtk/g (Schlech, 2019). Choroba ta charakteryzuje się objawami obejmującymi ból głowy, bóle mięśni, gorączkę, nudności, wymioty, biegunkę, ból brzucha i zwykle ustępuje samoistnie (Osek i in., 2022). Jednakże istniejące wcześniej zmiany w błonie śluzowej przewodu

pokarmowego mogą umożliwić translokację *L. monocytogenes* z przewodu pokarmowego, co może skutkować rozwojem choroby inwazyjnej (Quereda i in., 2021).

1.3. *Listeria* w przemyśle rybnym

Gatunki należące do rodzaju *Listeria* to naturalnie występująca mikrobiota wód powierzchniowych i innych zbiorników wodnych połączonych z rzekami. *Listeria* sp. jest często wykrywana na skórze ryb pochodzących z zanieczyszczonej wody. Stwierdzono obecność *L. monocytogenes* także w wyściółce żołądka, skrzelach i jelitach w skażonym środowisku. Tkanka mięśniowa rzadko jest dotknięta zanieczyszczeniem (Jami i in., 2014). Zanieczyszczenie mięśni ryb może następować dwiema potencjalnymi drogami. Po pierwsze, rozprzestrzenianie się *L. monocytogenes* z treści jelitowej do innych tkanek ryb, zwłaszcza do mięśni, może nastąpić, jeśli czas między śmiercią a patroszeniem przekracza kilka godzin. Po drugie, istnieje możliwość zanieczyszczenia krzyżowego na każdym etapie łańcucha dostaw, gdzie pojemniki, naczynia, woda i lód mogą służyć jako potencjalne źródła tego patogenu. Ludzie i ptaki również odgrywają kluczową rolę w zanieczyszczeniu (Soultos i in., 2007). Występowanie *L. monocytogenes* w zakładach przetwórczych jest związane z właściwościami adhezyjnymi i tworzeniem biofilmu. Występują najczęściej w miejscach wilgotnych i brudnych oraz trudno dostępnych jak dziury i szczeliny, włókniste, porowate i rdzewiejące powierzchnie (Carpentier i in., 2012; Tabit, 2018). Rodzaj *Listeria* jest znacznie częściej izolowany od ryb złowionych lub hodowanych w wodach powierzchniowych, w których żyją naturalnie (FAO, 1999).

Procesy przetwarzania żywności takie jak dodanie soli, gotowanie lub suszenie w celu zmniejszenia aktywności wody, włączenie fermentacji lub środków zakwaszających w celu obniżenia poziomu pH, mogą skutecznie hamować rozwój pałeczek *L. monocytogenes* w produkcie (Gómez i in., 2015). Jednak ze względu na zdolność do namnażania się w zanieczyszczonej żywności, na późniejszych etapach produkcji, podczas przechowywania w temperaturze chłodniczej, obecność pałeczek *L. monocytogenes* stwierdzono w przetworzonych produktach, które wymagały przechowywania w niskiej temperaturze. Dlatego żywność przechodząca przez kolejne etapy łańcucha chłodniczego może mieć kontakt z pałeczkami *L. monocytogenes* i umożliwić jej rozwój (Lunamarina, 2018; Tabit, 2018).

Według raportu The European Union One Health 2021 Zoonoses Report częstość występowania pałeczek *L. monocytogenes* w gotowych do spożycia produktach wahała

się od 3,5% do 5,4%, stanowiąc jedno z najważniejszych zagrożeń w ostatnich latach. Polska zgłosiła szczególnie dużą liczbę przebadanych próbek z partii ryb, wynoszących łącznie 4 893 przebadanych próbek. Co ciekawe, łączna liczba przebadanych próbek ryb w porównaniu do 2020 roku wzrosła 3-krotnie w 2021 r. z 11 212 do 29 273 („The European Union One Health 2021 Zoonoses Report", 2022).

1.4. Stres komórkowy

Podobnie jak w przypadku wszystkich żywych organizmów, zdolność *L. monocytogenes* percepcji i adaptacji do zmian środowiskowych jest kluczowa dla ich przetrwania. Zmiany w środowisku naturalnym i przetwórczym, takie jak oscylacje ciśnienia osmotycznego, fluktuacje temperatury, ekstremalne wartości pH, zmiany potencjału redoks oraz wahania w dostępności składników odżywczych, stanowią źródło stresu dla komórek mikroorganizmów (Wiktorczyk-Kapischke i in., 2021). W ekstremalnych sytuacjach, stresowe warunki mogą prowadzić do uszkodzenia struktur komórkowych i zakłócenia homeostazy wewnątrzkomórkowej, co może skutkować śmiercią mikroorganizmów (Singh & Shalini, 2016). W wielu przypadkach mikroorganizmy są narażone na łagodne poziomy stresu, które jedynie ograniczają wzrost, nie powodując utraty żywotności (Wesche, Gurtler, Marks, & Ryser, 2009). W większości przypadków procesów przygotowywania potraw, takich jak gotowanie, smażenie czy pieczenie, stres termiczny, jest powodowany przez działanie bardzo wysokiej temperatury, co skutkuje śmiercią komórek wegetatywnych. Stosuje się też metody przygotowywania potraw, przy których stres komórkowy jest ograniczony, który może indukować rozwój adaptacyjnych reakcji tolerancji na stres, które zwiększają przeżywalność patogenów, gdy są one narażone na kolejny śmiertelny stres w łańcuchu żywieniowym (Begley & Hill, 2015).

1.5. Ceviche

Ceviche to potrawa, którą można znaleźć tradycyjnie wzdłuż pacyficznych wybrzeży hiszpańskojęzycznej Ameryki, od Meksyku na północy po Chile na południu. Składa się głównie z ryby lub owoców morza marynowanych w cytrusach (Davidson, 2014; Duarte-Casar i in., 2022). Niejasne jest, skąd pochodzi potrawa, a różne interpretacje sugerują różnorodne tła historyczne; jedne wskazują na korzenie babilońskie, które poprzez Persję i Al-Andalus trafiły do Ameryki wraz z hiszpańskimi konkwistadorami; inne odnoszą się do skromnego posiłku peruwiańskich i ekwadorskich rybaków składającego się z surowych, solonych i marynowanych z chili ryb, które ewoluowały do kwaszenia przy użyciu passiflory (amazońską *Passiflora edulis* lub andyjską *Passiflora tripartita*), która

następnie nabyła swój obecny kształt dzięki cytrusom przyniesionym przez Hiszpanów; najpierw pomarańcze sevilskie, a później limonki i cytryny (Duarte-Casar i in., 2022). Kinilaw- filipińska potrawa z ryby marynowanej w occie lub w kalamondinach *(×Citrofortunella microcarpa)* – a także ogólna technika gotowania – jest starsza od hiszpańskiego podboju o wiele wieków i mogła zostać przewieziona do Meksyku przez Hiszpanów (Fernandez & Choy, 2019). Hiszpańska Akademia Językowa sugeruje arabskie pochodzenie słowa od *assukkabáǧ*, który również wywodzi się z klasycznego arabskiego *sakbāj* (سكباج, czyli mięso gotowane w occie) (Jurafsky, 2014). Inne proponowane etymologie, pochodzące z artykułów prasowych to siwichi oznaczające „świeżą lub delikatną rybę" w języku keczua, „cebo" oznaczające małe ryby używane jako przynęta (*Día del ceviche peruano: historia, origen, receta y tipos de preparación del plato bandera de la gastronomía peruana | ATMP | Sociedad | La República*, 2019) Inna hipoteza umieszcza pochodzenie nazwy w nieudokumentowanym języku mówionym Manteño, używanym od południowej Kolumbii do północnego Peru przed inwazją Inków, gdzie przyrostek -iche oznaczałby „pyszne" (Jurafsky, 2014). Bez względu na pochodzenie, słowo pojawia się w druku po raz pierwszy w 1820 roku, w czwartej zwrotce pro-niezawisłościowej pieśni o nazwie „La chicha", która wywyższa typowe peruwiańskie jedzenie i chicha- tradycyjne południowoamerykańskie piwo z kukurydzy, w wyrażeniu peruwiańskiej niezawisłości od Hiszpanii. Piosenka, po tym jak stała się tak popularna, że była pierwszym utworem zaśpiewanym dla wyzwalającej armii w 1821 roku, straciła na popularności po uzyskaniu niepodległości (Rondón & König, 2014). Zaakceptowane pisownie potrawy to ceviche, cebiche, seviche i sebiche.

Marynowanie żywności to sposób na poprawę nie tylko jej trwałości, ale także właściwości organoleptycznych (Bottéro, 2004). Z uwagi na fakt, że obniżanie pH hamuje rozwój bakterii, przygotowywanie potraw w kwaśnym środowisku było jedną z podstawowych metod kulinarnych. Jednym z tych wczesnych przepisów stał się sigbāj (gulasz octowy lub zupa octowa), perski przysmak, który został przewieziony do Bagdadu, a następnie do Al-Andalus przez armie muzułmańskie, gdzie w późniejszych latach został przystosowany do chrześcijańskich postów i bliskość Morza Śródziemnego poprzez zamianę mięsa na ryby, gdzie stała się sefardyjską escabeche. To danie przekroczyło Atlantyk z hiszpańskimi konkwistadorami, którzy dotarli na ląd mniej niż 20 km od obecnej granicy peruwiańsko-ekwadorskiej. To danie połączono z peklowaną

solą i pieprzem na terenach Manteño i przekształciło się w dania, które jedzone są do dzisiaj (Duarte-Casar i in., 2022; Mouritsen & Styrbæk, 2017).

Przy tradycyjnym przyrządzaniu ceviche ograniczona jest skuteczność hamowania wzrostu bakterii. Działanie antybakteryjne przypisuje się głównie działaniu kwasów, które są stosowane do marynowania składników. Jednakże kwasy używane w ceviche, takie jak sok z cytrusów, są stosunkowo słabe. Ponadto, czas marynowania ryby jest zazwyczaj bardzo krótki, zazwyczaj nie przekracza 30 minut, co może nie wystarczyć do skutecznego zahamowania wzrostu niektórych bakterii. Dodatkowo pozostałe składniki używane w ceviche, takie jak cebula czy chili, a nawet kolędra, wykazują właściwości antybakteryjne, są one dodawane w stosunkowo małych ilościach, co ogranicza ich skuteczność w hamowaniu rozwoju bakterii.

1.6. Sous vide

Gotowanie przy użyciu techniki sous vide zostało po raz pierwszy wprowadzone przez Georgesa Pralusa - francuskiego szefa kuchni. Termin "sous vide" w języku francuskim dosłownie oznacza "w próżni". Ta metoda polega na gotowaniu żywności w hermetycznie zamkniętych termostabilnych woreczkach próżniowych, w kontrolowanej temperaturze (65–95°C) i czasie (1–7 h) (Renna i in., 2014). Mechanizm działania bazuje na skutecznym przewodzeniu ciepła z wody do produktu. Na jakość produktu otrzymanego metodą sous vide duży wpływ ma temperatura, czas i ciśnienie stosowane podczas gotowania. Metoda ta zapobiega utracie wilgoci, składników odżywczych i substancji lotnych oraz hamuje zmiany oksydacyjne w wyniku gotowania w próżni. Ponadto technika ta ogranicza rozwój bakterii tlenowych i jest skuteczna w zapobieganiu ponownemu zanieczyszczeniu zamrożonej żywności poprzez zastosowanie worków wykonanych najczęściej z PA/PE, co tym samym wydłuża okres przydatności do spożycia produktów podczas przechowywania (Kathuria i in., 2022). W 1991 roku Komitet Doradczy Sous Vide (SVAC) poinformował, że trwałość produktów gotowanych metodą sous vide zależy od obróbki cieplnej i warunków przechowywania (González-Fandos i in., 2005). W różnych badaniach stwierdzono, że obecność mikroorganizmów chorobotwórczych w żywności gotowanej metodą sous vide podczas konsumpcji jest głównie związana z drobnoustrojami, które istniały w surowcu i przetrwały podczas gotowania. Dlatego gotowanie powinno odbywać się w określonej temperaturze przez wystarczający okres czasu, tak aby temperatura rdzenia była wyższa

niż 54,4 °C przez około 6 godzin w celu całkowitej inaktywacji takich patogenów jak *Salmonella sp.* czy *Listeria* sp. (Zavadlav i in., 2020). Długoterminowa metoda niskotemperaturowa daje produkt wolny od wzrostu drobnoustrojów, bez dodanych konserwantów i wzbogacony o składniki odżywcze w celu zachowania funkcjonalności.

Ze względu na wysoką aktywność wody i neutralne pH, ryby i owoce morza należą do najszybciej psujących się produktów spożywczych, co czyni je idealnymi do rozwoju bakterii psujących żywność i rozwoju bakterii chorobotwórczych. Ich trwałość jest ograniczona, także ze względu na duże ilości wolnych aminokwasów podatnych na utlenianie (Coşansu i in., 2022). Jednak utlenianie i powodowany przez to nieprzyjemny smak są hamowane przez pakowanie próżniowe stosowane w technologii sous vide. Owoce morza gotowane sous vide mają dłuższy okres przydatności do spożycia niż owoce morza gotowane w tradycyjny sposób. Po obróbce termicznej początkowy mikrobiom żywności może ulec obniżeniu, jednak zalecane temperatury obróbki ryb i owoców morza są często znacznie niższe niż te określone z definicji, które często nie przekraczają 60 °C i krótki czas około 20 min (Fetterman i in., 2016; Scott, 2018) dlatego zabieg ten może być nieskuteczny w zwalczaniu mikroorganizmów.

2. Hipotezy badawcze, cel główny i cele szczegółowe rozprawy doktorskiej

2.1. Hipotezy badawcze

Na podstawie przeprowadzonego przeglądu literatury postawiono następujące hipotezy badawcze:

H1: Ryby i owoce morza oraz środowisko przetwórcze są istotnym źródłem bakterii z rodzaju *Listeria*, zwłaszcza *L. monocytogenes*;

H2: Pałeczki *L. monocytogenes* izolowane z ryb i owoców morza oraz z ich środowiska przetwórczego mają wysoki potencjał chorobotwórczy;

H3: Przygotowanie dań z ryb metodą sous vide, przy wysokim poziomie zanieczyszczenia pałeczkami *L. monocytogenes,* może być niewystarczającą obróbką aby zapewnić ich bezpieczeństwo mikrobiologiczne oraz wpływa na wirulencję i antybiotykooporność szczepów *L. monocytogenes*;

H4: Przygotowanie ceviche z ryb może być niewystarczającym sposobem zapewnienia jego bezpieczeństwa mikrobiologicznego, a warunki jego otrzymywania wpływają na wirulencję i antybiotykooporność szczepów *L. monocytogenes*;

2.2. Cel główny

Za główny cel badawczy niniejszej rozprawy doktorskiej przyjęto ocenę możliwości przeżycia i odpowiedź komórkową podczas przygotowania potraw z ryb metodą sous vide oraz ceviche.

2.3. Cele szczegółowe

W ramach rozprawy doktorskiej realizowano następujące cele szczegółowe:

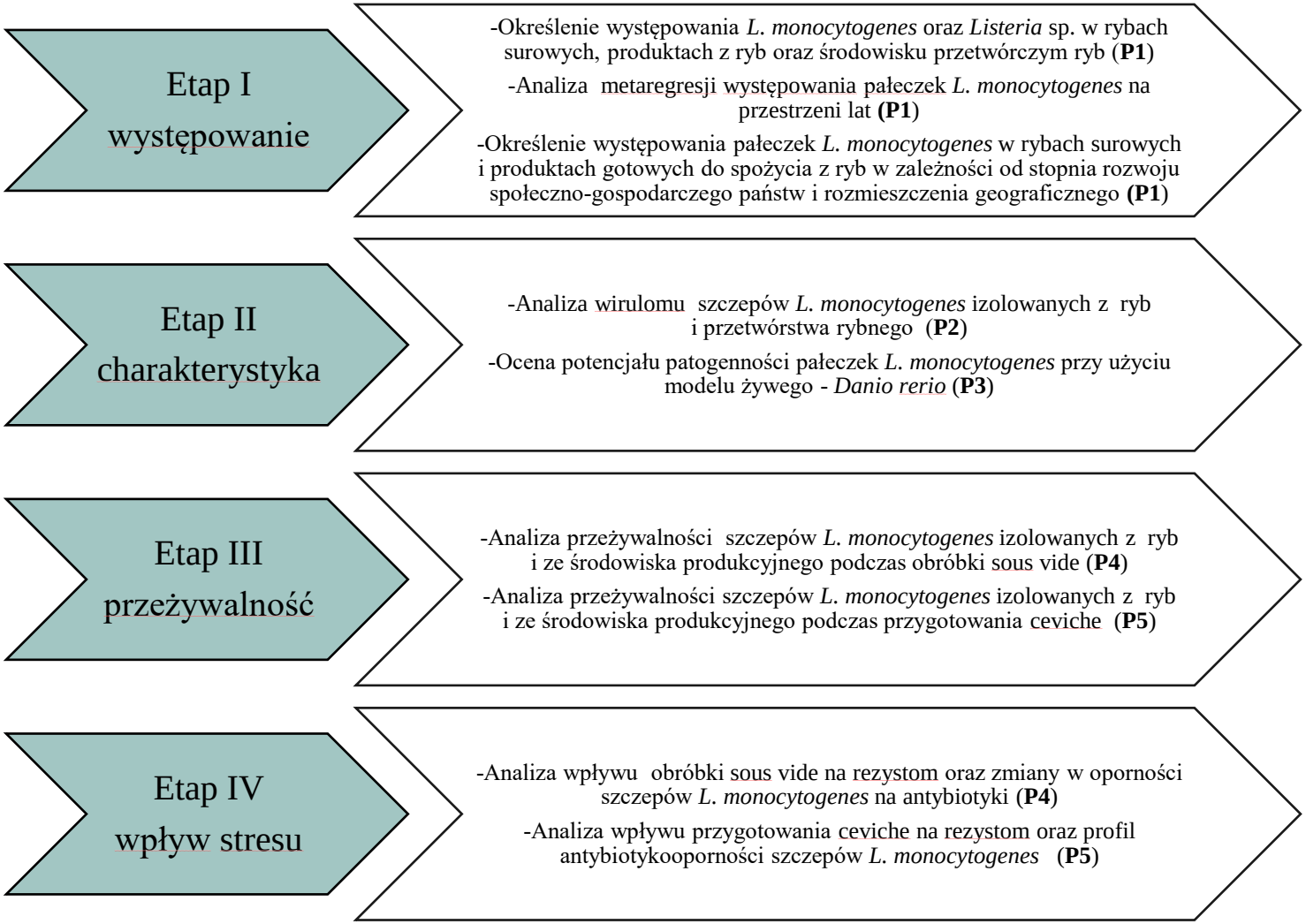
- określenie możliwości występowania szczepów *Listeria* sp. w rybach, gotowych do spożycia produktach rybnych i środowisku produkcyjnym;
- określenie potencjału wirulencji oraz charakterystyka fenotypowa i genotypowa oporności szczepów *L. monocytogenes* izolowanych z ryb i zakładów przetwórstwa ryb;

- określenie wpływu przygotowywania dań z ryb metodą sous vide na przeżywalność, potencjał wirulencji oraz zmiany profilu antybiotykooporności szczepów *L. monocytogenes*;
- określenie wpływu przygotowywania ceviche z ryb na przeżywalność, potencjał wirulencji oraz zmiany profilu antybiotykooporności szczepów *L. monocytogenes*

3. Organizacja i metodyka badań

3.1. Organizacja badań

Badania zaplanowane w niniejszej rozprawie doktorskiej podzielono na 4 etapy badawcze (Rysunek 1):



Rysunek 1 Schema badań prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej z uwzględnieniem publikacji wchodzących w jej skład

3.2. Materiały i metody

3.2.1 Metaanaliza

3.2.1.1 Strategia wyszukiwania

Przegląd systematyczny został przeprowadzony zgodnie z wytycznymi Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA). Badania przeprowadzono, korzystając z baz PubMed, Scopus i Web of Science. Użyto następujących słów kluczowych: „*Listeria*", „*L. monocytogenes*", „fish", "fish processing plant", „salmon", „*Salmo salar*", „trout", „*Oncorhynchus mykiss*", „occurrence" oraz „prevalence". Wyszukiwania w bazach danych były przeprowadzane od grudnia 2022 do lutego 2023 poprzez wpisywanie pojedynczych słów kluczowych jak i ich połączeń. Szczególną uwagę zwrócono na dwa słowa kluczowe - „salmon" (łosoś) i „trout" (pstrąg), ponieważ są to dwa gatunki ryb najczęściej spożywane na surowo lub po przetworzeniu. Wyszukiwanie ograniczono do publikacji z okresu od stycznia 2013 do grudnia 2023. W badaniu wykluczono artykuły, które nie zawierały informacji na temat liczby izolatów *Listeria* sp., jak również prace eksperymentalne dotyczące nowych możliwości wykrywania *Listeri*a sp. z różnych źródeł. Tytuły i streszczenia artykułów były niezależnie oceniane przez autorów (AJZ, JG), a wszelkie różnice zdań były rozstrzygane przez dialog pomiędzy trzecim i ostatnim autorem (WCh-W, AZ) publikacji **P1**.

3.2.1.2 Kryteria kwalifikacji

Kryteria włączenia obejmowały badanie pod kątem obecności gatunków *Listeria* w surowych i przetworzonych rybach, gotowych do spożycia produktach rybnych oraz w środowisku zakładów przetwórstwa rybnego **(P1)**.

3.2.1.3 Ekstrakcja danych

Dane zbierano według nazwisk autorów, roku publikacji, rodzaju źródła izolacji, ilości prób oraz liczby izolatów *L. monocytogenes* i *Listeria* sp. Ekstrakcję danych przeprowadzono przez autora (AJZ), a wszelkie rozbieżności rozstrzygano w konsultacji z JG, WCh-W i AZ **(P1)**.

3.2.1.4 Model statystyczny

Ogólna częstość występowania pałeczek *Listeria* sp. została oszacowana przy użyciu oprogramowania statystycznego PQStat w wersji 1.4.8. Metaanaliza została przeprowadzona z wykorzystaniem modelu efektów losowych w celu obliczenia skumulowanej częstości występowania oraz związanego z nią 95% przedziału ufności

(CI). Heterogeniczność pomiędzy oszacowaniami oceniano za pomocą metody Higginsa I^2 oraz podejścia Cochran's Q, które kwantyfikuje stopień zmienności nieprzypisywalnej błędom próbkowania między badaniami. Wartość I^2 większa niż 75% wskazuje na wysoki poziom heterogeniczności. Przeprowadzono analizę wrażliwości w celu ustalenia czy wykluczenie któregokolwiek z badań miało mierzalny wpływ na skumulowaną wartość częstości występowania bez uwzględniania indywidualnego badania. Stronniczość publikacji oceniano przy użyciu testu Eggersa oraz wizualnej inspekcji wykresu lejkowego (przy wartości $p < 0,05$ uznawanej za znak statystycznie istotnego błędu publikacji). Przeprowadzono analizę metaregresji w celu ustalenia, czy istnieją czasowe zmienne w obecności *L. monocytogenes*. Test ANOVA został zastosowany do ustalenia statystycznej istotności różnic między gatunkami i klastrami. Analiza metaregresji została przeprowadzona w celu ustalenia, czy można wykryć czasowe zmienne w częstości występowania klastrów *Listeria*. Wyniki wskazują, że wartość Q modelu była istotna przy wartości p mniejszej niż 0,05 **(P1)**.

3.2.2 Analizy bioinformatyczne

3.2.2.1 Przygotowanie bibliotek

Przygotowanie bibliotek i sekwencjonowanie zostały wykonane przez firmę Genomed (Warszawa, Polska). Koncentracja DNA genomowego została zmierzona za pomocą PicoGreen (Life Technologies, Eugene, OR, USA) w aparacie Tecan Infinite. Biblioteka DNA została przygotowana za pomocą zestawu NEBNext® Ultra ™ II DNA Library Prep Kit for Illumina® (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). Sekwencjonowanie przeprowadzono na urządzeniu MiSeq Illumina®. Odczyty z MiSeq zostały poddane filtrowaniu przy użyciu programu Cutadapt w wersji 3.0 **(P3)**.

3.2.2.2 MLST i cgMLST

Analizy MLST i cgMLST opierały się na porównaniu profili alleli dla odpowiednio 7 i 1748 genów. Wszystkie obliczenia i ustalenia numerów alleli, typów sekwencji (ST) i kompleksów klonalnych (CC) przeprowadzono za pomocą narzędzi dostępnych na platformie BIGSdb-Lm (https://bigsdb.pasteur.fr/*Listeria*/ dostęp w dniu 28 września 2022 roku) **(P3)**.

3.2.2.3 Identyfikacja genów wirulencji, antybiotykooporności i czynników stresowych

Identyfikacja wszystkich genów związanych z wirulencją oraz opornością na antybiotyki lub czynniki stresowe przeprowadzona została za pomocą narzędzi dostępnych na platformie BIGSdb-Lm (https://bigsdb.pasteur.fr/*Listeria*/ dostęp w dniu 10 października 2022 roku). Dodatkowo, przeprowadzono analizę MVLST na podstawie 93 genów związanych z wirulencją. W celu porównania, wybrano szczepy dostępne w bazie danych (platforma BIGSdb-Lm), przy uwzględnieniu pochodzenia szczepów (Europa) i źródła izolacji (człowiek). Wybrano 185 szczepów *L. monocytogenes* izolowanych od ludzi w Europie **(P3)**.

3.2.2.4 Identyfikacja profagów i plazmidów

Identyfikacja profagów została przeprowadzona za pomocą narzędzia Prophage Hunter Tool (Song i in., 2019), służącego do identyfikacji i anotacji potencjalnych profagów we wszystkich genomach *L. monocytogenes*. W analizie brano pod uwagę tylko aktywne profagi. W celu identyfikacji plazmidów wykorzystano platformę PlasmidFinder 2.1 (Carattoli i in., 2014) **(P3)**.

3.2.3 Szczepy wykorzystywane w badaniach

Wszystkie szczepy wykorzystywane w badaniach pochodziły z kolekcji Katedry Mikrobiologii Żywności, Technologii i Chemii Mięsa (daw. Katedry Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności) Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Szczepy pochodziły zarówno z surowców; łosia surowego (*Salmo salar*), pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*), krewetek tygrysich (*Penaeus monodon*) oraz z zakładów przetwórstwa ryb. Wszystkie izolowano zgodnie z normą ISO 11290-1:2017. Podstawowe informacje na temat izolatów znajdują się w Tabeli S1. Identyfikacja na poziomie gatunku została przeprowadzona za pomocą analizy MALDI-TOF MS (Vitek MS, bioMerieux, Francja) i dodatkowo potwierdzona poprzez wykonanie standardowej reakcji PCR (Ryu i in., 2013).

Szczepy przed badaniami były przechowywane w temperaturze -80 °C w systemach Microbank (Pro-Lab Diagnostics) **(P2-P5)**.

3.2.4 Obróbka gastronomiczna

3.2.4.1 Minimalne medium z mięsa ryb

Świeże filety z ryby Mahi-Mahi (*Coryphaena hippurus*) i pstrąga (*Oncorhynchus mykiss*) zostały umyte destylowaną wodą, a mięso pokrojono na małe kawałki. Mięso (100g) homogenizowano z równą ilością wody, oraz z roztworem NaCl (1%). Homogenizaty przygotowano w objętości 1000 mL, a następnie poddano odwirowaniu (10 000 obr./min przez 30 minut w. 22 ± 2 °C). Supernatant został przefiltrowany przez filtry o rozmiarze porów 0,2 μm i przechowywany w temperaturze chłodniczej **(P4, P5).**

3.2.4.2 Ceviche

Przygotowano ceviche w następujących proporcjach: 680 g Mahi-Mahi (*Coryphaena hippurus*) kolendra (*Coriandrum sativum*) (30,8 g), czerwona cebula (*Allium cepa*) (50 g) oraz papryka habanero (*Capsicum chinense*) (6,2 g), a następnie marynowane w soku z limonki (*Citrus aurantifolia*) (236 g) przez 30 minut **(P4).**

3.2.4.3 Sous vide

Przefiltrowane podłoże z ryby zostało połączone z wcześniej odwirowanymi 24h hodowlami bakteryjnymi, tak aby końcowa liczba wynosiła około 6 x 10^3 kom/ml. Następnie próbki zostały szczelnie zamknięte w woreczkach z polipropylenu (PP), umieszczone w urządzeniu sous vide (Hendi 225,264, Niemcy) i poddawane obróbce w temperaturach: 42, 52, 57 i 60 °C przez 60 minut. Następnie próbki zostały schłodzone w chłodziarce szokowej (Atitila ATT05, Włochy) oraz odwirowane przez 10 minut przy prędkości 10 000 g. Supernatant usunięto, a do próbek dodano 1 ml roztworu buforu fosforanowego (PBS) **(P5)**.

3.2.5 Analiza przeżywalności

3.2.5.1 Dostosowanie cytometru przepływowego

Do uzyskania zawiesin żywych (LCS) i martwych (DCS) komórek, 1 mL 24-godzinnej hodowli bakteryjnej odwirowano przy prędkości 10 000 x g przez 5 minut. Supernatant usunięto, a następnie dodano 1 mL roztworu buforu fosforanowego (PBS) w przypadku LCS lub 1 mL izopropanolu o stężeniu 70% w przypadku DCS. Barwienie przeprowadzono mieszaniną zawierającą 2 mL LCS lub DCS oraz 6 μL roztworów roboczych [SYTO9 (5 mM) oraz PI (20 mM) w proporcji 1:1]. Roztwory inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej, a następnie przeprowadzono analizę za pomocą cytometru przepływowego (FACSlyric, Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Laser cytometru przepływowego miał długość fali 488 nm, a emisje fluorescencji

zbierano w kanałach czerwonym i zielonym. Znaczniki SYTO9 dla LCS i PI dla DCS używane były do zlokalizowania odpowiednich populacji bakteryjnych oraz do standaryzacji najbardziej odpowiednich parametrów cytometrycznych w celu uniknięcia interferencji z widmem emisji **(P4, P5)**.

3.2.5.2 Ocena przeżywalności

Aby zachować tę samą proporcję, co w przypadku tradycyjnego ceviche, ilość medium z mięsa ryby była równa ilości świeżego ceviche z ryby, co pozwoliło osiągnąć pH w zakresie 3,2–3,3. Każdy ze składników ceviche był osobno łączony z medium z mięsa ryby, następnie homogenizowany i przefiltrowany przy użyciu pompy próżniowej przez filtry o rozmiarze porów 0,2 µm. Przefiltrowane medium było łączone z wcześniej odwirowanymi hodowlami bakteryjnymi, tak aby końcowa liczba wynosiła około 6 x 10^8 (kom/ml). Próbki inkubowano w temperaturze 4°C przez 30 minut, a następnie poddano odwirowaniu przez 10 minut przy prędkości 10 000 x g, supernatant był usuwany, a do próbek dodawano 1 mL roztworu buforu fosforanowego (PBS). W przypadku sous vide postępowano zgodnie z rozdziałem 3.2.5.3. Analizy przeprowadzono za pomocą cytometru przepływowego **(P5)**.

3.2.6 Wpływ stresu związanego z obróbką

3.2.6.1 Badanie potencjału patogeniczności

3.2.6.1.1 Badanie potencjału patogeniczności przy użyciu larw ryb danio pręgowanego (*Danio rerio)*

Larwy były hodowane zgodnie z wytycznymi Unii Europejskiej dotyczącymi postępowania ze zwierzętami laboratoryjnymi (Animals in science, dostęp 10.10.2020). Doświadczenie przeprowadzono na dzikim typie oraz na linii Tg (mCherry) *Danio rerio* 72 h po zapłodnieniu. Larwy były mikroiniektowane w żółtko jajowe różnymi szczepami (około 50 komórek/nl). W przypadku analizy przetrwania, embriony (n ≥ 15 larw) były przechowywane w 6 dołkowych płytkach i regularnie analizowane w określonych odstępach czasu pod kątem śmiertelności (ocenianej na podstawie braku aktywności pracy serca). Kontrole eksperymentu obejmowały larwy zainokulowane 0,05% roztworem czerwonego fenolu (Merck, Darmstadt, Niemcy). Z uwagi na łatwiejszy dostęp oraz możliwości laboratoryjne kolejne doświadczenia dotyczące badania potencjału patogeniczności przeprowadzano na larwach barciaka większego (*Galleria mellonella*) **(P2).**

3.2.6.1.2 Badanie potencjału patogeniczności przy użyciu larw barciaka większego (*Galleria mellonella)*

Eksperymenty przeprowadzono na wszystkich szczepach indywidualnie, które wcześniej były poddane stresowi związanemu z przygotowaniem produktów metodą sous vide, ceviche oraz w optymalnych warunkach. Larwy *Galleria mellonella* (n > 10/szczep) zostały zainfekowane szczepami *L. monocytogenes* (ok 100 kom/ larwę). Za pomocą strzykawki Hamilton o pojemności 10 µL, wykonano inokulację bakteryjną w ostatnią parę parasuwek do hemocelu larw w ostatnim stadium larwalnym. Po inokulacji przeprowadzono inkubację w temperaturze 37°C przez 7 dni. Jeśli larwa nie reagowała na dotyk, uznawano ją za martwą. Grupę kontrolną stanowiły larwy *G. mellonella* zainfekowane 0,9% roztworem NaCl. Analizę przeżycia przeprowadzono przy użyciu modelu Kaplana-Meiera, a porównanie krzywych przeżycia wykonano przy użyciu testu logarytmicznego (Logrank test) **(P4, P5)**.

3.2.6.1.3 Oświadczenie etyczne

Wszystkie larwy ryb (*Danio rerio*) były przechowywane w zakładzie hodowli ryb w Laboratorium Genomiki i Transkryptomiki, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, który został zbudowany zgodnie z lokalnymi standardami dobrostanu zwierząt. Larwy barciaka większego (*Galleria mellonella*) były przechowywane w Katedrze Mikrobiologii Żywności, Technologii i Chemii Mięsa, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Wszystkie procedury związane z badaniami na zwierzętach były przeprowadzane zgodnie z wytycznymi dotyczącymi dobrostanu zwierząt obowiązującymi w Polsce i Unii Europejskiej. Zgodnie z Dyrektywą Europejską 2010/63/UE i polskimi przepisami prawnymi Dz.U. z 2015 r. poz. 266, wszystkie procedury przeprowadzone w ramach badań, w tym wykorzystanie wczesnych stadiów życia danio pręgowanego, larw barciaka większego oraz eutanazja, nie wymagały zgody Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach **(P2, P4, P5)**.

3.2.6.2 Badanie zmian profilu antybiotykooporności

Badania zmian wrażliwości na antybiotyki przeprowadzono na szczepach z hodowli 24-godzinnej (kontrola) oraz poddanych stresowi związanemu z obróbką gastronomiczną. Do oceny wrażliwości użyto 16 antybiotyków klinicznych, w tym benzylopenicylinę, ampicylinę, gentamycyny, streptomycyny, klindamycynę, lewofloksacynę, erytromycynę, chinuprystynę/dalofopristynę, linezolid, wankomycynę, tetracyklinę, tygecyklinę, chloramfenikol, daptomycynę, trimetoprim/sulfametoksazolem

i nitrofurantoinę. Do badań użyto automatyczny system VITEK 2 Compact z AST–P643 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francja). Zgodnie z uzyskaną wartością minimalnego stężenia hamującego (MIC) wyniki oceniono zgodnie z kryteriami Instytutu Norm Laboratorium Klinicznego (CLSI M100) (Clinical and Labolatory Standard Institute Instytut Standardów Klinicznych i Laboratoryjnych, 2018) oraz Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) pod kątem oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe **(P4)**.

Przy realizacji badań w publikacji P5 zastosowano 5 różnych antybiotyków: linkomycynę (Sigma Aldrich, Niemcy), fosfomycynę (Sigma Aldrich, Niemcy), tetracyklinę, trimetoprim/sulfametoksazol i klindamycynę (TOKU-E; Belling-ham, WA). Profile wrażliwości na antybiotyki dla każdego szczepu oraz zmiany wywołane ekspozycją na stres izolatów *L. monocytogenes* określono metodą mikrorozcieńczeń zgodnie z normą ISO 20776-1 (British Standards Institution, 2020) przy użyciu 96-dołkowej płytki polistyrenowej z V-kształtnym dnem. Roztwory antybiotyków sporządzono przy użyciu rozpuszczalników i rozcieńczalników zalecanych w normie ISO 20776-1 (załącznik B: Rozpuszczalniki i rozcieńczalniki) (Gajewska i in., 2022). Przed badaniem roztwory antybiotyków były świeżo rozcieńczane zgodnie z normą ISO 20776-1 (załącznik C), w bulionie Mueller-Hinton (Merck, Darmstadt, Niemcy). Stężenie antybiotyku nanoszone na płytkę 96-dołkową (Promed®, Włochy) było 2 razy wyższe niż stężenie docelowe. Izolaty *L. monocytogenes* przesiano na podłoże TSA (Merck, Darmstadt, Niemcy) i inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C. Następnie pojedyncze kolonie zawieszono w 0,9% roztworze NaCl do uzyskania zmętnienia równego 0,5 McFarlanda. Zmętnienie mierzono za pomocą densytometru McFarland DEN 1B (Bioscan, Łotwa). Następnie do dołków w każdym rzędzie 96-dołkowych płytek do roztworu każdego antybiotyku dodano dodano 50 µl hodowli bakterii. Jeden zestaw dołków pozostawiono bez hodowli bakteryjnych jako kontrolę negatywną, a drugi (bez roztworów antybiotyków) jako kontrolę wzrostu. Doświadczenie przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Płytki inkubowano w warunkach tlenowych w temperaturze 35 ± 2°C przez 20 godzin. Po inkubacji zmętnienie podłoża oceniano wizualnie.

Minimalne stężenie hamujące (MIC) stanowiło najniższe stężenie antybiotyku, przy którym nie zaobserwowano wzrostu bakterii. Wyniki zostały zinterpretowane zgodnie z Instytutem Norm Klinicznych i Laboratoryjnych CLSI 2020 (CLSI, 2020) jako wrażliwe, średnio oporne lub oporne. Jako kontrolę jakości zastosowano *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.

3.2.6.3 Badanie zmian ekspresji pod wpływem stresu związanego z obróbka gastronomiczną

3.2.6.3.1 Izolacja RNA i odwrotna transkrypcja na cDNA

Całkowite RNA wyizolowano z całonocnej hodowli (kontrola) oraz szczepów poddanych obróbce gastronomicznej. Do izolacji RNA zastosowano zestaw Total RNA Mini Plus Kit (A&A Biotechnology, Gdynia, Polska), a następnie oczyszczono i zatężono zgodnie z instrukcjami producenta przy użyciu zestawu CleanUp Koncentrator RNA (A&A Biotechnology, Gdynia, Polska). Integralność RNA wszystkich próbek sprawdzono poprzez dodanie 10 µl RNA do 1,2% żelu agarozowego w 0,5% buforze TBE i poddano elektroforezie pod napięciem 90 V przez 1 godzinę. Integralność RNA potwierdzono poprzez wizualizację dwóch prążków (RNA 16S i 23S) z niewielkim rozmyciem. Stężenie i czystość RNA były mierzone optycznie za pomocą spektrofotometru/fluorometru DeNovix DS11 FX (DeNovixInc., Wilmington, Karolina Północna, USA) w oparciu o absorpcję próbki przy długości fali 260 nm i 280 nm. Wszystkie próbki RNA zostały natychmiast częściowo poddane odwrotnej transkrypcji, a reszta przechowywana w temperaturze -80 °C. Próbki RNA znormalizowano do 5 µg/µl i dokonano transkrypcji cDNA z wykorzystaniem zestawu TranScriba (A&A Biotechnology, Gdynia, Polska) do syntezy pierwszej nici cDNA. Zestaw ten wykorzystuje rekombinowaną odwrotną transkryptazę MMLV **(P4, P5)**.

3.2.6.3.2 Analiza ekspresji genów

Do oceny ekspresji pod wpływem stresu wywołanego przygotowaniem ceviche wybrano 9 genów: *cspLA, gadB, opuCA, rpoE, flaA, inlA, mprF, lin* i *fosX*. Natomiast do ekspresji pod wpływem stresu wywołanego przygotowaniem sous vide wybrano 16 genów, z dwóch grup; genów wirulencji z wyspy patogeniczności LIPI-1 (*prfA, plcA, hly, mpl, actA, plcB,* oraz *osfX*) i genów oporności (*drfA, fosX, lin, mpr, tetA1, tetA2, tetA3, tetC, sul*) (Tabela S2). Dla każdego genu wyznaczono linię progową i cykl ilościowy (Cq), określony przy użyciu oprogramowania Rotor-Gene (Qiagen Inc., Montreal, ON, Kanada). Dla każdej pary starterów wyznaczono wydajność amplifikacji jako E = 10 (-1/nachylenie) (Rasmussen, 2001). Poziom ekspresji genów był określony fluorometrycznie przy użyciu barwnika SYBR Green w systemie RotorGene Q (Qiagen Inc., Montreal, ON, Kanada). Próbki były badane pod kątem różnic w ekspresji genów przy użyciu względnej ekspresji, w której istotna ekspresja genów jest normalizowana do genu referencyjnego za pomocą modelu matematycznego zaproponowanego przez Pfaffl

M. (Pfaffl, 2001). Stosunki ekspresji równe lub większe niż 2 reprezentowały istotny wzrost ekspresji genu, podczas gdy stosunki ekspresji równe lub mniejsze niż 0,5 reprezentowały istotny spadek ekspresji genu. Analiza ekspresji genów została przeprowadzona trzykrotnie. Dodatkowo, w każdej replikacji przeprowadzono trzy niezależne reakcje PCR w czasie rzeczywistym. Poziomy ekspresji wykryte dla każdego genu i każdego warunku stresu klasyfikowano jako istotne ($p < 0,05$) na podstawie testu t-Studenta przeprowadzonego przy użyciu poziomu ekspresji genu referencyjnego jako odniesienia.

Reakcje PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzono w końcowej objętości 20 µL, zawierającej 10 µl PowerUp SYBR Green MasterMix (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), 1,0 µl każdego startera (10 pmol/1 µl) oraz 5 ng cDNA jako matrycy, dopełniono destylowaną wodą do objętości docelowej. Warunki reakcji były następujące: 50°C przez 2 minuty, 95°C przez 2 minuty, a następnie 40 cykli: 15 s przy 95°C, 15 s przy dostosowanej do zestawu starterów temperaturze i 60 s przy 72°C. Specyficzność produktu PCR w czasie rzeczywistym została zweryfikowana poprzez konstrukcję krzywej topnienia wyznaczonej poprzez stopniowe podgrzewanie w zakresie od 60 do 95°C z przyrostem temperatury o 0,5°C co 5 s **(P4, P5)**.

3.2.6.3 Analiza statystyczna

Analizy statystyczne przeprowadzono przy użyciu testu t-Studenta i/lub jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) w przypadku analizy redukcji mikroorganizmów. Dla zmian w transkryptomie, analizy przeprowadzono przy użyciu dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) dla grup genów. W analizach, wartość $p \leq 0,05$ uważano za istotną. Analizy statystyczne przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Prism 8.0.1 (Prism, GraphPad Software, San Diego, CA).

4. Rezultaty badań przedstawione w powiązanym tematycznie cyklu publikacji

Szczegółowy opis uzyskanych wyników badań przedstawiono w publikacjach będących podstawą niniejszej pracy.

4.1. Przegląd systematyczny i metaanaliza

Przeprowadzono systematyczną analizę 581 prac, spośród których dokładnie oceniono 106. Ostatecznie do metaanalizy włączono 46 prac. Szczegółowe informacje dotyczące uwzględnionych prac znajdują się w Tabeli 1 **(P1)**.

W badaniach, które stanowiły podstawę metaanalizy, przeanalizowano łącznie 14 496 próbek, w tym odpowiednio 7135 prób i 2395 prób surowych ryb pod kątem występowania odpowiednio *L. monocytogenes* i *Listeria* sp.

4.2. Występowanie *L. monocytogenes* oraz *Listeria* sp. w rybach, produktach z ryb i środowisku przetwórczym

Po analizie danych stwierdzono, że *L. monocytogenes* występowała w podobnym stopniu w surowych rybach (5,8%) i próbach z przetwórstwa ryb (10,0%). Częstsze występowanie obserwowano w gotowych do spożycia produktach, 14,5% dla *L. monocytogenes* i 21,7% dla *Listeria* sp. Ogólne występowanie *Listeria* sp. w surowych rybach wyniosła 12,2% (**P1,** Tabela 2).

Analiza statystyczna wykazała istotne różnice w częstości występowania *L. monocytogenes* wewnątrz różnych badanych grup ($p < 0,000001$), z wyjątkiem półproduktów z ryb ($p = 0,1771$). Wyniki były podobne również dla *Listeria* sp., wykazano istotne różnice statystyczne wewnątrz grup z wyjątkiem prób półproduktów z ryb ($p = 0,6432$) (**P1)**.

W badaniu podzielono źródła izolacji *L. monocytogenes* z surowych ryb na ich rodziny (**P1**, Tabela 3), a dodatkowo udało się wyróżnić kilka gatunków (**P1,** Tabela 5). Wyniki sugerują, że rodziny flądrowatych (*Pleuronectidae)* i łososiowatych (*Salmonidae)* są najczęściej zanieczyszczone *L. monocytogenes*, ogólne występowanie wynosi odpowiednio 21,4% i 28,5%. Brak obecności tego patogenu wykazano w rybach z rodziny węgorzowatych (*Anguillidae*), natomiast w niewielkim odsetku (<1%) występował on wśród ryb z rodzin makrelowatych (*Scombridae,*0,7%) i sardelowatych (*Engraulidae*, 0,9%). Analiza częstości występowania *L. monocytogenes*

w poszczególnych gatunkach wykazała, że prawie 50,0% cefli pospolitych (*Mugil cephalus*) było źródłem *L. monocytogenes*. Ryby należące do gatunków pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss)* i łososia atlantyckiego (*Salmo salar)* były również częstym źródłem patogenu, *L. monocytogenes* wyizolowano odpowiednio z 36,9% i 30,3% prób. Istnieje znacznie mniej badań dotyczących występowania innych gatunków *Listeria* w rybach i innych produktach spożywczych, ale udało się wyróżnić 4 rodziny (**P1,** Tabela 4) i 4 gatunki (**P1,** Tabela 6). Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że bakterie z rodzaju *Listeria* występują w co piątej surowej rybie z rodziny karpiowatych (*Cyprinidae*, 20,6%), stosunkowo często izolowane są także z ryb z rodziny łososiowatych (*Salmonidae,* 14,4%). Najrzadziej natomiast *Listeria* sp. były izolowane z ryb z rodziny dorszowatych (*Gadidae*, 3,1%) (**P1,** Tabela 4). Gatunkiem, z którego najczęściej izolowano bakterie z rodzaju *Listeria*, był karp (*Cyprinus carpio*, 21,5%), najrzadszym źródłem tych bakterii był witlinek (*Merlangius merlangus)*, dla którego ogólna częstość występowania wynosiła 3,1% (**P1,** Tabela 6).

4.3. Analiza meta-regresji

Jako zmienną kategorialną dla meta-regresji wybrano rok publikacji. Wyniki meta-regresji pokazują spadkową tendencję występowania *L. monocytogenes* w surowych rybach na przestrzeni 10 lat (2013-2023), jednakże ta tendencja jest bardzo niewielka (współczynnik - 0,005862. Wartość p: <0,000001. 95% CI: - 0,007614: - 0,004111) (**P1,** Ryc. 2). Podobne obserwacje odnotowano dla *Listeria* sp. izolowanych z surowych ryb, z niewielką spadkową tendencją, przy niskim współczynniku - 0,009656 (95% CI: - 0,018372: -0,00094). Te zmiany są istotne statystycznie (Wartość p: 0,029905) (**P1,** Ryc. 4).

Bardziej zauważalną tendencję spadkową zaobserwowano dla częstości izolacji *L. monocytogenes* z produktów gotowych do spożycia z ryb na przestrzeni lat, z współczynnikiem równym - 0,01277. Wartość p: -0,012942, 95% CI: - 0,019301: - 0,006238) (**P1,** Ryc. 4). Pomimo niewielkiej liczby prac dotyczących obecności *Listeria* sp. w gotowych do spożycia produktach zaobserwowano spadek z współczynnikiem równym -0,033807 (CI: - 0,048421: - 0,019192) a wartość p wynosiła 0,000006 (**P1,** Ryc. 5).

4.4. Występowanie *L. monocytogenes* w rybach i produktach z ryb w subgrupach

Ze względu na niewielką liczbę publikacji, w których badano występowanie *Listeria* sp., analiza występowania w podgrupach, regionach i statusie ekonomicznym regionu została ograniczona do *L. monocytogenes* izolowanych z surowych ryb i gotowych do spożycia produktów rybnych. Na podstawie dostępnych danych Ameryka Północna charakteryzowała się najwyższą częstością występowania (22,2%, 95% CI: 13,9–30,4) w surowych rybach, podobnie jak Azja, (16,5%, 95% CI: 12,6–20,4). W Europie występowanie *L. monocytogenes* w surowych rybach było najniższe (2,2%, 95% CI: 1,7–2,8) (**P1,** Ryc. 6). Natomiast występowanie tego patogenu w gotowych do spożycia produktach rybnych w Europie było znacznie wyższe i wynosiło 19,2% (95% CI: 13,0–25,4), podczas gdy w krajach azjatyckich jest znacznie niższa niż w surowych produktach i wynosiła 8,5% (95% CI: 4,2–12,7). Niestety, nie udało się zgromadzić tych danych dla Ameryki Północnej (**P1,** Ryc. 7).

W analizie występowania *L. monocytogenes* w poszczególnych krajach zaobserwowano, że Wielka Brytania wyróżnia się spośród innych krajów, gdzie ogólna częstość występowania wyniosła aż 76,9% (95% CI: 61,8–91,9). Różnica między innymi krajami jest istotna; w Polsce wynosiła 30,3% (95% CI: 14,8–45,8), w USA 23,28% (95% CI: 14,0–32,6), a w Portugalii 22,9% (95% CI: 0,00–71,7). Najniższą częstością występowania tego patogenu w surowych rybach stwierdzono w Iranie, Chinach i Australii, gdzie ogólna częstość występowania wynosiła odpowiednio 2,6% (95% CI: 1,0–4,2), 2,19% (95% CI: 1,7–2,7) i 0,0% (95% CI: 0,0–1,5) (**P1,** Ryc. 8). Nie było możliwe odróżnienie wielu krajów w analizie gotowych do spożycia produktów, jednakże na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że najwyższy odsetek próbek pozytywnych znaleziono w Polsce (27,7%, 95% CI: 2,4–52,9) i Belgii (26,0%, 95% CI: 7,7–44,4) (**P1,** Ryc. 9).

Na podstawie analizy występowania *L. monocytogenes* w gotowych do spożycia produktach rybnych w krajach o wysokim dochodzie i krajach o niskim lub średnim dochodzie, odnotowano podobną częstość występowania wynoszącą odpowiednio 13,8% (95% CI: 9,7–17,9) i 12,2% (95% CI: 6,0–18,5). Analiza statystyczna wykazała, że różnice wewnątrz grup oraz między grupami są istotne, a wartość p wynosi <0,000001. Jednakże obserwowano ogromne rozbieżności w występowaniu *L. monocytogenes* w surowych rybach, gdzie w krajach o niskim lub średnim dochodzie wynosiło tylko

3,0% (95% CI: 2,3–3,7), podczas gdy w krajach o wysokim dochodzie wynosiło aż 15,0% (95% CI: 11,9–18,1). Analiza statystyczna wykazała, że różnice wewnątrz grup są istotne, a wartość p wynosi <0,000001, jednakże różnice między grupami nie są istotne, a wartość p wynosi 0,3329 (**P1,** Tabela 7).

4.5. Analiza MLST

Na podstawie analizy MLST siedemnastu szczepów zidentyfikowano jedenaście różnych typów sekwencji MLST (ST): ST6 (11,76%, n = 2 izolaty), ST8 (23,53%, n = 4), ST9 (5,88%, n = 1), ST31 (5,88%, n = 1), ST37 (5,88%, n = 1), ST59 (5,88%, n = 1), ST77 (5,88%, n = 1), ST87 (5,88%, n = 1), ST101 (5,88%, n = 1), ST121 (17,65%, n = 3) i ST193 (5,88%, n = 1). Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić, że dominująca liczba szczepów należy do Linii II (72,2%), a pozostałe szczepy do Linii I (27,8%) **(P3)**.

4.6. Analiza cgMLST

Uzyskane wyniki wskazują, że badane izolaty należały do 14 różnych typów cgMLST (CT), z czego najwięcej (17,65%) należało do typu CT-1151, a wszystkie te szczepy zostały wyizolowane z wędzonego łososia. Dodatkowo, dwa szczepy (11,76%) należały do typu CT909 i również zostały wyizolowane z wędzonego łososia. Zaobserwowano występowanie jednego szczepu o typie CT11711, CT11716, CT11717, CT11718, CT1824, CT2283, CT443, CT5641, CT58, CT7220, CT7227 i CT893 (**P3,** Rycina 2).

4.7. Ocena wirulomu

Analizowano obecność wysp patogenności *L. monocytogenes* oraz 63 innych genów. Wszystkie badane szczepy posiadały geny z LIPI-1. Dwanaście szczepów (70,59%) posiadało tylko jeden gen z wyspy LIPI-2. W trzech szczepach (17,65%), zaobserwowano obecność LIPI-3, zawierającej osiem genów: *llsA, llsG, llsH, llsX, llsB, llsY, llsD* i *llsP*. Natomiast jeden szczep z serogrupy IIb ST87 (5,88%), wyizolowany z wędzonego łososia, zawierał LIPI-4. Analiza genomów wykazała, że badane szczepy można podzielić na 14 unikalnych typów pod względem profilu wirulencji, przy czym tylko szczepy Lm_1, Lm_2, Lm_13 i Lm_16 należały do jednego typu. Wszystkie badane izolaty posiadały cztery geny (*inlA, inlE, inlH* i *inlC2*) z rodziny genów internalin, podczas gdy geny *inlB, inlC, inlJ, inlK* i *inlD* były obecne wśród 94,12% izolatów (**P3**, Rycina 3).

4.8. Analiza rezystomu

Najczęściej występującymi czynnikami oporności przeciwdrobnoustrojowej były te kodujące oporność na tetracykliny, w tym geny *lmo0839*, *tetA_3* i *tetC*, które były obecne u wszystkich szczepów. Geny *tetA_2* i *tetA_1* występowały odpowiednio w 94,1% i 72,2% izolatów. Oprócz genów oporności na tetracykliny, we wszystkich próbkach stwierdzono geny oporności na linkomycynę (*lmo0919),* trimetoprim (*sul)* oraz daunorubicynę (*lmo0979*). Obecność transpozonu Tn6188 zaobserwowano u czterech szczepów, zawierających geny kodujące oporność na chlorek benzalkoniowy Tn6188_*qac*, tetracykliny Tn6188_*tetR* i makrolidy Tn6188_*ermC*. Jednak tylko jeden gen (Tn6188_*ermC*) został znaleziony u wszystkich czterech szczepów. Co ciekawe, tylko jeden szczep wyizolowany z wędzonego łososia posiadał gen *aacA4*, kodujący oporność na aminoglikozydy. Ponadto w każdej z prób zauważono geny kodujące oporność na toksyczne jony (*lmo1961*), w tym gen kodujący oporności na kamforę, białko CrcB (*lmo2082*) oraz aluminium (*lmo1297*). Geny kodujące oporność na kadm stwierdzono u 47,05% szczepów (*cadC*) i 41,18% szczepów (*cadA*) (**P3**, Rycina 4).

4.9 Analiza potencjału chorobotwórczego szczepów *L. monocytogenes*

Przeanalizowane zostały wyniki eksperymentalnej infekcji wczesnych larw *Danio rerio* przez szczepy *L. monocytogenes, L. innocua* i *L. welshimeri*. Najniższe przeżycie larw po 72 godzinach można zaobserwować w przypadku infekcji szczepami *L. monocytogenes* (46,5%). Średnie przeżycie larw zainfekowanych *L. innocua* było wyższe i wyniosło 64,2%; najwyższy wskaźnik przeżycia zaobserwowano u larw zainfekowanych *L. welshimeri*, który wyniósł 83,0%. Różnice między gatunkami są istotne statystycznie (wartość $p < 0,0001$) (**P2**, Rycina 1).

Wskaźnik przeżycia larw zainfekowanych *L. monocytogenes* różnił się istotnie statystycznie (wartość $p < 0,0001$) między szczepami. Po 72 godzinach eksperymentu zaobserwowano, że wskaźnik przeżycia wahał się od 0,0% do 95,5%. W przypadku jednego szczepu żadna z zainfekowanych larw nie przeżyła 48h eksperymentu (**P2**, Rycina 2).

4.10 Przeżywalność szczepów *L. monocytogenes* podczas obróbki gastronomicznej

W eksperymencie zaobserwowano, że tradycyjne wykorzystanie papryki habanero i kolendry nie miało wpływu na redukcję *L. monocytogenes* (**P4,** Rycina 2). Użycie cebuli

zredukowało minimalną ilość żywych komórek *L. monocytogenes,* po 30 minutach odnotowano spadek na poziomie 0,07%, a więc na granicy błędu. Spośród czterech składników użytych do przygotowania ceviche, sok z limonki okazał się najbardziej skuteczny, natomiast wciąż przeżyło >99% komórek. Badania redukcji mikroorganizmów podczas przygotowywania ceviche wykazały, że kompleksowe działanie wielu składników jest skuteczniejsze niż działanie pojedynczych składników (**P4,** Ryciny 2 i 3), natomiast redukcja osiągnęła zaledwie 1,5%.

Większą redukcję zaobserwowano podczas obróbki sous vide. Wyniki różniły się między szczepami, najbardziej wrażliwy na działanie wysokiej temperatury szczep osiągnął po 60 minutach w temperaturze 60°C, poziom 69,66% żywych komórek. Natomiast, najbardziej oporny szczep osiągnął 90,66%. Obie niższe temperatury, tj. 42 i 52°C, nie wpłynęły na szczepy *L. monocytogenes*, redukcja żywych komórek była marginalna, wynosząc 0,5–1,9% dla 42°C i 1,2–3,5% dla 52°C. Gotowanie metodą sous vide w temperaturze 57°C zredukowało liczbę żywych komórek do 94,9%. (**P5,** Rycina 1).

4.11 Zmiany potencjału chorobotwórczości pałeczek *L. monocytogenes* po działaniu stresu podczas obróbki gastronomicznej

W przeprowadzonym eksperymencie na modelu żywym, wykorzystując larwy *G. mellonella*, zaobserwowano, że wyniki uzyskane z próby kontrolnej i z procesu przygotowywania ceviche różniły się istotnie statystycznie ($p < 0,05$) (**P4,** Rycina 4). Tylko jeden szczep okazał się bardziej wirulentny po procesie przygotowywania ceviche niż przed nim. W przypadku pozostałych szczepów zaobserwowano znaczący spadek umieralności larw. Najbardziej drastyczne zmiany wystąpiły w przypadku szczepu, gdzie zarejestrowano śmierć każdej zainfekowanej larwy po 48 godzinach, podczas gdy po 168 godzinach od przygotowania ceviche żyło jeszcze 60% larw (**P4)**.

Natomiast w przypadku działania stresu podczas przygotowania sous vide stwierdzono, że dla szczepów hodowanych w optymalnych warunkach, średnie przeżycie larw wynosiło zaledwie 11,46%. Dla najmniej wirulentnego szczepu, wskaźnik przeżycia wyniósł około 33,33%. Badanie wykazało, że stres termiczny obniża potencjał wirulencji szczepów, a średni wskaźnik przeżycia wzrósł do 58,81%. Dla szczepu Lm_1, nie poddanego warunkom stresowym stwierdzono, że wszystkie larwy były martwe po 72 godzinach, podczas gdy po działaniu stresem, okazało się, że nawet w ostatnim (7 dniu) żyło jeszcze 50% larw (**P5**, Rycina 3).

4.12 Zmiany profilu anybiotykooporności pałeczek *L. monocytogenes* po działaniu stresu podczas obróbki gastronomicznej

W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że spośród 18 testowanych antybiotyków, w przypadku 11 nie zaobserwowano zmian wartości MIC dla pałeczek *L. monocytogenes* spowodowanych stresem związanym z przygotowywaniem ceviche (**P4,** Rycina 6) w przypadku obróbki sous vide były to 2 antybiotyki: linkomycyna i trimetoprim/sulfametoksazolem (**P5,** Rycina 4). Zmiany u największej liczby szczepów zaobserwowano w przypadku nitrofurantoiny, dla której przygotowanie ceviche spowodowało zmniejszenie wartości MIC dla większości szczepów. W przypadku stresu termicznego największe zmiany odnotowano dla tetracykliny. Stwierdzono wzrost oporności u 3 szczepów (Lm_1, Lm_2 oraz Lm_3), gdzie dla jednego z tych szczepów wzrósł on pięciokrotnie (**P5,** Rycina 4). Dla lewofloksacyny wartość MIC wzrosła dla aż sześciu szczepów, podczas gdy dla czterech zmniejszyła się. Największy spadek stwierdzono w przypadku nitrofurantoiny i chloramfenikolu, które dla niektórych szczepów był trzykrotnie niższy niż w warunkach optymalnych. W przeciwieństwie do tego, największy wzrost wartości MIC zaobserwowano dla daptomycyny (pięciokrotny wzrost) (**P4,** Rycina 6).

4.13 Zmiany ekspresji genów wirulencji i antybiotykooporności pałeczek *L. monocytogenes* po działaniu stresu podczas obróbki gastronomicznej

W przeprowadzonym badaniu przetestowano ekspresję 9 wybranych genów (*cspLA, gadB, opuCA, rpoE, flaA, inlA, mprF,* lin oraz *fosX*) dla dwóch serotypów *L. monocytogenes* 1/2a i 1/2c (bazując na reakcji PCR). Wyniki badań wykazały, że dla ekspresji genów z każdej z grupy genów (wirulencji, genów oporności i genów odpowiedzi na stres) uzyskano wyższe wyniki dla serotypu 1/2a. Porównując geny bezpośrednio lub pośrednio związane z wirulencją, zauważono, że znaczącą nadekspresję zaobserwowano w przypadku genu *inlA*, natomiast stres związany z przygotowywaniem ceviche nie wpłynął znacząco na względną ekspresję genu *flaA* odpowiedzialnego za ruch (**P4,** Rycina 5). Badając odpowiedź na stres termiczny związany z przygotowaniem sous vide porównano geny z LIPI-1 i stwierdzono, że u żadnego z tych genów nie zaobserwowano istotnej nadekspresji. Geny *prfA, acta, plc* i *mpl* z z LIPI-1, po stresie termicznym, miały podobne poziomy ekspresji jak w warunkach optymalnych, przy czym

gen *mpl*, prekursor metaloproteinazy cynku, wykazywał najwyższą ekspresję (1,27). Jednakże w przypadku dwóch genów, *plcA* (białko regulujące pozytywnie listeriolizynę) i *osfX*, zauważono istotne zahamowanie ekspresji, których wartości wynosiły odpowiednio 0,03 i 0,01 (**P5,** Rycina 2).

Dla genów oporności na antybiotyki, wykazano nadekspresję genów w przypadku *fosX* i *mpr* podczas stresu związanego z przygotowywaniem ceviche. Z kolei obniżoną ekspresję zaobserwowano dla genu *lin* odpowiedzialnego za oporność na linkomycynę. Dla serotypu 1/2c nie odnotowano obniżenia lub podwyższenia ekspresji dla żadnego z badanych genów (**P4,** Rycina 5). W przypadku genów oporności na antybiotyki, wykazano, że stres związany z przygotowaniem sous vide spowodował nadekspresję niektórych genów kodujących oporność na tetracykliny. Dla genu *tetA2* wyniki względnej ekspresji wynosiły 3,44, podczas gdy dla genu *tetC* wartość wynosiła aż 3,56. Dla genu *tetA3* również zaobserwowano wzrost względnej ekspresji, ale nie został on uznany za istotny (1,95). Pozostałe geny oporności wykazywały ekspresję podobną do tej w warunkach optymalnych (**P5,** Rycina 2).

5. Wnioski i podsumowanie badań

Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowano następujące wnioski:

1) Ryby i owoce morza oraz środowisko przetwórcze są istotnym źródłem bakterii z rodzaju *Listeria* w tym *L. monocytogenes* (H1)
2) Występowanie *L. monocytogenes* i *Listeria* sp. obserwowano częściej w gotowych do spożycia produktach rybnych niż w surowych rybach lub półproduktach (H1).
3) Pałeczki różnych gatunków rodzaju *Listeria* głównie izolowano z ryb z rodziny karpiowatych (*Cyrprinidae*)
4) Pałeczki *L. monocytogenes* najczęściej izolowano z ryb z rodziny flądrowatych (*Pleuronectidae)* i łososiowatych (*Salmonidae)* (H1).
5) Analiza danych wskazuje na niewielki, ale istotny statystycznie spadek częstości występowania *L. monocytogenes* i *Listeria* sp. w surowych rybach oraz produktach gotowych do spożycia z ryb na przestrzeni lat 2003-2023 (H1).
6) Szczepy *L. monocytogenes* izolowane z ryb i owoców morza charakteryzuje duża fenotypowa heterogeniczność pod względem potencjału chorobotwórczego (H2).

7) Istnieje duża heterogeniczność genetyczna szczepów izolowanych z ryb, produktów gotowych do spożycia z ryb oraz ze środowiska przetwórstwa ryb, ale najczęściej występującym typem klonalnym jest CT-115, a analiza porównawcza wirulomu pozwala stwierdzić, że szczepy izolowane z surowców i produktów z ryb są zbliżone genetycznie do szczepów izolowanych od pacjentów chorujących na listeriozę (H2).
8) Mimo obecności wielu genów oporności w genomie pałeczek *L. monocytogenes* izolowanych z ryb, produktów gotowych do spożycia z ryb oraz ze środowiska przetwórstwa ryb pałeczki te najczęściej wykazują wrażliwość na najistotniejsze klinicznie antybiotyki stosowane w przypadku listeriozy (H2).
9) Szczepy *L. monocytogenes* posiadają liczne plazmidy i transpozony, kodujące oporność między innymi na tetracykliny (*tetC),* co stwarza ryzyko przekazywania ich innym organizmom, w tym patogennym (H2).
10) Analizy cytometryczne wskazują na możliwość przeżycia komórek *L. monocytogenes* podczas obróbki ryb metodą sous vide oraz po przygotowaniu ceviche (H3).
11) Zainfekowanie organizmów modelowych szczepami *L. monocytogenes* uprzednio poddanymi stresowi, wywołanemu obróbką ryb metodą sous vide oraz przygotowaniem ceviche, obniża ich śmiertelność*,* ale dla pojedynczych szczepów można zaobserwować jej wzrost (H3, H4).
12) Za wzrost śmiertelności organizmów modelowych, zainfekowanych pałeczkami *L. monocytogenes* poddanych stresowi termicznemu odpowiadają geny wirulencji inne niż te znajdujące się na LIPI-1 (H4).
13) Stres związany z przygotowywaniem ceviche powoduje nadekspresję genu *inlA*- kluczowego do wywoływania listeriozy u ludzi (H3).
14) Stres środowiskowy związany z przygotowaniem ceviche z ryb może zmniejszyć wartość MIC u *L. monocytogenes* dla nitrofurantoiny, natomiast zwiększyć dla doptamycyny poprzez zwiększenie ekspresji genu *mpr* (H3).
15) Obróbka ryb metodą sous vide może wpływać na zmianę oporności na antybiotyki u pałeczek *L. monocytogenes.* Stres termiczny wpływa na zwiększenie wartości MIC dla tetracykliny, przez nadekspresję genów *tetA2* oraz *tetC* i może zmniejszyć MIC dla ciprofloksacyny (H4).

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej potwierdziły postawione hipotezy. Wyniki badań zaprezentowane w powiązanym tematycznie cyklu publikacji pt. „Warunki stresowe podczas otrzymywania produktów gotowych do spożycia z ryb i krewetek a możliwość przeżycia oraz odpowiedź komórkowa bakterii z rodzaju *Listeria* sp.” mają charakter przede wszystkim poznawczy, a także wnoszą nowe informacje dotyczące odpowiedzi komórkowej *L. monocytogenes* podczas minimalnej obróbki ryb, co sugeruje konieczność zwiększenia kontroli jakości i procedur higienicznych w produkcji gotowych do spożycia produktów rybnych. Ponadto, badania prowadzone w niniejszej pracy wykazały, że zarówno technika sous vide jak i ceviche przy wysokiej liczbie *L. monocytogenes* w surowcu mogą być niewystarczające do zapewnienia bezpieczeństwa mikrobiologicznego zatem do obróbki gastronomicznej tymi technikami należy stosować tylko sprawdzone, najwyższej jakości surowce. Należy jednak zaznaczyć, iż mimo potwierdzenia głównych hipotez badawczych konieczne jest prowadzenie dalszych badań naukowych, gdyż prowadzone badania miały swoje ograniczenia. Wydaje się zatem zasadne rozszerzenie prowadzonych badań naukowych w szczególności o analizę sekwencjonowania RNA, które pozwala na dokładne określenie poziomu ekspresji, nie tylko wybranych, ale wszystkich genów, a dodatkowo prowadzić badania na komórkach ludzkich, które stanowiłyby doskonałe uzupełnienie do modeli żywych.

Literatura:

Animals in science z https://environment.ec.europa.eu/topics/chemicals/animals-science_en (25 październik 2023)

Begley, M., & Hill, C. (2015). Stress adaptation in foodborne pathogens. *Annual review of food science and technology*, 6, 191–210. https://doi.org/10.1146/ANNUREV-FOOD-030713-092350

Bottéro, J. (2004). *The oldest cuisine in the world: Cooking in Mesopotamia*. University of Chicago Press.

Bowman, J. P., Bittencourt, C. R., & Ross, T. (2008). Differential gene expression of Listeria monocytogenes during high hydrostatic pressure processing. *Microbiology*, 154(2), 462–475. https://doi.org/10.1099/MIC.0.2007/010314-0

British Standards Institution. (2019). *Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices. Part 1, Broth micro-dilution reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. (ISO 20776-1:2019)*

Carattoli, A., Zankari, E., Garciá-Fernández, A., Larsen, M. V., Lund, O., Villa, L., Aarestrup, F. M., & Hasman, H. (2014). In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *58*(7), 3895–3903. https://doi.org/10.1128/AAC.02412-14

Carpentier, B., Barre, L., Barbuti, S., Canet Noguera, J., da Silva Mateus Fernandes Guedes, H., Dufour, B., Español Pueyo, A. ., Ferreira Tavares, A. L., Gram, L., Grégori, T., Hickey, B., Lago, J., Leglise, P., Orfão Ferraz, A. S., Pardos Bosch, J., Pires Gomes, C. M., Sanchez, N., Sanchez Hernandez, J., Sol, M., … Kramarenko, J. T. (2012). *Guidelines on sampling the food processing area and equipment for the detection of Listeria monocytogenes*. https://doi.org/10.5281/ZENODO.8042074

CLSI. (2020). CLSI M100-ED29: 2021 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 30th Edition. W *Clsi* (T. 40, Numer 1).

Coşansu, S., Mol, S., & Haskaraca, G. (2022). Sous-vide cooking: Effects on seafood quality and combination with other hurdles. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, *29*. https://doi.org/10.1016/J.IJGFS.2022.100586

Davidson, A. (2014). *The Oxford companion to food*. Oxford University Press. 10.1093/acref/9780192806819.001.0001

Dawan, J., & Ahn, J. (2022). *Bacterial Stress Responses as Potential Targets in Overcoming Antibiotic Resistance*. Microorganisms, 10(7). https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10071385

Día del ceviche peruano: historia, origen, receta y tipos de preparación del plato bandera de la gastronomía peruana. (2019). https://larepublica.pe/sociedad/2019/06/28/dia-nacional-del-ceviche-como-se-origino-este-potaje-y-todas-sus-variaciones-hasta-ahora-atmp (26 październik 2023)

Duarte-Casar, R., Robalino-Vallejo, J., Buzetta-Ricaurte, M. F., & Rojas-Le-Fort, M. (2022). Toward a characterization of Ecuadorian ceviche: much more than shrimp.

Journal of Ethnic Foods, *9*(1), 1–12. https://doi.org/10.1186/S42779-022-00131-W/FIGURES/6

European Food Safety Authority. (2013). *Listeria.* https://doi.org/10.2805/52269

FAO. (1999). *Report of the FAO Expert Consultation on the Trade Impact of Listeria in Fish Products : Amherst, MA, United States, 17-20 May 1999*. FAO. http://www.fao.org/3/x3018e/x3018e00.htm

Fernandez, D. G., & Choy, C. C. (2019). Tikim: Essays on Philippine Food and Culture. W *Tikim: Essays on Philippine Food and Culture*. Brill. https://doi.org/10.1163/9789004414792

Fetterman, L. Q., Halm, M., & Peabody, S. (2016). *Sous Vide at Home The Modern Technique for Perfectly Cooked Meals*. Clarkson Potter/Ten Speed. https://www.barnesandnoble.com/w/sous-vide-at-home-lisa-q-fetterman/1123383554

Gajewska, J., Chajęcka-Wierzchowska, W., & Zadernowska, A. (2022). Occurrence and characteristics of *Staphylococcus aureus* strains along the production chain of raw milk cheeses in Poland. *Molecules 2022, 27*(19), 6569. https://doi.org/10.3390/MOLECULES27196569

González-Fandos, E., Villarino-Rodríguez, A., García-Linares, M. C., García-Arias, M. T., & García-Fernández, M. C. (2005). Microbiological safety and sensory characteristics of salmon slices processed by the sous vide method. *Food Control*, *16*(1), 77–85. https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2003.11.011

Gómez, D., Iguácel, L. P., Rota, M. C., Josécarramiñana, J., Ariño, A., & Yangüela, J. (2015). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meat products and meat processing plants in Spain. *Foods*, *4*(3), 271–282. https://doi.org/10.3390/FOODS4030271

Haase, J. K., Didelot, X., Lecuit, M., Korkeala, H., Achtman, M., Leclercq, A., Grant, K., Wiedmann, M., & Apfalter, P. (2014). The ubiquitous nature of *Listeria monocytogenes* clones: A large-scale Multilocus Sequence Typing study. *Environmental Microbiology*, *16*(2), 405–416. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12342/SUPPINFO

Haley, B. J., Sonnier, J., Schukken, Y. H., Karns, J. S., & Van Kessel, J. A. S. (2015). Diversity of *Listeria monocytogenes* within a U.S. dairy herd, 2004-2010. *Foodborne pathogens and disease*, *12*(10), 844–850. https://doi.org/10.1089/FPD.2014.1886

Jami, M., Ghanbari, M., Zunabovic, M., Domig, K. J., & Kneifel, W. (2014). *Listeria monocytogenes* in aquatic food products-a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *13*(5), 798–813. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12092

Jurafsky, D. (2014). *The language of food: A linguist reads the menu*. WW Norton & Company.

Kathuria, D., Dhiman, A. K., & Attri, S. (2022). Sous vide, a culinary technique for improving quality of food products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, *119*, 57–68. https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2021.11.031

Kuenne, C., Billion, A., Mraheil, M. A., Strittmatter, A., Daniel, R., Goesmann, A., Barbuddhe, S., Hain, T., & Chakraborty, T. (2013). Reassessment of *the Listeria monocytogenes* pan-genome reveals dynamic integration hotspots and mobile genetic elements as major components of the accessory genome. *BMC genomics*, *14*(1). https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-47

Listeria infections increase in vulnerable groups | EFSA. (2018, https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/180124 (22.08.2023)

Lunamarina. (2018). *The Rapid Alert System for Food and Feed 2017 Annual Report*. Luxembourg: Publications Office of the European Union

Matle, I., Mbatha, K. R., & Madoroba, E. (2020). A review of *Listeria monocytogenes* from meat and meat products: Epidemiology, virulence factors, antimicrobial resistance and diagnosis. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, *87*(1), 1–20. https://doi.org/10.4102/OJVR.V87I1.1869

Mauder, N., Williams, T., Fritsch, F., Kuhn, M., & Beier, D. (2008). Response regulator degu of *Listeria monocytogenes* controls temperature-responsive flagellar gene expression in its unphosphorylated state. *Journal of Bacteriology*, *190*(13), 4777. https://doi.org/10.1128/JB.00258-08

Meza-Torres, J., Lelek, M., Quereda, J. J., Sachse, M., Manina, G., Ershov, D., Tinevez, J. Y., Radoshevich, L., Maudet, C., Chaze, T., Gianetto, Q. G., Matondo, M., Lecuit, M., Martin-Verstraete, I., Zimmer, C., Bierne, H., Dussurget, O., Cossart, P., & Pizarro-Cerdá, J. (2021). Listeriolysin S: A bacteriocin from *Listeria monocytogenes* that induces membrane permeabilization in a contact-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *118*(40), e2108155118. https://doi.org/10.1073/PNAS.2108155118

Mouritsen, O. G., & Styrbæk, K. (2017). 5. Playing Around with Mouthfeel. *Mouthfeel*, 113–206. https://doi.org/10.7312/MOUR18076-006/HTML

Muchaamba, F., Eshwar, A. K., Stevens, M. J. A., Stephan, R., & Tasara, T. (2022a). different shades of *Listeria monocytogenes*: strain, serotype, and lineage-based variability in virulence and stress tolerance profiles. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 792162. https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.792162/BIBTEX

Nikitas, G., Deschamps, C., Disson, O., Niault, T., Cossart, P., & Lecuit, M. (2011). Transcytosis of *Listeria monocytogenes* across the intestinal barrier upon specific targeting of goblet cell accessible E-cadherin. *Journal of Experimental Medicine*, *208*(11), 2263–2277. https://doi.org/10.1084/JEM.20110560/VIDEO-3

Orsi, R. H., & Wiedmann, M. (2016). Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(12), 5273–5287. https://doi.org/10.1007/S00253-016-7552-2/TABLES/1

Osek, J., Lachtara, B., & Wieczorek, K. (2022). *Listeria monocytogenes* – How This Pathogen Survives in Food-Production Environments? *Frontiers in Microbiology*, *13*, 866462. https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.866462/BIBTEX

Papić, B., Golob, M., Kušar, D., Pate, M., & Zdovc, I. (2019). Source tracking on a dairy farm reveals a high occurrence of subclinical mastitis due to hypervirulent *Listeria monocytogenes* clonal complexes. *Journal of Applied Microbiology*, *127*(5), 1349–1361. https://doi.org/10.1111/JAM.14418

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, *29*(9), E45. https://doi.org/10.1093/NAR/29.9.E45

Pouillot, R., Klontz, K. C., Chen, Y., Burall, L. S., Macarisin, D., Doyle, M., Bally, K. M., Strain, E., Datta, A. R., Hammack, T. S., & Van Doren, J. M. (2016). Infectious dose of *Listeria monocytogenes* in outbreak linked to ice cream, United States, 2015 - Volume 22, Number 12—December 2016 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. *Emerging Infectious Diseases*, *22*(12), 2113–2119. https://doi.org/10.3201/EID2212.160165

Quereda, J. J., Morón-García, A., Palacios-Gorba, C., Dessaux, C., García-del Portillo, F., Pucciarelli, M. G., & Ortega, A. D. (2021). Pathogenicity and virulence of *Listeria monocytogenes*: A trip from environmental to medical microbiology. *Virulence*. *12*(1), 2509–2545. *https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1975526*,

Rasmussen, R. (2001). Quantification on the LightCycler. *Rapid Cycle Real-Time PCR*, 21–34. https://doi.org/10.1007/978-3-642-59524-0_3

Renna, M., Gonnella, M., Giannino, D., & Santamaria, P. (2014). Quality evaluation of cook-chilled chicory stems (*Cichorium intybus* L., Catalogna group) by conventional and sous vide cooking methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *94*(4), 656–665. https://doi.org/10.1002/JSFA.6302

Rondón, V., & König, J. M. I. (2014). The Patriotic Songs of José Bernardo Alzedo (1788-1878). *Revista musical chilena*, *68*(222), 12–34. https://doi.org/10.4067/S0716-27902014000200002

Ryu, J., Park, S. H., Yeom, Y. S., Shrivastav, A., Lee, S. H., Kim, Y. R., & Kim, H. Y. (2013). Simultaneous detection of *Listeria* species isolated from meat processed foods using multiplex PCR. *Food Control*, *32*(2), 659–664. https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2013.01.048

Schlech, W. F. (2019). Epidemiology and clinical manifestations of *Listeria monocytogenes* infection . *Microbiology Spectrum*, *7*(3). https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.GPP3-0014-2018

Scott, M. (2018). *The Complete Sous Vide Cookbook*. CreateSpace Independent Publishing Platform.

Seeliger, H. P. R., Rocourt, J., & Schrettenbrunner, A. (1984). *Listeria ivanovii* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *34*(3), 336–337. https://doi.org/10.1099/00207713-34-3-336/CITE/REFWORKS

Singh, S., & Shalini, R. (2016). *Effect of Hurdle Technology in Food Preservation: A Review.* Critical reviews in food science and nutrition, 56(4), 641–649. https://doi.org/10.1080/10408398.2012.761594

Song, W., Sun, H. X., Zhang, C., Cheng, L., Peng, Y., Deng, Z., Wang, D., Wang, Y., Hu, M., Liu, W., Yang, H., Shen, Y., Li, J., You, L., & Xiao, M. (2019). Prophage Hunter: an integrative hunting tool for active prophages. *Nucleic Acids Research*, *47*(W1), W74–W80. https://doi.org/10.1093/NAR/GKZ380

Soultos, N., Abrahim, A., Papageorgiou, K., & Steris, V. (2007). Incidence of Listeria spp. in fish and environment of fish markets in Northern Greece. *Food Control*, *18*(5), 554–557. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.01.006

Sue, D., Fink, D., Wiedmann, M., & Boor, K. J. (2004). σB-dependent gene induction and expression in Listeria monocytogenes during osmotic and acid stress conditions simulating the intestinal environment. *Microbiology*, *150*(11), 3843–3855. https://doi.org/10.1099/MIC.0.27257-0/CITE/REFWORKS

Tabit, F. T. (2018). Contamination, Prevention and Control of *Listeria monocytogenes* in Food Processing and Food Service Environments. W *Listeria Monocytogenes*. InTech. https://doi.org/10.5772/intechopen.76132

The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. (2022). *EFSA Journal*, *20*(12). https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2022.7666

Varsaki, A., Ortiz, S., Santorum, P., López, P., López-Alonso, V., Hernández, M., Abad, D., Rodríguez-Grande, J., Ocampo-Sosa, A. A., & Martínez-Suárez, J. V. (2022). prevalence and population diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from dairy cattle farms in the cantabria region of Spain. *Animals*, *12*(18), 2477. https://doi.org/10.3390/ANI12182477/S1

Wesche, A. M., Gurtler, J. B., Marks, B. P., & Ryser, E. T. (2009). Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. *Journal of food protection,* 72(5), 1121–1138. https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.5.1121

Wiktorczyk-Kapischke, N., Skowron, K., Grudlewska-Buda, K., Wałecka-Zacharska, E., Korkus, J., & Gospodarek-Komkowska, E. (2021). adaptive response of *Listeria monocytogenes* to the stress factors in the food processing environment. *Frontiers in microbiology*, 12. https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.710085

Wu, G. X., Zhou, J. Y., Hong, W. J., Huang, J., & Yan, S. Q. (2022). Treatment failure in a patient infected with *Listeria* sepsis combined with latent meningitis: A case report. *World Journal of Clinical Cases*, *10*(29), 10565. https://doi.org/10.12998/WJCC.V10.I29.10565

Yin, Y., Yao, H., Doijad, S., Kong, S., Shen, Y., Cai, X., Tan, W., Wang, Y., Feng, Y., Ling, Z., Wang, G., Hu, Y., Lian, K., Sun, X., Liu, Y., Wang, C., Jiao, K., Liu, G., Song, R.,Jiao, X. (2019). A hybrid sub-lineage of *Listeria monocytogenes* comprising hypervirulent isolates. *Nature Communications 2019 10:1*, *10*(1), 1–16. https://doi.org/10.1038/s41467-019-12072-1

Zavadlav, S., Blažić, M., de Velde, F. Van, Vignatti, C., Fenoglio, C., Piagentini, A. M., Pirovani, M. E., Perotti, C. M., Kovačević, D. B., & Putnik, P. (2020). Sous-Vide as a technique for preparing healthy and high-quality vegetable and seafood products. *Foods*, *9*(11). https://doi.org/10.3390/FOODS9111537

Spis tabel i rysunków

Rysunek 1……...….35
Tabela S1…….64
Tabela S2…….65

Tabela S1 Lista szczepów wykorzystanych w publikacjach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

Lp	*Listeria sp.*	Źródło izolacji		Publikacja
		Gatunek	Rodzaj	
1	*L. welshimeri*	*Salmo salar*	surowe	P2
2	*L. welshimeri*	*Salmo salar*	surowe	P2
3	*L. innocua*	*Oncorhynchus mykiss*	surowe	P2
4	*L. innocua*	*Oncorhynchus mykiss*	surowe	P2
5	*L. innocua*	*Salmo salar*	surowe	P2
6	*L. innocua*	*Salmo salar*	surowe	P2
7	*L. innocua*	*Salmo salar*	surowe	P2
8	*L. innocua*	*Salmo salar*	surowe	P2
9	*L. monocytogenes*	*Salmo salar*	surowe	P2, P3
10	*L. monocytogenes*	*Salmo salar*	surowe	P2, P3, P4, P5
11	*L. monocytogenes*	*Oncorhynchus mykiss*	surowe	P2
12	*L. monocytogenes*	*Salmo salar*	surowe	P2
13	*L. monocytogenes*	*Salmo salar*	surowe	P2
14	*L. monocytogenes*	*Penaeus monodon*	surowe	P2
15	*L. monocytogenes*	*Salmo salar*	surowe	P2, P3
16	*L. monocytogenes*	*Salmo salar*	wędzone na zimno	P3, P5
17	*L. monocytogenes*	*Salmo salar*	wędzone na zimno	P3, P5
18	*L. monocytogenes*	*Salmo salar*	wędzone na zimno	P3, P4, P5
19	*L. monocytogenes*	-	zakład przetwórczy	P3, P4, P5
20	*L. monocytogenes*	*Salmo salar*	wędzone na zimno	P3
21	*L. monocytogenes*	-	zakład przetwórczy	P3
22	*L. monocytogenes*	*Salmo salar*	surowe	P3
23	*L. monocytogenes*	*Salmo salar*	wędzone na zimno	P3
24	*L. monocytogenes*	-	zakład przetwórczy	P3
25	*L. monocytogenes*	*Salmo salar*	surowe	P3
26	*L. monocytogenes*	-	zakład przetwórczy	P3
27	*L. monocytogenes*	-	zakład przetwórczy	P3
28	*L. monocytogenes*	*Salmo salar*	wędzone na zimno	P3
29	*L. monocytogenes*	*Salmo salar*	wędzone na zimno	P3

Tabela S2 Lista primerów użyta w doświadczeniach

Rodzaj genów	primer	sekwencja 5'-3'	Źródło
gen referencyjny	16S rRNA- F	CCTACGGGAGGCAGCAG	(Bowman i in., 2008)
	16S rRNA-R	GTATTACCGCGGCTGCTG	
Geny wirluencji	rt-actA-F	ACAACGGTGAGCAAACAGGA	P5
	rt-actA-R	CGCTCCACTTGTAGAGTTGGT	
	rt-hly-F	TGCCAGGTAACGCGAGAAAT	
	rt-hly-R	TGGTGCCCCAGATGGAGATA	
	rt-mpl-F	ATCAAGGTCCACGTCACACC	
	rt-mpl-R	TCCTAAGCTGTCCTTGCTGC	
	rt-osfX-F	TGTAATCGCGCTATGTTCCGT	
	rt-osfX-R	ACTCAATCTCCTTTGCATCGC	
	rt-plcA-F	CCCATTAGGCGGGAAAGCAT	
	rt-plcA-R	TCAGGTAGAGCGGACATCCA	
	rt-plcB-F	AAAAGGGCGAAAGCGGACTA	
	rt-plcB-R	ACCTGCCAAAGTTTGCTGTG	
	rt-prfA-F	TTAGCGAGAACGGGACCATC	
	rt-prfA-R	TAACGTATGCGGTAGCCTGC	
	inlA-R	GGTCTCACAAACAGATCTAGACCAAGT	(Sue i in., 2004)
	inlA-F	TCAAGTATTCCACTCCATCGATAGATT	
	flaA-F	CGTGAACAATCAATCCATCG	(Mauder i in., 2008)
	flaA-R	ACATTTGCGGTGTTTGGTTT	
geny oporności	rt-dfrA-F	AAGCTGTTTTAGCCCTTGCTG	P5
	rt-dfrA-R	GGAAACGCAGTATCAGCCTCA	
	rt-fosX-F	GTGGATGAATATATTGAGCGGATT	
	rt-fosX-R	CTTCGACTCTGGGACGTTCT	
	rt-sul-F	ATGGTGGAAGATGGAGCAGC	
	rt-sul-R	TCGGGTAATTTCGTCCTGACA	
	rt-tetA_1-F	GGGCGCTTTGGGTACTCTTT	
	rt-tetA_1-R	TCCGCTCCTCTTGAGGTGTA	
	rt-tetA_2-F	AAGCTGCCAAGGTCGTTTAT	
	rt-tetA_2-R	ACTAAAGTTCGCAATTTGGATGAGT	
	rt-tetA_3-F	CGACTGCCAATGCGCTAATC	
	rt-tetA_3-R	CCAATTAGCACGCCCGAAAC	
	rt-tetC-F	AAAAGAAGCGGACTCGAGCA	
	rt-tetC-R	AGTGCCGGTTGGGTAATGTT	
	mprF-F	GGAAGCAGCGATTGAAGAGG	P4
	mprF-R	GGACGTCGACAAAACCTTCC	
	lin-F	AGCGTTCAAACCAAGCAAGT	
	lin-R	GGAGCATACTGAGCAGCAAC	
	FosX-F	AGCGTTCAAACCAAGCAAGT	
	FosX-R	TCATTTCCACACCGAGAGCT	

Załączniki

Załącznik 1

Zakrzewski, A., Gajewska, J., Chajęcka-Wierzchowska, W., Załuski D. Zadernowska, A. (2023). Prevalence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in fish, fish products and fish processing environment: A systematic review and meta-analysis. *Science of The Total Environment*, 907, 167912. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167912

MEiN: 200, IF: 9.8

Science of the Total Environment 907 (2024) 167912

Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv

Review Article

Prevalence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in fish, fish products and fish processing environment: A systematic review and meta-analysis

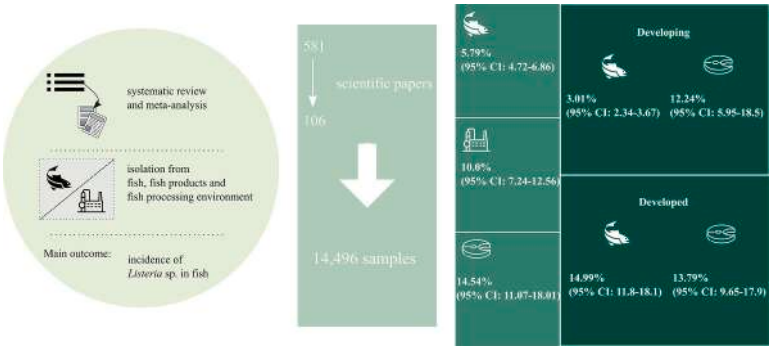
Arkadiusz Józef Zakrzewski [a,*], Joanna Gajewska [a], Wioleta Chajęcka-Wierzchowska [a], Dariusz Załuski [b], Anna Zadernowska [a]

[a] Department of Industrial and Food Microbiology, University of Warmia and Mazury, Plac Cieszyński 1, 10-726 Olsztyn, Poland
[b] Department of Genetics, Plant Breeding and Bioresource Engineering, University of Warmia and Mazury, ul. Oczapowskiego 8, 10-719 Olsztyn, Poland

HIGHLIGHTS

- *Listeria* sp. prevalence rates in fish, fish products and fish processing environment were investigated.
- *Listeria* prevalence was higher in processed fish products versus raw fish.
- Contamination of *Listeria monocytogenes* was higher in developed countries than in developing countries.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Editor: Kyle Bibby

Keywords:
Listeria
Listeria monocytogenes
Prevalence
meta-analysis
Fish

ABSTRACT

Fish and seafood products are one of the most common causes of listeriosis in humans. A systematic review and meta-analysis were conducted using scientific literature to summarize available data on the prevalence of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* sp. in fish, fish products and fish processing environment. Meta-analysis models were used to estimate the mean prevalence of the pathogen and to compare prevalence among the most popular fishes. Data from a total of 14,496 samples were analysed. Pooled prevalence of *L. monocytogenes* and *Listeria* sp. in raw fish was 5.8 % (95 % CI: 4.7–6.9) and 12.2 % (95 % CI: 8.9–15.5) respectively. Significantly higher results were observed for ready-to-eat products, occurrence of *L. monocytogenes* and *Listeria* sp. was 14.5 % (95 % CI: 11.1–18.0) and 21.7 % (95 % CI: 11.8–31.6) respectively. Moreover, meta-regression was performed to investigate changes in *L. monocytogenes* and *Listeria* sp. occurrence over the years and it shows a downward trend for both raw fish and RTE products. The results of the present study provide useful epidemiological information about the contamination level and distribution of *Listeria* sp. and *L. monocytogenes* among raw fish, fish products and fish processing environment.

* Corresponding author.
E-mail address: arkadiusz.zakrzewski@uwm.edu.pl (A.J. Zakrzewski).

https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167912
Received 29 June 2023; Received in revised form 15 October 2023; Accepted 16 October 2023
Available online 20 October 2023
0048-9697/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Listeria monocytogenes, along with 26 different species, belongs to the genus *Listeria.* A 27th species*, Listeria ilorinensis* sp. *nov*., has recently been characterized (Raufu et al., 2022). However, only two species; *L. monocytogenes* and *L. ivanovii* are reported to be pathogenic to humans and other animals (Leclercq et al., 2019). Nevertheless, there have been isolated reports of *L. seeligeri* and *L. ivanovii* causing infection in humans (Cummins et al., 1994; Rocourt et al., 1986). Only among isolates belonging to *Listeria* sensu stricto (*L. monocytogenes, L. ivanovii, L. marthii 21, L. innocua, L. welshimeri*, and *L. seeligeri*) cases of human listeriosis has been reported, however, the virulence potential is determined mainly based on the presence of LIPI-1, and other *Listeria* species may have single virulence genes (Hudson et al., 2022). Human listeriosis generally has a low prevalence, with 0.1 to 10 cases per 1 million people per year, but the case-fatality rate is usually as high as 20–30 %, achieving high rates also in high-income countries. In Germany, the case-fatality rate in 2012–2019 was as much as 13 % (WHO, 2018; Wilking et al., 2021). Listeriosis can result in in two forms: non-invasive gastroenteritis with a fever and invasive with more severe symptoms like meningitis and sepsis. In addition, maternal-neonatal forms are also known, which are characterized by severe birth defects or miscarriage. For parenteral symptoms are exposed primarily to people at high risk, including pregnant women, newborns, elderly and people with immunodeficiency (Osek and Wieczorek, 2022).

Listeria species is widespread in the environment and can be found in animals, soil, water, manure and food processing plants. Its prevalence in the varied environment results from its resistance to environmental stress, the ability to reproduce at low temperatures and the ability to form biofilms on various surfaces (D. Liu et al., 2005), in which strains of non-pathogenic *Listeria* species may exist together with pathogenic strains and pose a serious threat to human health (Buchanan et al., 2017).

Fish are an important nutritious source for people worldwide, although their consumption may be hazardous to health. The most considerable risk to human health is the occurrence of human pathogens (Hellberg et al., 2012). In 2021, listeriosis was the fifth most frequently reported zoonosis in the EU, with 2183 cases – a 14 % increase in the EU notification rate from 2020. While, 15.5 % zoonosis outbreaks were linked to fish and fish products ("The European Union One Health 2021 Zoonoses Report," 2022). In 2021, 196 deaths due to listeriosis were reported in European Union and around 260 in The United States (*People at Risk | Listeria | CDC,* n.d.; "The European Union One Health 2021 Zoonoses Report," 2022). The highest number of cases per capita was reported in Denmark, Northern Ireland and Sweden ("The European Union One Health 2021 Zoonoses Report," 2022). The *Listeria* occurrence in the fish processing industry and other industries is mainly related to the unique persistence that characterizes this genus. The feasibility of this outcome can be attributed to a variety of distinctive characteristics; high species heterogeneity- *L. monocytogenes* is classified into fourteen serotypes, which are further grouped into four genetically diverse lineages consisting of specific serotypes and multiple MLST types (Multi-Locus Sequence Typing), which are divided into separate clonal complexes (Muchaamba et al., 2022). In the fishing industry two dominant complexes are CC8 and CC121 (Zakrzewski et al., 2023). Another features are protection by a matrix of extracellular polymeric substances (EPS), and a frequent resistance of *Listeria* to cleaning and disinfecting agents. In addition, it is seen that the fish meat itself supports the growth of *L. monocytogenes*, having 100- to 1000-fold greater risks of causing listeriosis than other food matrices (Buchanan et al., 2017). Therefore, this study aimed to investigate the prevalence of *L. monocytogenes* and other *Listeria* species in raw and processed fish and fish processing environment by using a systematic review and meta-analysis based method.

2. Materials and methods

2.1. Search strategy

A systematic review was conducted in accordance with the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines to ensure effective preparation. We conducted comprehensive research utilizing PubMed, Scopus, and Web of Science. In this survey, the keywords "*Listeria*", "*L. monocytogenes*", "fish", "fish processing plant", "salmon", "*Salmo salar*", "trout", "*Oncorhynchus mykiss*" "occurrence" and "prevalence", were used as search queries in the databases, both separately and simultaneously from December 2022 to February 2023. Two keywords "Salmon" and "Trout" were highlighted due to the most frequent two fish eaten raw or processed. The search was restricted to publications within the dates ranging from January 2013 to December 2023. The study excluded articles lacking information on the number of *Listeria* sp. isolates, as well as experimental work of novel possibilities for *Listeria* detection and different sources. The titles and abstracts of the retrieved articles were independently reviewed by the authors (AJZ, JG), and any difference of opinion was remedied through dialogue between the second and last author. (WCh—W, AZ).

2.2. Eligibility criteria

For the purpose of the study, the criteria for inclusion entailed testing for the presence of *Listeria* species in raw and processed fish, ready-to-eat fish products, and the environment of fish processing facilities.

2.3. Data extraction

The data was gathered according to the authors' surnames, year of publication, variety of isolation source, sample size, quantity of *L. monocytogenes* and *Listeria* sp. isolates. Data extraction was conducted by a reviewer (AJZ), with any discrepancies resolved through consultation with JG, WCh-W, and AZ.

2.4. Statistical analysis

The overall prevalence was estimated by using the PQStat version 1.4.8 statistical software for conducting the meta-analysis (Antkowiak and Tabakow, 2021; Zwierzchowska et al., 2022). A meta-analysis was conducted employing the random-effects model to compute the pooled prevalence and its associated 95 % confidence interval (CI). The heterogeneity between estimates was evaluated using the Higgins I^2 and Cochran's Q approach, which quantifies the degree of variation not attributable to sampling error across studies. An I^2 statistic value of >75 % indicates a high level of heterogeneity. A sensitivity analysis was conducted in order to determine whether the exclusion of any given study had a quantifiable impact on the pooled prevalence value without taking into consideration the individual study. Publication bias was evaluated using the Eggers test and the visual inspection of the funnel plot (with $p < 0.05$ taken as a sign of statistically significant publication bias). A meta-regression analysis was conducted to determine if temporal variation in the presence of *L. monocytogenes* existed. The estimated pooled prevalence was significantly impacted upon by the study, disregarding individual cases. An ANOVA test was employed to ascertain the statistical significance of differences between species and clusters. A meta-regression analysis was employed to determine whether temporal variations in the prevalence of *Listeria* clusters could be detected. The results indicate that the Q value of the model was significant at a *p*-value of <0.05.

3. Results

3.1. Characteristics of studies

The summary of all studies that has been evaluated are shown in Fig. 1 and listed in Table S1.

A total of 581 papers were obtained during the systematic study, of which 106 underwent a thorough evaluation. Forty-six papers total were eventually included in the meta-analysis. Detailed information abound included papiers are listed in Table 1. Fish in which species and family are specified, but the number of papiers is <2, are defined in Table 1. as mixed/other.

A total of 14,496 samples were examined in the studies that made up the meta-analysis., including 7135 samples and 2395 samples of raw fish investigated for *L. monocytogenes* and *Listeria* sp. occurrence respectively. A large number of samples evaluated were also RTE, a total of 2024 and 654 for *L. monocytogenes* and *Listeria* sp. occurrence respectively.

3.2. A pooled prevalence of L. monocytogenes and Listeria sp.

By carefully examining the data, it was found that *L. monocytogenes* was present at similar levels in raw fish and in samples from the fish processing environment, 5.8 % and 10.0 %, respectively. Much higher prevalence was observed in ready-to-eat products (14.5 %) and production samples (21.7 %). It was unsurprising that there is a considerable higher pooled prevalence of *Listeria* sp. in raw fish, that reached 12.2 % (Table 2).

Statistical analysis showed that differences within groups for *L. monocytogenes* prevalence are significant and the p-value was <0.000001 for all groups except the treatment group, which was not statistically significant (p-value was 0.1771). Differences between groups are statistically significant ($p < 0.000001$). Similar results were obtained for *Listeria* sp., also differences within groups were significant ($p < 0.000001$), however, for processed samples, p value is 0.6432. As in the case of to *L. monocytogenes* differences between groups were statistically significant ($p < 0.000096$).

Most of the groups for *L. monocytogenes* were characterized by high heterogeneity, and the I^2 coefficient for them ranged from 77.8 to 93.3 %. Only group of processed samples was characterized by higher

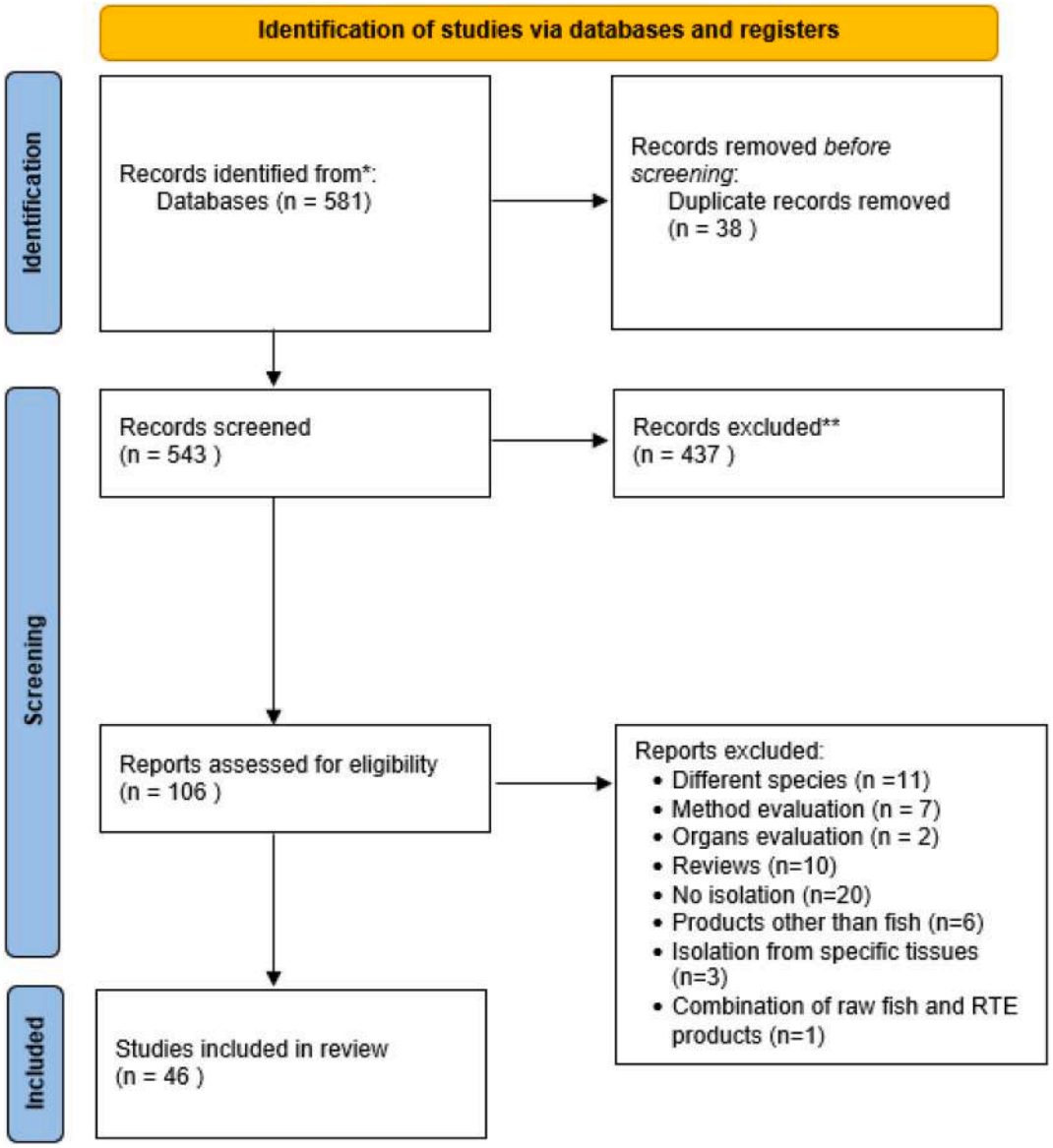


Fig. 1. Flow diagram showing the study selection process.

Table 1
Main characteristics of included studies.

Author	Country	Year	Economic condition	Continent	Isolation method	Sample type	Source		Fishes		n	*Listeria*	
									Species	Family		*L. m**	*Listeria* sp.
(Aalto-Araneda et al., 2019)	Finland	2019	High-income	Europe	ISO	FPE	–		–	–	185	11	–
						RTE	Product graved/cold smoked		*Salmo salar*	*Salmonidae*	425	18	–
(Abdollahzadeh et al., 2016)	Iran	2016	Lower to middle-income	Asia	Cold enrichment	Raw	Fishes		*Oncorhynchus mykiss*	*Salmonidae*	18	1	2
									Caspian tyulka	Mixed/other	45	7	4
							Shrimp		–	Seafood	59	1	0
						RTE	Fish nugget		–	–	20	3	0
							Shrimp nugget		–	–	59	5	0
							RTE final products		–	–	5	1	0
						FPE	Floor		–	–	10	0	0
							Equipment		–	–	10	0	0
							Additives		–	–	6	0	0
							Raw material		–	–	6	2	2
(Akkaya et al., 2011)	Turkey	2011	Lower to middle-income	Asia	IMS	Raw	Fishes		*Trutta faris*	*Salmonidae*	25	2	0
									Cyprinus carpio	*Cyprinidae*	25	0	1
									Mugil cephalus	*Mugilidae*	25	2	0
									Engraulis encrasicholus	mixed/other	25	0	1
						FPE	Market	Hands	–	–	20	0	1
								Boots	–	–	20	1	0
								Transport boxes	–	–	20	0	2
								Floor	–	–	10	0	1
								Cutting board	–	–	10	0	1
								Fridge	–	–	10	0	2
								Knives	–	–	10	2	0
(Akpolat et al., 2004)	Turkey	2004	Lower to middle-income	Asia	ISO	Raw	Fishes		–	Mixed/other	70	1	–
(Al-Gburi, 2020)	Iraq	2020	Lower to middle-income	Asia	Conventional	Raw	Fish		*Cyprinus carpio*	*Cyprinidae*	30	2	0
(Ananchaipattana et al., 2012)	Thailand	2012	Lower to middle-income	Asia	Conventional	Raw	Fish or seafood		–	Other/mixed	37	–	1
(Basha et al., 2019)	India	2019	Lower to middle-income	Asia	Conventional	Raw	Marine fish		–	Mixed/other	97	1	4
							Shellfish		–	Seafood	19	0	4
						RTE	RTE		–		57	0	2
						Processed	Dried fish		–	–	11	0	0
						FPE	Retail ice		–	–	43	1	3
(Basti et al., 2006)	Iran	2006	Lower to middle-income	Asia	Conventional	Raw	Fishes		*Hypophthalmichthys molitrix*	*Cyprinidae*	39	4	–
									Alosa essleri	*Clupeidae*	28	0	–
									Liza aurata	*Mugilidae*	40	0	–
						RTE	Smoked fish		*Hypophthalmichthys molitrix*	*Cyprinidae*	39	12	–
									Alosa essleri	*Clupeidae*	28	3	–
									Hypophthalmichthys molitrix	*Cyprinidae*	20	7	–
							Salted fish		*Liza aurata*	*Mugilidae*	40	24	–
(Cao et al., 2005)	USA	2005	High-income	North America	Conventional + PCR	Raw	Fishes		*Catfish*	Mixed/other	48	25	–
									Gadus morhua	*Gadidae*	67	15	–
									Paralichthys sp.	*Paralichthyidae*	34	4	–
									Melanogrammus aeglefinus	*Gadidae*	63	7	–
									Hake	Mixed/other	2	1	–
									Halibut	*Pleuronectidae*	6	0	–

(*continued on next page*)

Table 1 (*continued*)

Author	Country	Year	Economic condition	Continent	Isolation method	Sample type	Source	Fishes		n	*Listeria*	
								Species	Family		*L. m**	*Listeria* sp.
								Lophius sp.	Mixed/other	2	1	–
								Pollachius sp.	*Gadidae*	8	1	–
								Salmo salar	*Salmonidae*	29	1	–
								Shark	Mixed/other	2	1	–
								Sole	Mixed/other	10	1	–
								Morone saxatilis	Mixed/other	1	1	–
								Xiphias gladius	*Xiphiidae*	5	1	–
								Tilapia sp.	*Cichlidae*	33	12	–
								Oncorhynchus mykiss	*Salmonidae*	10	3	–
(Chen et al., 2010)	USA	2010	High-income	North America	Conventional	Raw	Fish	*Cyprinus carpio*	*Cyprinidae*	30	12	22
						FPE	–	–	–	195	56	143
(Davies et al., 2001)	France	2001	High-income	Europe	Conventional	Raw	Fishes	*Merlangius merlangus*	*Gadidae*	26	17	–
	Great Britain							*Pleuronectes platessa*	*Pleuronectidae*	5	4	–
								Salmo salar	*Salmonidae*	5	4	–
								Oncorhyncus mykiss	*Salmonidae*	20	15	–
	Portugal							*Sardina pilchardus*	*Clupeidae*	10	0	–
								Oncorhyncus mykiss	*Salmonidae*	10	5	–
	Greece							*Engraulis encrasicolus*	*Engraulidae*	12	1	–
								Diplodus annularis	*Sparidae*	1	0	–
								Boops boops	*Sparidae*	4	2	–
								Loligo vulgaris	mixed/other	5	1	–
								Gadus capelanus	*Gadidae*	10	0	–
								Pargus pargus	*Sparidae*	1	0	–
								Sepia officinalis	Mixed/other	3	0	–
								Anguilla anguilla	*Anguillidae*	1	0	–
								Pilchardus sardina	*Clupeidae*	4	0	–
								Sparus aurata	*Sparidae*	6	1	–
								Merlucius merlucius	Mixed/other	2	0	–
								Trachulus trachurus	*Carangidae*	7	1	–
								Zeus faber	Mixed/other	1	0	–
								Mytilus edulis	Mixed/other	5	2	–
								Smaris alcedo	*Sparidae*	10	2	–
								Spicara smaris	*Sparidae*	4	0	–
								Mullus barbatus	*Mullidae*	1	1	–
								Penaeus caramote	Mixed/other	1	1	–
								Atherina hespectus	Mixed/other	4	0	–
								Mugil cephalus	*Mugilidae*	2	2	–
								Mullus surmuletus	*Mullidae*	1	1	–
								Salmo truta	*Salmonidae*	10	0	–
(Di Ciccio et al., 2012)	Italy	2012	High-income	Europe	ISO	FPE				95	16	–
						Raw	Fish	*Salmo salar*	*Salmonidae*	21	5	–
(Dominguez et al., 2001)	Spain	2001	High-income	Europe	Conventional	RTE	Smoked fish	*Salmo salar*	*Salmonidae*	42	12	24
								Salmo salar	*Salmonidae*	90	16	39
								Oncorhyncus mykiss	*Salmonidae*	38	10	18
(El-Shenawy and El-Shenawy, 2006)	Egypt	2006	Lower to middle-income	Africa	ISO	Raw	Fishes	–	Mixed/other	40	3	26
							Shellfish	–	Seafood	15	1	12
(Ertaş and Şeker, 2005)	Turkey	2005	Lower to middle-income	Asia	Conventional	Raw	Fish	*Capoeta umbla*	*Cyprinidae*	150	10	–
(Garedew et al., 2015)	Ethiopia	2015	Lower to middle-income	Africa	Conventional	Raw	Fishes		Mixed/other	50	3	13
(Herrera et al., 2006)	Spain	2006	High-income	Europe	Conventional	Raw	Fishes	Sole	Mixed/other	13	2	0
								Grouper	Mixed/other	12	2	1
								Conger sp.	Mixed/other	11	1	0

(*continued on next page*)

Table 1 (*continued*)

Author	Country	Year	Economic condition	Continent	Isolation method	Sample type	Source		Fishes		n	*Listeria*	
									Species	Family		*L. m**	*Listeria* sp.
									Xiphias gladius	Mixed/other	9	0	0
									Merlangius merlangus	*Gadidae*	5	0	0
(Jamali et al., 2015)	Tunisia	2014	Lower to middle-income	Africa	Conventional	RTE	Fishes		–	Mixed/other	50	1	
(Jallewar et al., 2007)	India	2007	Lower to middle-income	Asia	Conventional	Raw	Fishes		*Clarias batrachus*	Mixed/other	200	26	39
(Jamali et al., 2015)	Malaysia	2015	Lower to middle-income	Asia	ISO	Raw	Fish		*Ctenopharyngodon idella*	*Cyprinidae*	135	9	32
(Jelena et al., 2011)	Serbia	2011	Lower to middle-income	Europe	ISO	Raw	Fishes		*Rutilus kutum*	*Cyprinidae*	124	14	27
									Liza auratus	*Mugilidae*	120	7	21
									Hypophthalmichthys molitrix	*Cyprinidae*	109	7	24
									–	Mixed/other	43	–	1
						FPE	Workers' hands			–	96	2	11
							Workers' knives			–	96	1	3
							Work surface			–	92	2	12
							Containers			–	90	1	3
						Processed	Frozen	Fishes		–	161		9
						RTE	Panned			–	43		27
							Smoked			–	72		6
							Salted			–	15		1
							Half-cans			–	15		0
							Cans			–	20		0
							Heat treated			–	20		4
(Kim et al., 2017)	South Korea	2016	High-income	Asia	Conventional	Raw	Fishes		*Dorosoma cepedianum*	*Clupeidae*	30	0	–
									Halibut	*Pleuronectidae*	30	0	–
									Rockfish	Mixed/other	30	0	–
									Tuna	*Scombridae*	30	0	–
									Oyster	Seafood	56	0	–
									Squid	Seafood	30	0	–
(Kramarenko et al., 2016)	Estonia	2016	High-income	Europe	ISO	RTE	Cold smoked	Fishes			62	4	–
							Hot smoked				2	1	–
							Matured				38	4	–
							Salted				52	17	–
(Laciar and de Centorbi, 2002)	Argentina	2002	Lower to middle-income	South America	Conventional	Raw	Fishes		Hake	Mixed/other	42	1	–
									Mackerel	*Scombridae*	26	2	–
							Squid			Seafood	17	4	–
							Mussel			Seafood	15	4	–
(Lampila and McMillin, 2012)	Ireland	2012	High-income	Europe	ISO	FPE	–		–	–	433	11	–
						RTE	Fishes			Mixed/other	75	2	–
(Li et al., 2019)	China	2019	Lower to middle-income	Asia	Conventional	Raw	Fishes		*Monopterus albus*	Mixed/other	20	0	–
									Aristichthys nobilis	*Cyprinidae*	74	2	–
									Megalobrama amblycephala	*Cyprinidae*	150	4	–
									Parabramis pekinensis	*Cyprinidae*	27	0	–
									Cyprinus carpio	*Cyprinidae*	381	13	–
									Silurus asotus	Mixed/other	60	2	–
									Carassius auratus	*Cyprinidae*	589	12	–
									Erythroculter ilishaeformis	*Cyprinidae*	26	0	–
									Ctenopharyngodon idellus	*Cyprinidae*	307	11	–
									Misgurnus anguillicaudatus	Mixed/other	21	1	–

(*continued on next page*)

Table 1 (*continued*)

Author	Country	Year	Economic condition	Continent	Isolation method	Sample type	Source	Fishes		n	*Listeria*	
								Species	Family		*L. m**	*Listeria* sp.
								Siniperca chuatsi	Mixed/other	29	1	–
								Perca fluviatilis	*Percidae*	68	2	–
								Hypophthalmichthys molitrix	*Cyprinidae*	119	3	–
								Channa argus	Mixed/other	103	2	–
								Oreochromis mossambicus	*Cichlidae*	96	2	–
								Tachysurus fulvidraco	Mixed/other	107	4	–
								Unspecified species	Mixed/other	151	2	–
								Eriocheir sinensis	Mixed/other	32	2	–
								Procambarus clarkii	Mixed/other	171	4	–
								Macrobrachium nipponense	Mixed/other	391	6	–
							Seafood	*Corbicula fluminea*	Seafood	66	1	–
								Freshwater mussel	Seafood	79	1	–
								Cipangopaludina cahayensis	Seafood	112	4	–
								River snails (Bellamya quadrata)	Seafood	46	1	–
								Unspecified species	Seafood	1	0	–
(Mędrala et al., 2003)	Poland	2003	High-income	Europe	ISO	Raw	Fishes	*Salmo salar*	*Salmonidae*	46	2	–
								Salmo trutta	*Salmonidae*	26	4	–
								Salmo salar	*Salmonidae*	9	7	–
								Salmo trutta	*Salmonidae*	12	7	–
						RTE	Smoked fish	*Salmo salar*	*Salmonidae*	44	27	–
(Meloni et al., 2009)	MIX	2009	–	–	ISO	RTE	Smoked fishes	–	Mixed/other	50	6	
							Salads bivalves		Seafood	42	2	
(Miettinen and Wirtanen, 2006)	Finland	2006	High-income	Europe	Conventional	Raw	Fish	*Oncorhyncus mykiss*	*Salmonidae*	150	45	–
(Miettinen et al., 2001)	Finland	2006	High-income	Europe	Conventional	Fishes	–	–	Mixed/other	58	7	49
						FPE	Surface	–	–	23	2	5
							Water	–	–	78	10	18
(Miya et al., 2010)	Japan	2010	High-income	Asia	VIDAS	Processed	Minced Fishes	Tuna	Mixed/other	116	14	–
							Block	Tuna	Mixed/other	38	1	–
						RTE	Roe	*Salmo salar*	*Salmonidae*	123	7	–
							Roe	cod	Mixed/other	164	15	–
							Sushi		Mixed/other	36	0	–
							Sushi		Mixed/other	33	1	–
						Processed	Dried seafood		Seafood	16	0	–
(Rojan Modaresi, 2011)	Iran	2011	Lower to middle-income	Asia	Conventional	Raw	Fishes	*Oncorhynchus mykiss*	*Salmonidae*	42		4
								Sander lucioperca	Mixed/other	38		3
								Cyprinus carpio	*Cyprinidae*	30		4
								Hypophthalmiachthys molitrix	*Cyprinidae*	48		6
								Abramis brama	*Cyprinidae*	12		3
								Astacus leptodactylus	Mixed/other	12		3
								Silurus glanis	Mixed/other	12		1
(Momtaz and Yadollahi, 2013)	Iran	2013	Lower to middle-income	Asia	ISO	Raw	Fishes		Mixed/other	220	17	23
							Shrimp		Seafood	40	1	1
							Lobster		Seafood	20	0	0
							Crab		Seafood	20	0	0
(Nakamura et al., 2006)	Japan	2006	High-income	Asia	Conventional	Raw	Fishes		Mixed/other	47	0	
						FPE	Materials during processing			133	11	
							Processing equipment			124	14	
							Environment			64	27	

(*continued on next page*)

Table 1 (*continued*)

Author	Country	Year	Economic condition	Continent	Isolation method	Sample type	Source	Fishes		n	*Listeria*	
								Species	Family		*L. m**	*Listeria* sp.
						RTE	Fishes			59	4	
(Salihu et al., 2010)	Nigeria	2008	Lower to middle-income	Africa	ISO	RTE	Smoked fishes	–	Mixed/other	115	29	67
(Rahimi et al., 2012)	Iran	2012	Lower to middle-income	Asia	Conventional	Raw	Fish	*Oncorhyncus mykiss*	*Salmonidae*	71		7
						Raw	Fishes		Mixed/other	80	2	6
						FPE	Hands	–	–	20		3
						FPE	Environment	–	–	113	4	49
						Processed	Fishes	–	Mixed/other	60	0	2
						Raw	Shrimp	–	Seafood	60	2	7
						Processed	Shrimp	–	Seafood	76	1	5
(Rodas-Suárez et al., 2006)	Mexico	2006	Lower to middle-income	North America	Conventional	Raw	Fishes		Mixed/other	66	10	15
(Selvaganapathi et al., 2018)	India	2018	Lower to middle-income	Asia	Conventional	FPE	Fishing harbour		–	29	3	–
							Fish landing centers		–	17	1	–
							Seafood processing plants		–	49	2	–
							Fish market		–	8	0	–
							Fish curing yards		–	12	0	–
(Skowron et al., 2018)	Poland	2018	High-income	Europe	ISO	FPE	Raw material storage	–	–	119	32	–
							Decapitation hall	–	–	54	24	–
							Filleting hall	–	–	110	45	–
							Smokehouse	–	–	57	5	–
							Fridge	–	–	10	0	–
							Slicing hall	–	–	35	14	–
							Packing hall	–	–	10	2	–
							Storage warehouse	–	–	52	17	–
(Soultos et al., 2007)	Greece	2007	High-income	Europe	ISO	Raw	Fishes	*Scomber scombrus*	Mixed/other	30	0	1
								Boops boops	Mixed/other	30	1	2
								Trachurus trachurus	Mixed/other	30	0	0
								Merlangius merlangus euxinus	*Gadidae*	30	0	1
(Svanevik et al., 2015)	Norway	2015	High-income	Europe	Conventional	Raw	Fishes		Mixed/other	102	8	
						FPE	Surface			74	13	
(Terentjeva et al., 2015)	Latvia	2015	High-income	Europe	Conventional	Raw	Fishes	*Anguilla anguilla*	*Anguillidae*	56	0	–
								Perca fluvialitis	*Percidae*	59	6	–
								Blicca bjoerkna	*Cyprinidae*	44	8	–
								Abramis brama	*Cyprinidae*	17	3	–
								Rutilus rutilus	*Cyprinidae*	25	5	–
								Carassius carassius	*Cyprinidae*	10	4	–
								Tinca tinca	*Cyprinidae*	1	0	–
								Cyprinus carpio	*Cyprinidae*	2	0	–
								Scardinius erythrophtalmus	*Cyprinidae*	6	0	–
								Vimba vimba	*Cyprinidae*	15	4	–
(Uyttendaele et al., 2009)	Belgium	2009	High-income	Europe	VIDAS	RTE	Smoked fishes	Eel	Mixed/other	4	2	–
								Halibut	mixed/other	11	5	–
								Herring	*Clupeidae*	2	0	–
								Mackerel	*Scombridae*	4	0	–
								Salmo salar	*Salmonidae*	15	3	–
								sprat	*Clupeidae*	1	1	–
								sturgeon	*Acipenseridae*	2	0	–
								Oncorhyncus mykiss	*Salmonidae*	6	2	–
(Voidarou et al., 2011)	Greece	2011	High-income	Europe	Conventional	RTE	Fish roe		Mixed/other	48	–	0
(Wieczorek and Osek, 2017)	Poland	2017	High-income	Europe	ISO	Raw	Raw marine	–	Mixed/other	102	18	–
							Raw freshwater	–	Mixed/other	28	10	–

(*continued on next page*)

Table 1 (*continued*)

Author	Country	Year	Economic condition	Continent	Isolation method	Sample type	Source	Fishes		n	*Listeria*	
								Species	Family		*L. m**	*Listeria* sp.
						RTE	Smoked marine	–	Mixed/other	152	28	–
							smoked freshwater	–	Mixed/other	19	1	–
						Raw	Marine fish	–	–	71	1	
							Shrimp	–	–	71	1	
						Processed	Frozen	Fish fillet	–	–	20	0	–
								Pud shrimp	–	–	20	0	–
							Nugget	Fishes	–	–	10	0	–
								Shrimp	–	–	10	0	–
							Breaded	Shrimp	–	–	30	0	–
								Shrimp	–	–	15	0	–
(Zarei et al., 2012)	Iran	2012	Lower to middle-income	Asia	Conventional							

n - number of samples, RTE - ready-to-eat, FPE - fish processing environment, L.m.*-*L. monocytogenes*, – not applicable/not detected, ISO- ISO 11290-1:2017, conventional- detection method using enrichment step with media other than mentioned in ISO 11290-1:2017.

homogeneity and the I^2 coefficient was 27.2 %. Similar results were obtained for *Listeria* sp., only group of processed samples was homogenous (I^2 coefficient = 0.0 %), and other groups were characterized by high heterogeneity (I^2 coefficient ranged from 85.8 to 96.3 %). The Eagger's test revealed that there was no bias in the research on both *L. monocytogenes* and *Listeria* sp. occurrence, and the p value for which was 0.000001 and 0.000028 respectively.

The study divided the source of *L. monocytogenes* isolation from raw fish into their families (Table 3), and additionally managed to distinguish several species (Table 4). Taken together, these results suggest that *Pleuronectidae* and *Salmonidae* are the most likely to be contaminated with *L. monocytogenes,* with pooled prevalence of 21.4 % and 28.5 % respectively. Very low isolation of the pathogen (<1 %) was found in fish from families *Anguillidae* (0.0 %), *Scombridae* (0.7 %) and *Engraulidae* (0.9 %). Further analysis was done to see which fish species are frequently linked to *L. monocytogenes.* The results showed that almost 50.0 % of *Mugil cephalus* were the source of *L. monocytogenes.* Fish that belong to *Oncorhynchus mykiss* and *Salmo salar* were also a common source of the pathogen with prevalence of 36.9 % and 30.3 % respectively. There is far fewer studies examining the occurrence of *Listeria* species in fish and other food products, but 4 families (Table 5) and 4 species (Table 6) have been distinguished. Based on the results obtained, it can be concluded that bacteria of the genus *Listeria* are found in every fifth raw fish from the *Cyprinidae* family, relatively often these bacteria are isolated from fish of the family *Salmonidae*. The rarest, however, *Listeria* sp. were isolated from the *Gadidae* family (3.1 %). The most common species in which bacteria of the genus *Listeria* occur is *Cyprinus carpio* and the pooled prevalence was 21.5 %, the least common source of these bacteria is *Merlangius merlangus*, for which the pooled prevalence was 3.1 %.

In the analysis of the heterogeneity of the fish families from which *L. monocytogenes* was isolated, it was found that the groups were generally characterized by high heterogeneity, I^2 coefficient was 76.8 %, while for *Listeria* sp. the groups were more homogeneous, I^2 coefficient was 43.4 %. Detailed data on family heterogeneity are presented in Table S2.

A meta-regression analysis was performed for the study year as a categorical variable. The results of meta-regression show a downward trend in *L. monocytogenes* occurrence in raw fish over the years. However, this trend is very insignificant (Coefficient − 0.005862. p-value: <0.000001. 95 % CI: −0.007614: −0.004111) (Fig. 2). Similar observations were noted for *Listeria* sp. isolated from raw fish, with a low downward trend, with low coefficient − 0.009656 (95 % CI: −0.018372: −0.00094). These changes are statistically significant (*p*-value: 0.029905) (Fig. 3).

However, analysis of *L. monocytogenes* occurrence over the years show a downward trend, however it was more pronounced with coefficient equal to −0.01277. p-value: -0.012942, 95 % CI: −0.019301: −0.006238) (Fig. 4). Although a small number of meta-regression studies were collected for the presence of *Listeria* sp. in RTE products and a decrease was observed here, the coefficient was −0.033807 (CI: −0.048421: −0.019192) and the p-value was 0.000006 (Fig. 5).

Due to the small number of publications in which the occurrence of *Listeria* sp. was examined, the analysis of the occurrence in subgroups, regions and economic status of the region was limited to *L. monocytogenes* isolated from raw fish and ready-to-eat fish products.

Based on available data, North America was characterized by highest pooled prevalence (22.2 %, 95 % CI: 13.9–30.4) in raw fish among others. High prevalence (16.5 %, 95 % CI: 12.6–20.4) was also observed in Asia. In Europe *L. monocytogenes* occurrence in raw fish was the lowest (2.2 %, 95 % CI: 1.7–2.8) (Fig. 6). The occurrence of this pathogen in RTE fish products in Europe is much higher and reached (19.2 %, 95 % CI: 13.0–25.4), while in Asian countries it is much lower than in raw products and amounts to 8.5 % (95 % CI: 4.2–12.7). Regrettably, we were unable to collect this data for North America (Fig. 7).

In the analysis of the occurrence of *L. monocytogenes* in individual

Table 2
Pooled prevalence of *L. monocytogenes* and *Listeria* sp. isolates from different fish-related sources.

Microorganism	Source	N	n	Pooled prevalence [%]	SE	−95%CI	+95%CI
L. monocytogenes	FPE	14	2628	10.0*	1.36	7.2	12.6
	RTE	15	2024	14.5*	1.77	11.1	18.0
	processed	4	422	1.4	0.92	0.0	3.2
	raw	30	7135	5.8*	0.55	4.7	6.9
Listeria sp.	FPE	7	983	13.6	4.61	4.6	22.6
	RTE	9	654	21.7*	5.03	11.8	31.6
	processed	3	308	4.9	1.24	2.4	7.3
	raw	19	2389	12.2	1.71	8.9	15.5

N: Number of articles, n: number of samples; 95 % CI: 95 % Confidence Interval; SE- standard error; FPE- fish processing environment *statistical coefficient.

Table 3
Pooled prevalence of *L. monocytogenes* isolates from different families.

Family	N	n	Pooled prevalence [%]	SE	−95% CI	+95% CI
Anguillidae	2	57	0.0	1.23	0.0	2.4
Carangidae	2	37	1.2	3.96	0.0	9.0
Cichlidae	2	129	18.2*	17.11	0.0	51.8
Clupeidae	4	117	2.4	2.55	0.0	7.4
Cyprinidae	8	2435	4.8*	0.85	3.2	6.5
Engraulidae	2	37	0.9	2.55	0.0	5.9
Gadidae	4	209	15.2*	6.56	2.3	28.1
Mugilidae	4	187	5.7*	4.05	0.0	13.6
Percidae	2	127	5.8	3.53	0.0	12.7
Pleuronectidae	3	41	21.4*	16.37	0.0	53.4
Salmonidae	7	391	28.5*	5.60	17.6	39.5
Scombridae	3	86	0.7	1.53	0.0	3.7
Sparidae	2	56	5.2	2.98	0.0	11.0
Unionidae	1	191	2.1	1.11	0.0	4.3
Xiphiidae	2	14	3.2	7.32	0.0	17.5
Other/mixed	18	2598	5.1*	0.82	3.5	6.7
Seafood	8	421	1.4	0.77	0.0	2.9

N: Number of articles, n: number of samples; 95 % CI: 95 % Confidence Interval; SE- standard error; *statistical coefficient.

Table 4
Pooled prevalence of *Listeria* species isolates from different families.

Family	N	n	Pooled prevalence [%]	SE	−95% CI	+95% CI
Cyprinidae	6	543	20.6*	5.44	9.9	31.2
Gadidae	2	35	3.1	3.15	0.0	9.2
Mugilidae	2	145	8.6*	8.75	0.0	25.8
Salmonidae	5	333	14.4*	7.99	0.0	30.1
Other/ mixed	14	1100	9.7*	2.06	5.6	13.7
Seafood	5	233	11.1	4.20	2.8	19.3

N: Number of articles, n: number of samples; 95 % CI: 95 % Confidence Interval; SE- standard error; *statistical coefficient.

countries, it was noted that Great Britain stands out from other countries, where the pooled prevalence amounted to as much as 76.9 % (95 % CI: 61.8–91.9). The difference between the other countries is significant, in Poland it was 30.3 % (95 % CI: 14.8–45.8), in the USA 23.28 % (95 % CI: 14.0–32.6), and in Portugal- 22.9 % (95 % CI: 0.00–71.7) The lowest prevalence of this pathogen in raw fish was found in Iran, China and Australia where the pooled prevalence was 2.6 % (95 % CI: 1.0–4.2), 2.19 % (95 % CI: 1.7–2.7) and 0.0 % (95 % CI: 0.0–1.5).(Fig. 8). It was not possible to distinguish many countries in the analysis of ready-to-eat products, however, based on the results obtained, it was found that the highest percentage of positive samples was found in Poland (27.7 %, 95 % CI: 2.4–52.9) and Belgium (26.0 %, 95 % CI: 7.7–44.4) (Fig. 9).

Based on the analysis of the prevalence of *L. monocytogenes* in RTE fish products in high-income and lower to middle-income countries were similar and was 13.8 % (95 % CI: 9.7–17.9) and 12.2 % (95 % CI: 6.0–18.5) respectively. Statistical analysis showed that differences

Table 5
Pooled prevalence of *L. monocytogenes* isolates from different species.

Species	N	n	pooled prevalence [%]	SE	−95% CI	+95% CI
Anguilla anguilla	2	57	0.0	1.23	0.0	2.4
Boops boops	2	34	20.1	22.39	0.0	64.0.
Ctenopharyngodon idella	2	442	4.6	1.43	1.7	7.4
Cyprinus carpio	5	468	7.4*	3.78	0.0	14.8
Engraulis encrasicholus	2	37	0.9	2.55	0.0	5.9
Hypophthalmichthys molitrix	3	267	4.9	1.96	1.1	8.8
Liza aurata	2	160	2.8*	2.91	0.0	8.5
Merlangius merlangus	3	61	21.5*	20.86	0.0	62.4
Mugil cephalus	2	27	49.1*	45.73	0.0	100.0
Oncorhynchus mykiss	4	208	36.9*	11.27	14.8	59.0
Perca fluvialitis	2	127	5.8	3.53	0.0	12.7
Salmo salar	4	110	30.3*	9.43	11.8	48.8
Salmo truta	2	48	21.4*	13.13	0.0	47.2
Trachulus trachurus	2	37	1.2	3.962	0.0	9.0
Xiphias gladius	2	14	3.2	7.32	0.0	17.5
Hippoglossus hippoglossus	2	36	0.0	2.20	0.0	4.3

N: Number of articles, n: number of samples; 95 % CI: 95 % Confidence Interval; SE- standard error; *statistical coefficient.

Table 6
Pooled prevalence of *Listeria* sp. isolates from different species.

Species	N	n	Pooled prevalence [%]	SE	−95% CI	+95% CI
Cyprinus carpio	4	115	21.5*	11.24	0.0	43.5
Hypophthalmiachthys molitrix	2	157	17.6	4.74	8.3	27.0
Merlangius merlangus	2	35	3.1	3.15	0.0	9.2
Oncorhynchus mykiss	4	308	18.2*	8.89	0.8	35.6

N: Number of articles, n: number of samples; 95 % CI: 95 % Confidence Interval; SE- standard error; *statistical coefficient.

within and between groups are significant and the *p*-value is <0.000001 However, huge discrepancies were observed in the occurrence of *L. monocytogenes* in raw fish, as in lower to middle-income countries it was only 3.0 % (95 % CI: 2.3–3.7), while in high-income countries it was as much as 15.0 % (95 % CI: 11.9–18.1) Statistical analysis showed that differences within groups are significant and the p-value is <0.000001, however the differences between groups are not significant and the p-value is 0.3329 (Table 7).

4. Discussion

The issue of food safety is still a current topic. Both established and emerging nations are constantly searching for solutions to issues with food safety. Food safety is most important in relation to groups of people

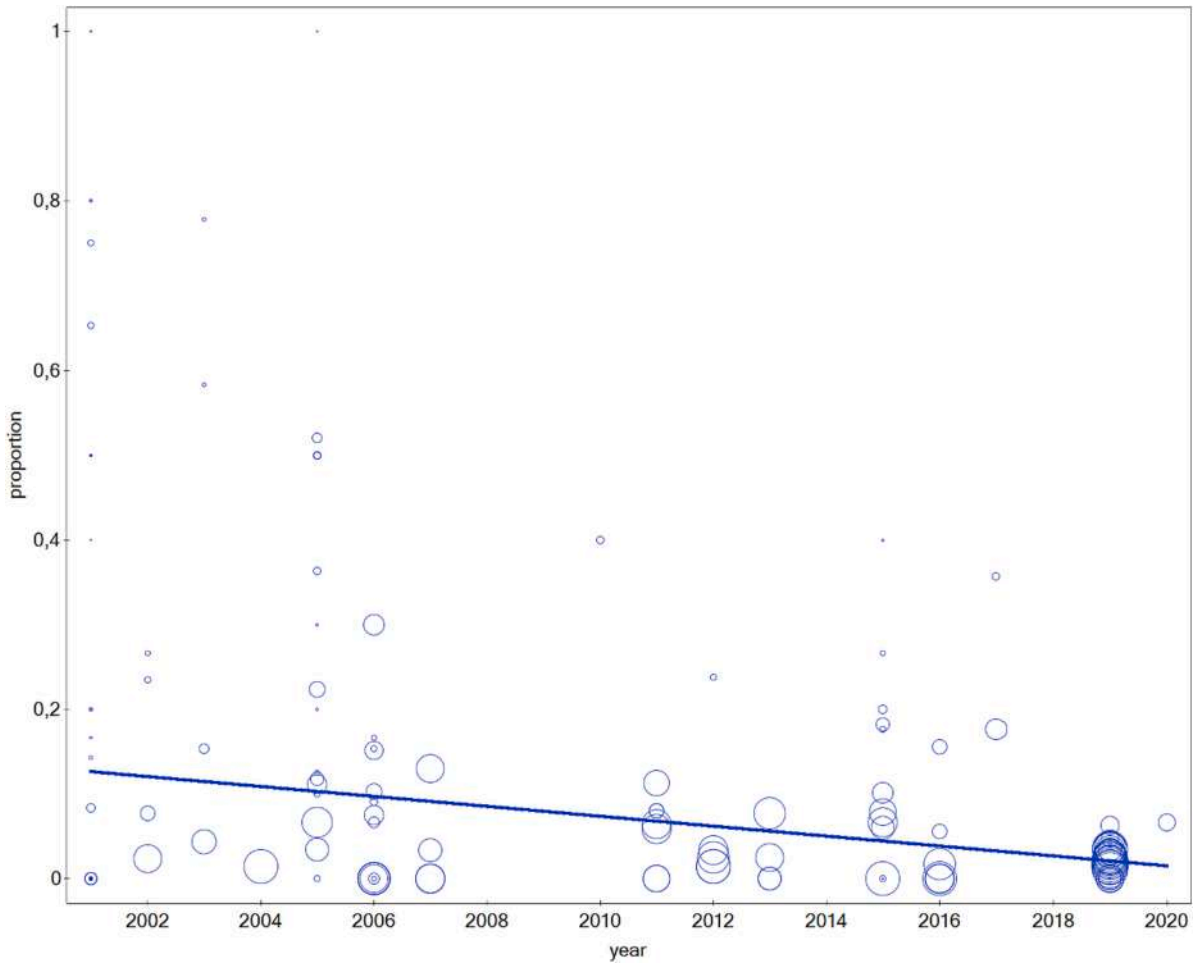


Fig. 2. Meta-regression plot of study year versus the prevalence of *L. monocytogenes* in raw fish.

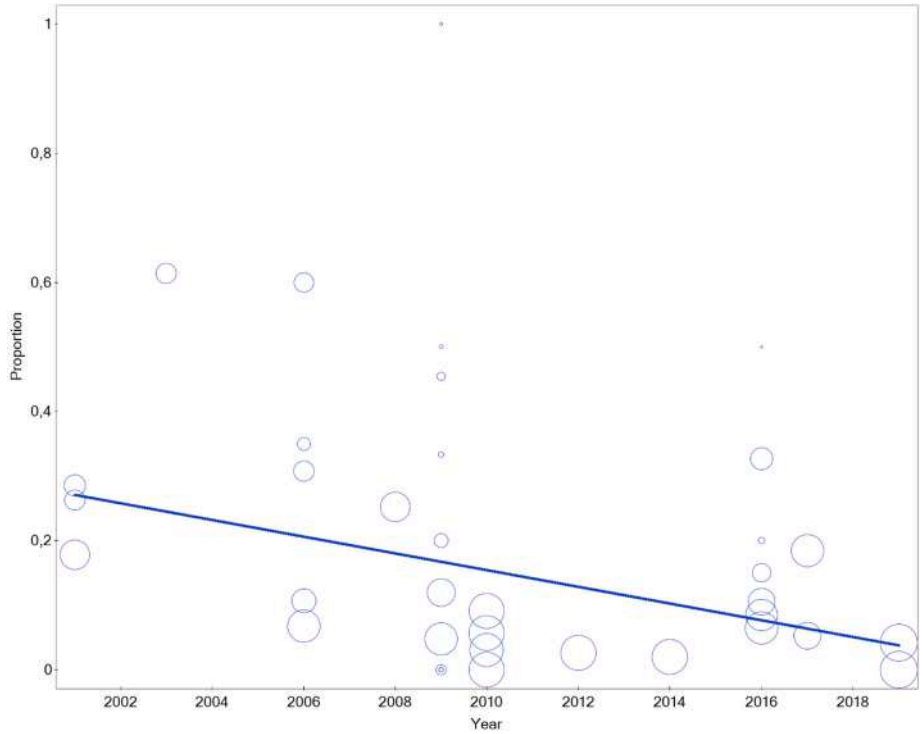


Fig. 3. Meta-regression plot of study year versus the prevalence of *L. monocytogenes* in RTE fish products.

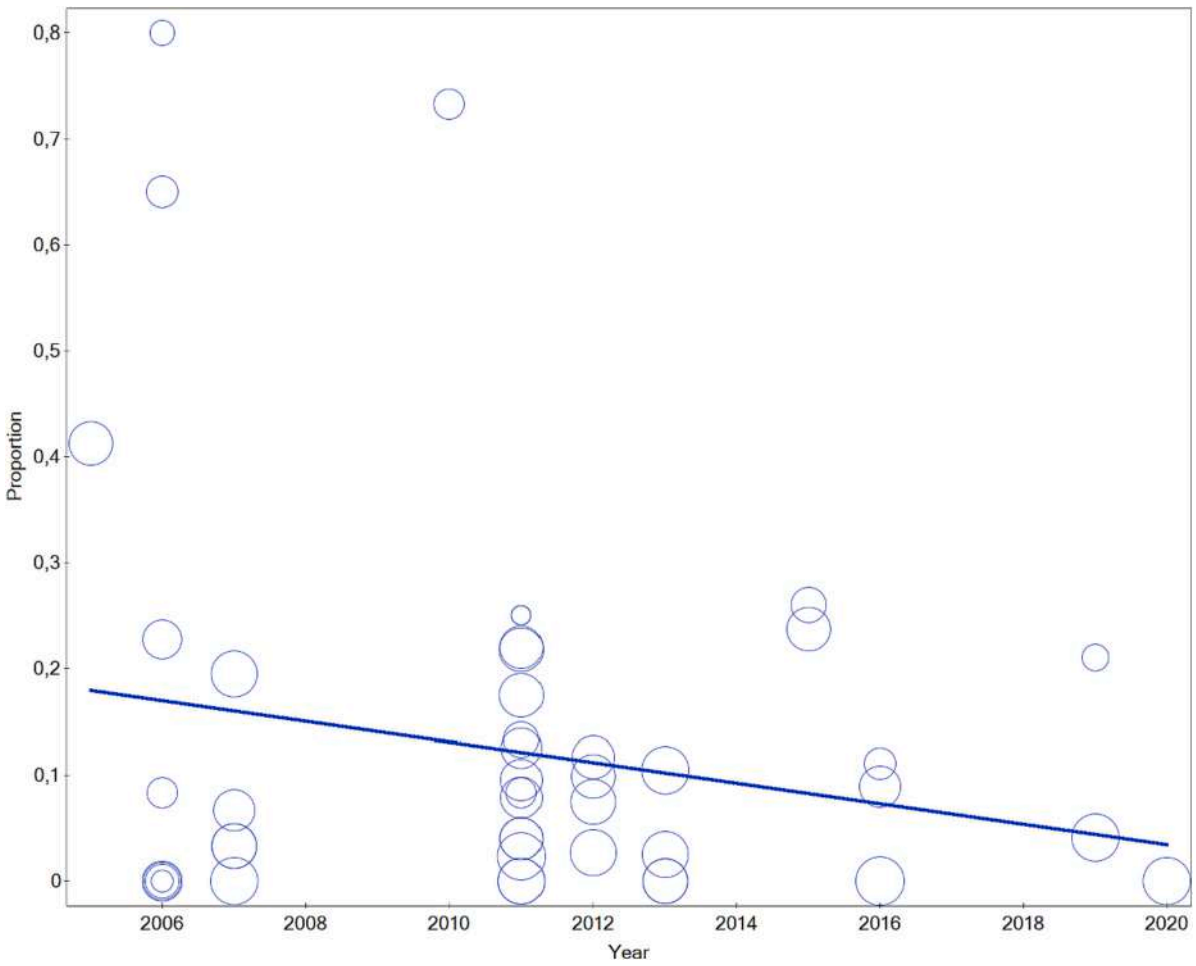


Fig. 4. Meta-regression plot of study year versus the prevalence of *Listeria* sp. in raw fish.

with an increased risk of infection, including children, the elderly and immunosuppressed people, and especially pregnant women, for whom infections should not pose a threat but may cause miscarriage. One of the most important pathogens isolated from food is *L. monocytogenes*, and a common source of food infections with this pathogen, especially individual ones, are fish and seafood.

Listeria species are a naturally occurring microbiota found in surface waters and other water reservoirs that are linked to rivers. *Listeria* is frequently detected on the external surface of fish that are obtained from polluted water sources. *L. monocytogenes* has been found to be present in the stomach lining, gills, and intestines in an environment that has been contaminated. Muscle tissue is infrequently affected by contamination (Jami et al., 2014). The contamination of fish muscle can transpire through two potential pathways. Firstly, the dissemination of *L. monocytogenes* from intestinal contents to other fish tissues, particularly muscles, may occur if the duration between death and the elimination of viscera surpasses a few hours. Secondly, cross-contamination at every stage of the supply chain, where containers, vessels, water, and ice can serve as potential sources of this pathogen, is another possibility. Human and avian sources also play a crucial role in contamination. (Soultos et al., 2007). The prevalence of *L. monocytogenes* in processing plants is related to biofilm attachment and formation in inaccessible locations. They are found mostly in damp and dirty places and those hard to reach as holes and fissures in fibrous, porous, rusting and empty materials (Carpentier et al., 2012) (Tabit, 2018). The *Listeria* species is much more often isolated from fish caught or reared from surface waters in which it lives naturally (FAO, 1999).

The manufacturing process of numerous ready-to-eat (RTE) meat products uses factors affecting the growth of *L. monocytogenes* through various means such as the addition of salt, cooking or drying to decrease water activity, or the incorporation of fermentation or acidulants to lower pH levels. These processes effectively hinder the growth of *L. monocytogenes* within the product (Gómez et al., 2015). However, due to the ability to grow in contaminated food during storage at the cooling temperature *L. monocytogenes* was found in raw and processed products that required storage at low temperature. Therefore, food passing through the successive stages of the cold chain can come into contact with *Listeria* and allow it to develop (Lunamarina, 2018; Tabit, 2018). This can be seen in our results as *L. monocytogenes* was present in almost 10 % more samples from ready-to-eat fish products compared to raw products.

According to The European Union One Health 2021 Zoonoses Report the prevalence of *L. monocytogenes* in ready-to-eat food products persisted as one of the most significant issues in recent years, ranging from 3.5 % to 5.4 % and averaging at 4.7 %. Poland reported a notably high number of tested samples from fish batches, with a total of 4893 samples tested. Interestingly, the total number of tested fish samples compared to 2020 increased 3 times in 2021 from 11,212 to 29,273 (The European Union One Health 2021 Zoonoses Report, 2022). Only in Poland, out of 28 food alerts from the European Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF), as many as eight concerned *L. monocytogenes* in fish products. The notifications mainly concerned smoked fish, including salmon, eel and trout, other ready-to-eat products (sushi, cavior) and raw fish European Commission (RASFF, n.d.). In our analysis, *L. monocytogenes* in Europe was found in 2.2 % of raw fish and as much as 19.2 % in ready-to-eat products. Overall, it is difficult to explain such large differences in

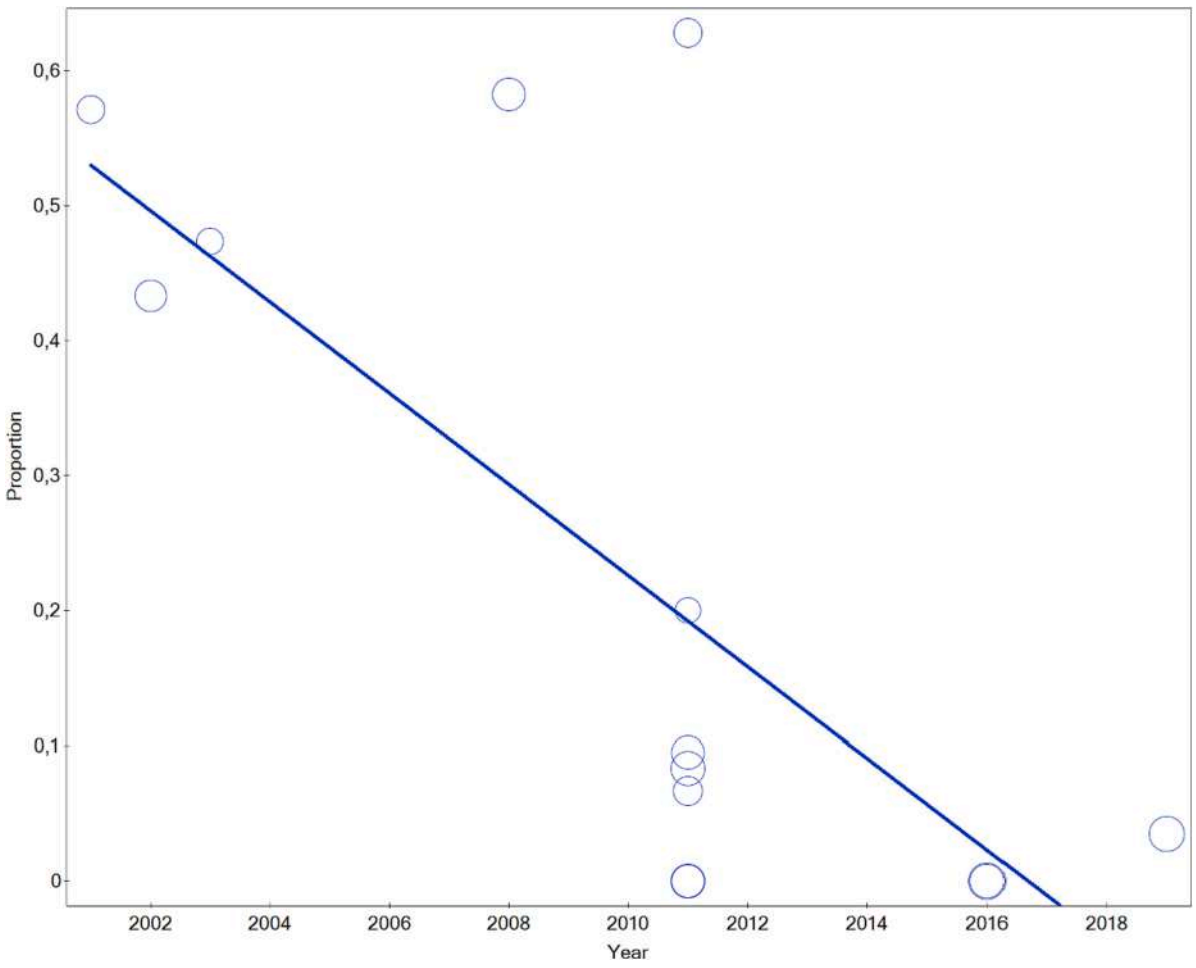


Fig. 5. Meta-regression plot of study year versus the prevalence of *Listeria* sp. in RTE fish products.

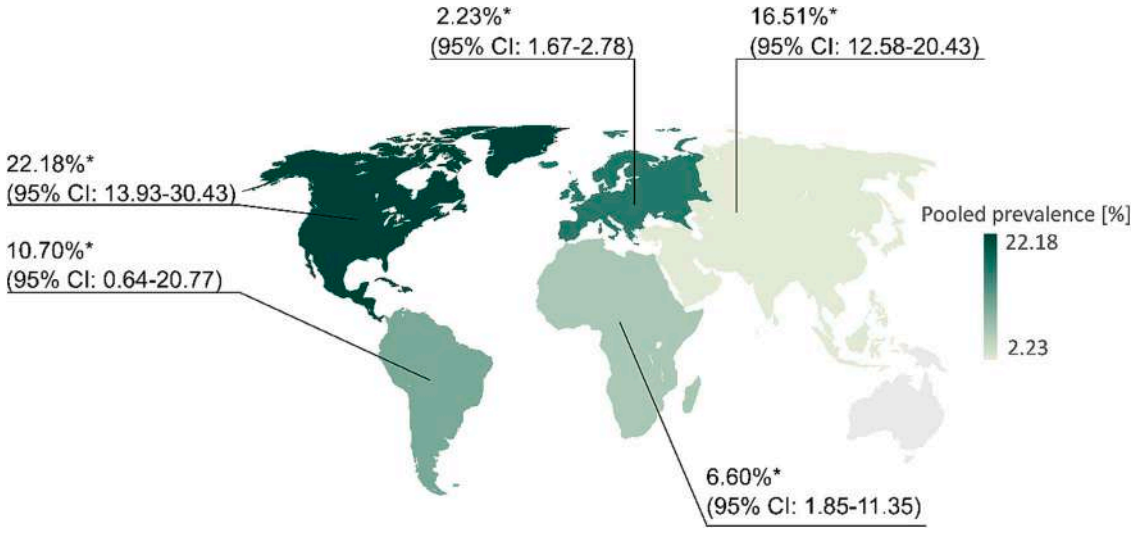


Fig. 6. World map showing the continental prevalence of *L. monocytogenes* in raw fish.

the occurrence of *L. monocytogenes* in raw fish in countries with high levels because the predominant origin of *Listeria* contamination is commonly the introduction of raw fish ingredients into the manufacturing facility. *Listeria* is frequently present in coastal waters and surface waters of lakes, hence increasing the likelihood of fish caught or grown in these environments becoming contaminated with this particular bacteria (Nihal and Şenay, 2010) which may explain such a high contamination of the *Mugil cephalus* species. One possible explanation could be imports, as we mentioned earlier, fish meat is conducive to the growth of *Listeria*, therefore the extended time from catch to sale may increase the detection rate. Another aspect is the frequency and quality of sampling, in high-income countries there are a number of

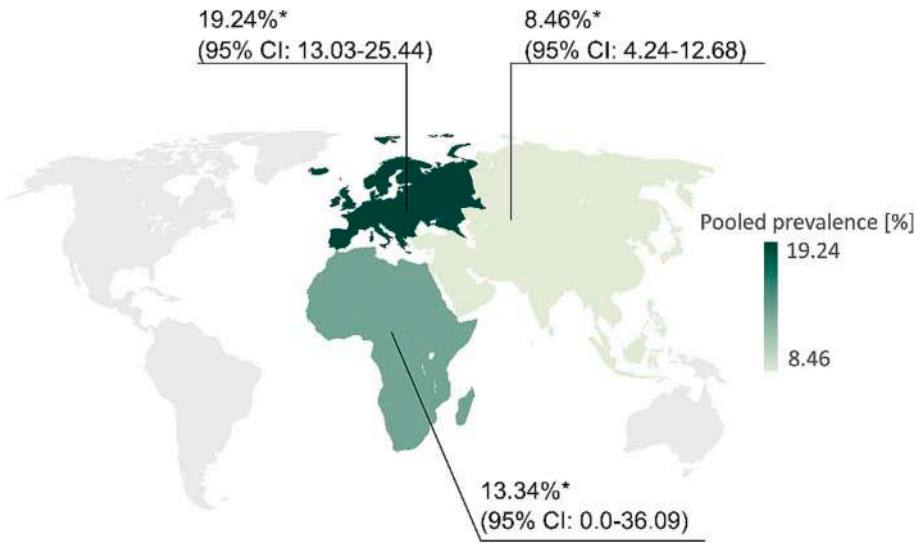


Fig. 7. World map showing the continental prevalence of *L. monocytogenes* in RTE fish products.



Fig. 8. World map showing the prevalence of *L. monocytogenes* in raw fish in countries.

regulations that oblige manufacturers to carry out numerous tests. It should be noted, however, that even in countries with high income, shortcomings occur. Finnish scientists observed that in fish processing plants *Listeria* occurrence is linked to frequent non-compliance related to processing machinery, repeated non-compliance and frequent non-compliance that required intervention from inspecting authorities. They emphasized that official controls were directed towards the riskiest areas, violations were still frequent and often not adequately addressed (Aalto-Araneda et al., 2018). An additional aspect conducive to high contamination may be aquaculture, in 2021 the two main species bred were Salmon (30 % of aquaculture in the EU) and Trout (13 % of aquaculture in the EU), in these species contamination was observed at the level of 30.3 % and 36.9 %, respectively (The EU Fish Market, 2021). The limited number of samples of many species makes it difficult to draw clear conclusions. There are several meta-analyses that address the problem of the occurrence of *L. monocytogenes* in animal products such as meat products (Cavalcanti et al., 2022; Gonçalves-Tenório et al., 2018; Y. Liu et al., 2020; Zhang et al., 2023), chesses (Martinez-Rios and Dalgaard, 2018) or investigated occurrence in more holistic approach (Hamidiyan et al., 2018; Jibo et al., 2022; Rostamian et al., 2022). To our knowledge, this is the first meta-analysis on the occurrence of *L. monocytogenes* and other *Listeria* sp. in fish, fish products and the fish processing environment.

In a similar meta-analysis evaluating meat and meat products in China, it was found that pooled prevalence of *L. monocytogenes* was 8.5 % (95 % CI: 7.1 %–10.3 %) in raw meats and 3.2 % (95 % CI: 2.7–3.9) in ready-to-eat meats (Y. Liu et al., 2020), while in studies conducted in Brazil, the prevalence of *L. monocytogenes* was 14.0 % and 11.0 % for raw meat and ready-to-eat meat respectively (Cavalcanti et al., 2022), this is higher prevalence than China's raw fish *Listeria* occurrence of 2.2 %. In general, in raw fish, pooled prevalence was lower than in RTE fish products. It is an interesting finding, as it is contrary to mentioned meta-



Fig. 9. World map showing the prevalence of *L. monocytogenes* in RTE fish products in countries.

Table 7
Pooled prevalence of *L. monocytogenes* isolates from raw fish and RTE fish products depending on economic status of region.

Source		N	n	Pooled prevalence [%]	SE	−95% CI	+95% CI
Raw	High-income	14	1675	15.0*	1.59	11.9	18.1
	Lower to middle-income	19	5460	3.0*	0.34	2.3	3.7
RTE	High-income	9	1499	13.8*	2.11	9.7	17.9
	Lower to middle-income	6	493	12.2*	3.21	6.0	18.5

N: Number of articles, n: number of samples; 95 % CI: 95 % Confidence Interval; SE- standard error; *statistical coefficient.

analysis of *L. monocytogenes* in meat and meat products. This may be due to the fact that, to a large extent, ready-to-eat products are cold-smoked fish, and this method, despite the high salinity, has little impact on the reduction of microorganisms, especially *L. monocytogenes*. Our observations also agree with the results reported by EFSA report.

The present meta-analysis possesses certain limitations that necessitate attention and resolution. The publications examined in the study did not provide any published data regarding the prevalence of *L. monocytogenes* and/or *Listeria* sp. in several countries. In this particular scenario, the utilization of a national or regional registry for *Listeria* sp. isolates can offer a more comprehensive dataset to address the existing knowledge gap. However, it is important to acknowledge that there exists a notable publication bias in the data on the frequency of *L. monocytogenes*. This bias arises from the fact that studies reporting no contamination in food and the food environment are more prone to rejection by academic journals. The potential impact of sampling and sampling practices on the underestimating of prevalence should be acknowledged.

5. Conclusions

The results of the present study provide a valuable epidemiological information about the contamination status and distribution of *L. monocytogenes* and other *Listeria* sp. among raw fish, ready-to-eat product and fish processing environment. Despite the restrictive law regarding the occurrence of *L. monocytogenes*, it is still a current problem. The processing of fish, due to the small amount of connective tissue compared to other products of animal origin, is characterized by the lack of drastic techniques effective in combating microorganisms and the frequent failure to follow the recommendations to maintain product safety results in a higher percentage of *L. monocytogenes* in ready-to-eat products compared to raw fish. Although the meta-regression shows a decrease in the percentage of *Listeria* in RTE products, there is still a need to improve production safety.

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167912.

CRediT authorship contribution statement

Arkadiusz Józef Zakrzewski: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing – original draft, Funding acquisition. **Joanna Gajewska:** Formal analysis, Investigation, Writing – review & editing. **Wioleta Chajęcka-Wierzchowska:** Validation, Writing – review & editing. **Dariusz Załuski:** Methodology. **Anna Zadernowska:** Validation, Writing – review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

This research was funded in whole by National Science Centre (Poland), Grant number: 2021/41/N/NZ9/00845. The publication was written as a result of the author's internship in the Functional Food Forum, University of Turku, co-financed by the European Union under the European Social Fund (Operational Program Knowledge Education Development), carried out in the project Development Program at the University of Warmia and Mazury in Olsztyn (POWR.03.05. 00-00-Z310/17).

References

Aalto-Araneda, M., Korkeala, H., Lundén, J., 2018. Strengthening the efficacy of official food control improves Listeria monocytogenes prevention in fish-processing plants. Sci. Rep. 8 (1), 1–9. https://doi.org/10.1038/s41598-018-31410-9.

Aalto-Araneda, M., Lundén, J., Markkula, A., Hakola, S., Korkeala, H., 2019. Processing plant and machinery sanitation and hygiene practices associate with Listeria monocytogenes occurrence in ready-to-eat fish products. Food Microbiol. 82, 455–464. https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.03.017.

Abdollahzadeh, E., Ojagh, S.M., Hosseini, H., Irajian, G., Ghaemi, E.A., 2016. Prevalence and molecular characterization of Listeria spp. and Listeria monocytogenes isolated from fish, shrimp, and cooked ready-to-eat (RTE) aquatic products in Iran. LWT 73, 205–211. https://doi.org/10.1016/J.LWT.2016.06.020.

Akkaya, L., Atabay, H.I., Gok, V., Kara, R., 2011. Detection of Listeria species in fresh fish and fish market environment by IMS technique in Turkey. Archiv Fur Lebensmittelhygiene 62 (1), 16–19. https://doi.org/10.2376/0003-925X-62-16.

Akpolat, N.Ö., Elci, S., Atmaca, S., Gül, K., 2004. Listeria monocytogenes in products of animal origin in Turkey. Vet. Res. Commun. 28 (7), 561–567. https://doi.org/10.1023/B:VERC.0000042872.07616.18.

Al-Gburi, N.M., 2020. Detection and pathogenicity of listeria monocytogenes in common carp (Cyprinus carpio) fish in Baghdad, Iraq. Iraqi J. Vet. Sci. 34 (2), 311–316. https://doi.org/10.33899/IJVS.2019.125980.1205.

Ananchaipattana, C., Hosotani, Y., Kawasaki, S., Pongsawat, S., Md.Latiful, B., Isobe, S., Inatsu, Y., 2012. Prevalence of foodborne pathogens in retailed foods in Thailand. Foodborne Pathog. Dis. 9 (9), 835–840. https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1169.

Antkowiak, L., Tabakow, P., 2021. Comparative assessment of three posterior Fossa decompression techniques and evaluation of the evidence supporting the efficacy of Syrinx shunting and filum Terminale sectioning in Chiari malformation type I. A systematic review and network Meta-analysis. World Neurosurg. 152, 31–43. https://doi.org/10.1016/J.WNEU.2021.05.124.

Basha, K.A., Kumar, N.R., Das, V., Reshmi, K., Rao, B.M., Lalitha, K.V., Joseph, T.C., 2019. Prevalence, molecular characterization, genetic heterogeneity and antimicrobial resistance of Listeria monocytogenes associated with fish and fishery environment in Kerala. India. https://doi.org/10.1111/lam.13205.

Basti, A.A., Misaghi, A., Salehi, T.Z., Kamkar, A., 2006. Bacterial pathogens in fresh, smoked and salted Iranian fish. Food Control 17 (3), 183–188. https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2004.10.001.

Buchanan, R.L., Gorris, L.G.M., Hayman, M.M., Jackson, T.C., Whiting, R.C., 2017. A review of Listeria monocytogenes: an update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. Food Control 75, 1–13. https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2016.12.016.

Cao, J., Witkowski, R., Lu, H., Abolmaaaty, A., Lu, S., Levin, R.E., 2005. Detection, enumeration, and RAPD analysis of Listeria monocytogenes isolates in fish derived from retail outlets in western Massachusetts. Food Biotechnol. 19 (2), 145–160. https://doi.org/10.1081/FBT-200063463.

Carpentier, B., Barre, L., Barbuti SSICA Italy Canet Noguera FECIC Spain H da Silva Mateus Fernandes Guedes, S. J., Dufour SILLIKER SAS France Español Pueyo, C. A., Ferreira Tavares, A. L., Leglise, P., Pardos Bosch, J., Sanchez Hernandez, J., Stahl, V., Jorge Portugal Toomas Kramarenko, R. J., & Lm, E. (2012). Maisons-Alfort Laboratory for Food Safety Guidelines on Sampling the Food Processing Area and Equipment for the Detection of *Listeria monocytogenes*.

Cavalcanti, A.A.C., Limeira, C.H., de Siqueira, I.N., de Lima, A.C., de Medeiros, F.J.P., de Souza, J.G., Medeiros, N.G. de A., de Oliveira Filho, A.A., de Melo, M.A., 2022. The prevalence of Listeria monocytogenes in meat products in Brazil: a systematic literature review and meta-analysis. Res. Vet. Sci. 145, 169–176. https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2022.02.015.

Chen, B.Y., Pyla, R., Kim, T.J., Silva, J.L., Jung, Y.S., 2010. Prevalence and contamination patterns of Listeria monocytogenes in catfish processing environment and fresh fillets. Food Microbiol. 27 (5), 645–652. https://doi.org/10.1016/J.FM.2010.02.007.

Cummins, A.J., Fielding, A.K., McLauchlin, J., 1994. Listeria ivanovii infection in a patient with AIDS. J. Infect. 28 (1), 89–91.

Davies, A.R., Capell, C., Jehanno, D., Nychas, G.J.E., Kirby, R.M., 2001. Incidence of foodborne pathogens on European fish. Food Control 12 (2), 67–71. https://doi.org/10.1016/S0956-7135(00)00022-0.

Di Ciccio, P., Meloni, D., Festino, A.R., Conter, M., Zanardi, E., Ghidini, S., Vergara, A., Mazzette, R., Ianieri, A., 2012. Longitudinal study on the sources of Listeria monocytogenes contamination in cold-smoked salmon and its processing environment in Italy. Int. J. Food Microbiol. 158 (1), 79–84. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.016.

Dominguez, C., Gomez, I., Zumalacarregui, J., 2001. Prevalence and contamination levels of Listeria monocytogenes in smoked fish and Pâté sold in Spain. J. Food Prot. 64 (12), 2075–2077. https://doi.org/10.4315/0362-028X-64.12.2075.

El-Shenawy, M.A., El-Shenawy, M.A., 2006. Listeria spp. in the coastal environment of the Aqaba Gulf, Suez Gulf and the Red Sea. Epidemiol. Infect. 134 (4), 752–757. https://doi.org/10.1017/S0950268805005601.

Ertaş, H.B., Şeker, E., 2005. Isolation of Listeria monocytogenes from fish intestines and RAPD analysis. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 29 (4), 1007–1011.

FAO, 1999. Report of the FAO Expert Consultation on the Trade Impact of Listeria in Fish Products: Amherst, MA, United States, 17–20 May 1999. FAO. http://www.fao.org/3/x3018e/x3018e00.htm.

Garedew, L., Taddese, A., Biru, T., Nigatu, S., Kebede, E., Ejo, M., Fikru, A., Birhanu, T., 2015. Prevalence and antimicrobial susceptibility profile of listeria species from ready-to-eat foods of animal origin in Gondar Town, Ethiopia. BMC Microbiol. 15 (1) https://doi.org/10.1186/S12866-015-0434-4.

Gómez, D., Iguácel, L.P., Rota, M.C., Josécarramiñana, J., Ariño, A., Yangüela, J., 2015. Occurrence of listeria monocytogenes in ready-to-eat meat products and meat processing plants in Spain. Foods 4 (3), 271–282. https://doi.org/10.3390/FOODS4030271.

Gonçalves-Tenório, A., Nunes Silva, B., Rodrigues, V., Cadavez, V., Gonzales-Barron, U., 2018. Prevalence of pathogens in poultry meat: a meta-analysis of european published surveys. Foods *7* (5), 69. https://doi.org/10.3390/FOODS7050069.

Hamidiyan, N., Salehi-Abargouei, A., Rezaei, Z., Dehghani-Tafti, R., Akrami-Mohajeri, F., 2018. The prevalence of Listeria spp. food contamination in Iran: a systematic review and meta-analysis. Food Res. Int. 107, 437–450. https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.02.038.

Hellberg, R.S., DeWitt, C.A.M., Morrissey, M.T., 2012. Risk-benefit analysis of seafood consumption: a review. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 11 (5), 490–517. https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2012.00200.x.

Herrera, F.C., Santos, J.A., Otero, A., García-López, M.L., 2006. Occurrence of foodborne pathogenic bacteria in retail prepackaged portions of marine fish in Spain. J. Appl. Microbiol. 100 (3), 527–536. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02848.x.

Hudson, L.K., Chaggar, H.K., Schamp, C.N., Claxton, M.L., Bryan, D.W., Peters, T.L., Song, Y., Carlin, C.R., den Bakker, H.C., Denes, T.G., 2022. Phenotypic characterization and analysis of complete genomes of two distinct strains of the proposed species "L. swaminathanii.". Sci. Rep. 12 (1), 1–10. https://doi.org/10.1038/s41598-022-13119-y.

Jallewar, P.K., Kalorey, D.R., Kurkure, N.V., Pande, V.V., Barbuddhe, S.B., 2007. Genotypic characterization of Listeria spp. isolated from fresh water fish. Int. J. Food Microbiol. 114 (1), 120–123. https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2006.09.034.

Jamali, H., Paydar, M., Ismail, S., Looi, C.Y., Wong, W.F., Radmehr, B., Abedini, A., 2015. Prevalence, antimicrobial susceptibility and virulotyping of Listeria species and Listeria monocytogenes isolated from open-air fish markets. BMC Microbiol. 15 (1), 1–7. https://doi.org/10.1186/S12866-015-0476-7/TABLES/3.

Jami, M., Ghanbari, M., Zunabovic, M., Domig, K.J., Kneifel, W., 2014. *Listeria monocytogenes* in aquatic food products-a review. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 13 (5), 798–813. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12092.

Jelena, K., Ružica, A., Baltić Mišić, D., Mirjana, D., Marija, S., Ašanin, N., & Kovačević, I. K. (2011). Presence of Listeria spp. in fish samples, fish products and sea products. Acta Vet. Brno, 61(2–3), 193–203. doi:https://doi.org/10.2298/AVB1103193K.

Jibo, G.G., Raji, Y.E., Salawudeen, A., Amin-Nordin, S., Mansor, R., Jamaluddin, T.Z.M. T., 2022. A systematic review and meta-analysis of the prevalence of Listeria monocytogenes in South-East Asia; a one-health approach of human-animal-food-environment. One Health 15, 100417. https://doi.org/10.1016/J.ONEHLT.2022.100417.

Kim, H.W., Hong, Y.J., Jo, J.I., Ha, S.D., Kim, S.H., Lee, H.J., Rhee, M.S., 2017. Raw ready-to-eat seafood safety: microbiological quality of the various seafood species available in fishery, hyper and online markets. Lett. Appl. Microbiol. 64 (1), 27–34. https://doi.org/10.1111/LAM.12688.

Kramarenko, T., Roasto, M., Keto-Timonen, R., Mäesaar, M., Meremäe, K., Kuningas, M., Hörman, A., Korkeala, H., 2016. Listeria monocytogenes in ready-to-eat vacuum and modified atmosphere packaged meat and fish products of Estonian origin at retail level. Food Control 67, 48–52. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.02.034.

Laciar, A.L., de Centorbi, O.N.P., 2002. Listeria species in seafood: isolation and characterization of Listeria spp. from seafood in San Luis, Argentina. Food Microbiol. 19 (6), 645–651. https://doi.org/10.1006/fmic.2002.0454.

Lampila, L.E., McMillin, K.W., 2012. Major microbial hazards associated with packaged seafood. Advances in Meat, Poultry and Seafood Packaging 59–85. https://doi.org/10.1533/9780857095718.1.59.

Leclercq, A., Moura, A., Vales, G., Tessaud-Rita, N., Aguilhon, C., Lecuit, M., 2019. Listeria thailandensis sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 69 (1), 74–81. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003097.

Li, Y., Pei, X., Yan, J., Liu, D., Zhang, H., Yu, B., Li, N., Yang, D., 2019. Prevalence of foodborne pathogens isolated from retail freshwater fish and shellfish in China. Food Control 99, 131–136. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.12.024.

Liu, D., Lawrence, M.L., Ainsworth, A.J., Austin, F.W., 2005. Comparative assessment of acid, alkali and salt tolerance in *Listeria monocytogenes* virulent and avirulent strains. FEMS Microbiol. Lett. 243 (2), 373–378. https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.12.025.

Liu, Y., Sun, W., Sun, T., Gorris, L.G.M., Wang, X., Liu, B., Dong, Q., 2020. The prevalence of Listeria monocytogenes in meat products in China: a systematic literature review and novel meta-analysis approach. Int. J. Food Microbiol. 312, 108358 https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2019.108358.

Lunamarina, 2018. The Rapid Alert System for Food and Feed 2017 Annual Report.

Martinez-Rios, V., Dalgaard, P., 2018. Prevalence of Listeria monocytogenes in European cheeses: a systematic review and meta-analysis. Food Control 84, 205–214. https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2017.07.020.

Mędrala, D., Dąbrowski, W., Czekajło-Kołodziej, U., Daczkowska-Kozon, E., Koronkiewicz, A., Augustynowicz, E., Manzano, M., 2003. Persistence of Listeria monocytogenes strains isolated from products in a Polish fish-processing plant over a 1-year period. Food Microbiol. 20 (6), 715–724. https://doi.org/10.1016/S0740-0020(02)00173-9.

Meloni, D., Galluzzo, P., Mureddu, A., Piras, F., Griffiths, M., Mazzette, R., 2009. Listeria monocytogenes in RTE foods marketed in Italy: prevalence and automated EcoRI ribotyping of the isolates. Int. J. Food Microbiol. 129 (2), 166–173. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.11.014.

Miettinen, H., Wirtanen, G., 2006. Ecology of Listeria spp. in a fish farm and molecular typing of Listeria monocytogenes from fish farming and processing companies. Int. J. Food Microbiol. 112 (2), 138–146. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.016.

Miettinen, H., Aarnisalo, K., Salo, S., Sjöberg, A.M., 2001. Evaluation of surface contamination and the presence of Listeria monocytogenes in fish processing factories. J. Food Prot. 64 (5), 635–639. https://doi.org/10.4315/0362-028X-64.5.635.

Miya, S., Takahashi, H., Ishikawa, T., Fujii, T., Kimura, B., 2010. Risk of listeria monocytogenes contamination of raw ready-to-eat seafood products available at retail outlets in Japan. Appl. Environ. Microbiol. 76 (10), 3383–3386. https://doi.org/10.1128/AEM.01456-09.

Modaresi, Rojan, 2011. Prevalence of Listeria spp. in fish obtained from Urmia fish markets. Afr. J. Microbiol. Res. 5 (30) https://doi.org/10.5897/AJMR11.888.

Momtaz, H., Yadollahi, S., 2013. Molecular characterization of Listeria monocytogenes isolated from fresh seafood samples in Iran. Diagn. Pathol. 8 (1) https://doi.org/10.1186/1746-1596-8-149.

Muchaamba, F., Eshwar, A.K., Stevens, M.J.A., Stephan, R., Tasara, T., 2022. Different shades of Listeria monocytogenes: strain, serotype, and lineage-based variability in virulence and stress tolerance profiles. Front. Microbiol. 12, 792162 https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.792162/BIBTEX.

Nakamura, H., Tokuda, Y., Sono, A., Koyama, T., Ogasawara, J., Hase, A., Haruki, K., Nishikawa, Y., 2006. Molecular typing to trace Listeria monocytogenes isolated from cold-smoked fish to a contamination source in a processing plant. J. Food Prot. 69 (4), 835–841. https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.4.835.

Nihal, Y., Şenay, B., 2010. Prevalence of listeria, Aeromonas, and Vibrio species in fish used for human consumption in Turkey. J. Food Prot. 73 (2), 380–384. https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.2.380.

Osek, J., Wieczorek, K., 2022. Listeria monocytogenes— how this pathogen uses its virulence mechanisms to infect the hosts. Pathogens 11 (12), 1491. https://doi.org/10.3390/PATHOGENS11121491.

People at Risk | Listeria | CDC. Retrieved from. https://www.cdc.gov/listeria/risk.html (22.03.2023).

Rahimi, E., Shakerian, A., Raissy, M., 2012. Prevalence of Listeria species in fresh and frozen fish and shrimp in Iran. Ann. Microbiol. 62 (1), 37–40. https://doi.org/10.1007/s13213-011-0222-9.

RASFF. Food and Feed Safety Alerts. Retrieved from. https://ec.europa.eu/food/safety/rasff_en (04.09.2023).

Raufu, I.A., Moura, A., Vales, G., Ahmed, O.A., Aremu, A., Thouvenot, P., Tessaud-Rita, N., Bracq-Dieye, H., Krishnamurthy, R., Leclercq, A., Lecuit, M., 2022. Listeria ilorinensis sp. nov., isolated from cow milk cheese in Nigeria. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 72 (6), 005437 https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.005437/CITE/REFWORKS.

Rocourt, J., Hof, H., Schrettenbrunner, A., Malinverni, R., Bille, J., 1986. Acute purulent Listeria seelingeri meningitis in an immunocompetent adult. Schweiz. Med. Wochenschr. 116 (8), 248–251.

Rodas-Suárez, O.R., Flores-Pedroche, J.F., Betancourt-Rule, J.M., Quiñones-Ramírez, E. I., Vázquez-Salinas, C., 2006. Occurrence and antibiotic sensitivity of Listeria monocytogenes strains isolated from oysters, fish, and estuarine water. Appl. Environ. Microbiol. 72 (11), 7410–7412. https://doi.org/10.1128/AEM.00956-06.

Rostamian, M., Kooti, S., Mohammadi, B., Salimi, Y., Akya, A., 2022. A systematic review and meta-analysis of Listeria monocytogenes isolated from human and non-human sources: the antibiotic susceptibility aspect. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 102 (4), 115634 https://doi.org/10.1016/J.DIAGMICROBIO.2022.115634.

Salihu, M.D., Junaidu, A.U., Manga, S.B., Gulumbe, M.L., Magaji, A.A., Ahmed, A., Adamu, A.Y., Shittu, A., Balarabe, I., 2010. Occurrence of *Listeria* monocytogenes in smoked fish in Sokoto, Nigeria. Afr. J. Biotechnol. 7 (17), 3082–3084. https://doi.org/10.4314/ajb.v7i17.59232.

Selvaganapathi, R., Jeyasekaran, G., Shakila, R.J., Sukumar, D., Kumar, M.P., Sivaraman, B., 2018. Occurrence of Listeria monocytogenes on the seafood contact surfaces of Tuticorin Coast of India. J. Food Sci. Technol. 55 (7), 2808–2812. https://doi.org/10.1007/s13197-018-3230-y.

Skowron, K., Kwiecińska-Piróg, J., Grudlewska, K., Świeca, A., Paluszak, Z., Bauza-Kaszewska, J., Wałecka-Zacharska, E., Gospodarek-Komkowska, E., 2018. The occurrence, transmission, virulence and antibiotic resistance of Listeria monocytogenes in fish processing plant. Int. J. Food Microbiol. 282, 71–83. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.011.

Soultos, N., Abrahim, A., Papageorgiou, K., Steris, V., 2007. Incidence of Listeria spp. in fish and environment of fish markets in Northern Greece. Food Control 18 (5), 554–557. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.01.006.

Svanevik, C.S., Roiha, I.S., Levsen, A., Lunestad, B.T., 2015. Microbiological assessment along the fish production chain of the Norwegian pelagic fisheries sector – results from a spot sampling programme. Food Microbiol. 51, 144–153. https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.05.016.

Tabit, F.T., 2018. Contamination, prevention and control of *Listeria monocytogenes* in food processing and food service environments. In *Listeria Monocytogenes*. InTech. https://doi.org/10.5772/intechopen.76132.

Terentjeva, M., Eizenberga, I., Valciņa, O., Novoslavskij, A., Strazdiņa, V., Berziņš, A., 2015. Prevalence of foodborne pathogens in freshwater fish in Latvia. J. Food Prot. 78 (11), 2093–2098. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-121.

The EU Fish Market, 2021. edition, (2022) European Commission. https://doi.org/10.2771/563899.

The European Union One Health 2021 Zoonoses Report, 2022. EFSA J. 20 (12) https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2022.7666.

Uyttendaele, M., Busschaert, P., Valero, A., Geeraerd, A.H., Vermeulen, A., Jacxsens, L., Goh, K.K., De Loy, A., Van Impe, J.F., Devlieghere, F., 2009. Prevalence and challenge tests of Listeria monocytogenes in Belgian produced and retailed mayonnaise-based deli-salads, cooked meat products and smoked fish between 2005 and 2007. Int. J. Food Microbiol. 133 (1–2), 94–104. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.002.

Voidarou, C., Alexopoulos, A., Plessas, S., Noussias, H., Stavropoulou, E., Fotou, K., Tzora, A., Skoufos, I., Bezirtzoglou, E., Demertzi-Akrida, K., 2011. Microbiological quality of grey-mullet roe. Anaerobe 17 (6), 273–275. https://doi.org/10.1016/J.ANAEROBE.2011.03.008.

WHO, 2018. World Health Organization. Listeriosis. 2018. *https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/listeriosis*. (Accessed 12 April 2022).

Wieczorek, K., Osek, J., 2017. Prevalence, genetic diversity and antimicrobial resistance of Listeria monocytogenes isolated from fresh and smoked fish in Poland. Food Microbiol. 64, 164–171. https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.12.022.

Wilking, H., Lachmann, R., Holzer, A., Halbedel, S., Flieger, A., Stark, K., 2021. Ongoing high incidence and case-fatality rates for invasive Listeriosis, Germany, 2010–2019. Emerg. Infect. Dis. 27 (9), 2485. https://doi.org/10.3201/EID2709.210068.

Zakrzewski, A.J., Kurpas, M., Zadernowska, A., Chajęcka-Wierzchowska, W., Fraqueza, M.J., 2023. A comprehensive virulence and resistance characteristics of Listeria monocytogenes isolated from fish and the fish industry environment. Int. J. Mol. Sci. 24 (4), 3581. https://doi.org/10.3390/IJMS24043581/S1.

Zarei, M., Maktabi, S., Ghorbanpour, M., 2012. Prevalence of listeria monocytogenes, vibrio parahaemolyticus, staphylococcus aureus, and salmonella spp. in seafood products using multiplex polymerase chain reaction. Foodborne Pathog. Dis. 9 (2), 108–112. https://doi.org/10.1089/FPD.2011.0989.

Zhang, H., Luo, X., Aspridou, Z., Misiou, O., Dong, P., Zhang, Y., 2023. The prevalence and antibiotic-resistant of Listeria monocytogenes in livestock and poultry meat in China and the EU from 2001 to 2022: A systematic review and Meta-analysis. Foods 12 (4), 769. https://doi.org/10.3390/FOODS12040769.

Zwierzchowska, A., Gaweł, E., Maszczyk, A., Roczniok, R., 2022. The importance of extrinsic and intrinsic compensatory mechanisms to body posture of competitive athletes a systematic review and meta-analysis. Sci. Rep. 12 (1), 1–12. https://doi.org/10.1038/s41598-022-12979-8.

Olsztyn, 26.03.2024
(miejscowość, data)

mgr inż. Arkadiusz Zakrzewski
(imię i nazwisko kandydata)
Technologia żywności i żywienia
(dyscyplina naukowa)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
technologii żywności i żywienia
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak

OŚWIADCZENIE

autora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że w pracy pod tytułem: *Zakrzewski, A., Gajewska, J., Chajęcka-Wierzchowska, W., Załuski D. Zadernowska, A. (2023). Prevalence of Listeria monocytogenes and other Listeria species in fish, fish products and fish processing environment: A systematic review and meta-analysis. Science of The Total Environment, 907, 167912* mój wkład merytorycznyw jej przygotowanie polegał na: *na opracowaniu koncepcji manuskryptu, współudziale w opracowaniu metodyki, wykonaniu analiz, wizualizacji wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.*

Zakrzewski Arkadiusz

(podpis kandydata)

Olsztyn, 18.03.2024
(miejscowość, data)

mgr inż. Joanna Gajewska
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
technologia żywności i żywienia
Prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:

Zakrzewski, A., Gajewska, J., Chajęcka-Wierzchowska, W., Załuski D. Zadernowska, A. (2023). Prevalence of Listeria monocytogenes and other Listeria species in fish, fish products and fish processing environment: A systematic review and meta-analysis. Science of The Total Environment, 907, 167912. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167912

mój wkład merytorycznyw jej przygotowanie polegał na: *współudziale w procesie weryfikacji publikacji, pracy z danymi surowymi, pomocy w wizualizacji wyników oraz pisaniu i edytowaniu manuskryptu.*

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez *mgr inż. Arkadiusza Zakrzewskiego* jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata *mgr inż. Arkadiusza Zakrzewskiego* polegający na *opracowaniu koncepcji, weryfikacji publikacji, analizach statystycznych, wizualizacji wyników, pisaniu i edytowaniu manuskryptu.*

Gajewska Joanna
.....
podpis

Olsztyn, 19.03.2024
(miejscowość, data)

dr inż. Wioleta Chajęcka-Wierzchowska
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
technologia żywności i żywienia
Prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem
Zakrzewski, A., Gajewska, J., Chajęcka-Wierzchowska, W., Załuski D. Zadernowska, A. (2023). Prevalence of Listeria monocytogenes and other Listeria species in fish, fish products and fish processing environment: A systematic review and meta-analysis. Science of The Total Environment, 907, 167912. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167912,
mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: *walidacji wybranych artykułów do analiz statystycznych, korekcie pierwotnej wersji manuskryptu.*

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez *Arkadiusza Zakrzewskiego* jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata *Arkadiusza Zakrzewskiego* polegający na *opracowaniu koncepcji manuskryptu, zebraniu literatury, współudziale w opracowaniu metodyki, wykonaniu analiz, wizualizacji wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.*

.....
podpis

Olsztyn, 20.03.2024
(miejscowość, data)

dr hab. inż. Dariusz Załuski, prof. UWM
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
technologia żywności i żywienia
Prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:
Zakrzewski, A., Gajewska, J., Chajęcka-Wierzchowska, W., Załuski D. Zadernowska, A. (2023). Prevalence of Listeria monocytogenes and other Listeria species in fish, fish products and fish processing environment: A systematic review and meta-analysis. Science of The Total Environment, 907, 167912. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167912,
mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: *współudziale w opracowaniu metodyki oraz analizach statystycznych.*

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez *Arkadiusza Zakrzewskiego* jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata *Arkadiusza Zakrzewskiego* polegający na *opracowaniu koncepcji manuskryptu, zebraniu literatury, współudziale w opracowaniu metodyki, wykonaniu analiz, wizualizacji wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.*

.....
podpis

Olsztyn, 19.03.2024
(miejscowość, data)

dr hab. inż. Anna Zadernowska, prof. UWM
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
technologia żywności i żywienia
Prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem
Zakrzewski, A., Gajewska, J., Chajęcka-Wierzchowska, W., Załuski D. Zadernowska, A. (2023). Prevalence of Listeria monocytogenes and other Listeria species in fish, fish products and fish processing environment: A systematic review and meta-analysis. Science of The Total Environment, 907, 167912. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167912,
mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: *walidacji wybranych artykułów do analiz statystycznych, korekcie pierwotnej wersji manuskryptu.*

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez *Arkadiusza Zakrzewskiego* jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata *Arkadiusza Zakrzewskiego* polegający na *opracowaniu koncepcji manuskryptu, zebraniu literatury, współudziale w opracowaniu metodyki, wykonaniu analiz, wizualizacji wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.*

Anna Zadernowska
.....
podpis

Załącznik 2

Zakrzewski, A. J., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A., Podlasz, P. (2020). Virulence characterization of *Listeria* monocytogenes, *Listeria innocua*, and *Listeria welshimeri* isolated from fish and shrimp using in vivo early zebrafish larvae models and molecular study. *Pathogens*,, 9(12), 1028. https://doi.org/10.3390/PATHOGENS9121028
MEiN: 100, IF: 3.492

pathogens

MDPI

Article

Virulence Characterization of *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, and *Listeria welshimeri* Isolated from Fish and Shrimp Using In Vivo Early Zebrafish Larvae Models and Molecular Study

Arkadiusz Józef Zakrzewski [1,*], Wioleta Chajęcka-Wierzchowska [1], Anna Zadernowska [1] and Piotr Podlasz [2]

[1] Department of Industrial and Food Microbiology, University of Warmia and Mazury, Plac Cieszyński 1, 10-726 Olsztyn, Poland; wioleta.chajecka@uwm.edu.pl (W.C.-W.); anna.zadernowska@uwm.edu.pl (A.Z.)

[2] Department of Pathophysiology Forensic Veterinary Medicine and Administration, University of Warmia and Mazury, ul. Oczapowskiego 14, 10-719 Olsztyn, Poland; piotr.podlasz@uwm.edu.pl

* Correspondence: arkadiusz.zakrzewski@uwm.edu.pl

Received: 14 November 2020; Accepted: 6 December 2020; Published: 8 December 2020



Abstract: Listeriosis is one of the most notable foodborne diseases and is characterized by high rates of mortality. *L. monocytogenes* is the main cause of human listeriosis outbreaks, however, there are isolated cases of disease caused by other species of the genus *Listeria*. The aim of this study was to evaluate strains of *L. monocytogenes* ($n = 7$), *L. innocua* ($n = 6$), and *L. welshimeri* ($n = 2$) isolated from fish and shrimps for their virulence based on the presence of virulence genes and the in vivo *Danio rerio* (zebrafish) larvae models. A total of 15 strains were analyzed. The zebrafish larvae model showed that the larvae injected with *L. monocytogenes* strains were characterized by the lowest survival rate (46.5%), followed by *L. innocua* strains (64.2%) and *L. welshimeri* (83.0%) strains. Multiplex PCRs were used for detection of selected virulence genes (*lux*S, *act*A2, *prf*A, *inl*B, *rrn*, *iap*, *sig*B, *plc*B, *act*A, *hly*A), the majority of which were present in *L. monocytogenes*. Only a few virulence-related genes were found in *L. welshimeri*, however, no correlation between the occurrence of these genes and larval survival was confirmed. This research highlights the importance of the potential impact that *Listeria* spp. strains isolated from fish and shrimps may have on consumers.

Keywords: *Listeria* spp.; *Listeria monocytogenes*; *Listeria innocua*; *Listeria welshimeri*; *Danio rerio*; pathogenicity

1. Introduction

Species *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, and *L. seeligeri* are considered to be the main causes of listeriosis in animals and humans, however, due to the occurrence of single cases of infection caused by other species, including *L. innocua*, it seems necessary to study the virulent potential among others species of the genus *Listeria* [1].

The genus *Listeria* currently includes seventeen species [2]. For humans, *L. monocytogenes* is most often involved in foodborne outbreaks of listeriosis [3]. The other two species mentioned above are rarely reported as causes of human listeriosis [4–6], though there are reports of *L. welshimeri* being isolated from human fecal samples [7].

Listeriosis can develop as gastroenteritis with fever or present a more severe course with meningitis and sepsis. Parenteral symptoms are primarily found in people at risk, including pregnant women, newborns, the elderly, and people with reduced immunity (transplant recipients, patients

receiving anti-cancer drugs or undergoing immunosuppressive therapy, or Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) patients). In this group, listeriosis has a mortality rate of 20–30% [3].

L. monocytogenes has a sophisticated intracellular lifecycle and pathogenic strategy. Research shows that the pathogenicity island 1 is responsible for this strategy. Pathogenicity island 1 (LIPI-1) contains the *prf*A-cluster. The *prf*A gene is a transcription activator that regulates the expression of various *L. monocytogenes* virulence genes, and *plc*A is a phospholipase C with phosphatidylinositol activity. LIPI-1 also contains a lecithinase operon, which contains genes whose presence was investigated in the study, including *act*A and *plc*B. *act*A gene coding for actin polymerizing protein, which recruits and polymerizes actin filaments to *Listeria* when it is in the cell to promote its intracellular motility. *plc*B gene encodes phospholipase C with lecithinase activity and helps *Listeria* to escape from phagosomes, thus promoting the spread of *Listeria* to other cells. LIPI-1 also contains *hly*, which encodes listeriolysin O (LLO), which lyses erythrocytes and other cells, but also lyses vacuoles of eukaryotic cells, allowing *Listeria* to spread through the cytoplasm. Removal of the *hly* gene leads to loss of virulence, which proves the importance of LLO in the pathogenesis of *L. monocytogenes* [8].

The aim of the study was to evaluate strains of *L. monocytogenes*, *L. innocua*, and *L. welshimeri* isolated from fish and shrimp for their virulence based on the presence of virulence genes and the in vivo zebrafish larvae models.

2. Results

The virulence of *L. monocytogenes* has been well characterized, however, most previous research has focused on clinical strains, whereas there may be large variations among species and environmental strains [9]. We tested the outcome of experimental infection of early zebrafish larvae with *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, and *Listeria welshimeri*. The average survival curves are presented in Figure 1.

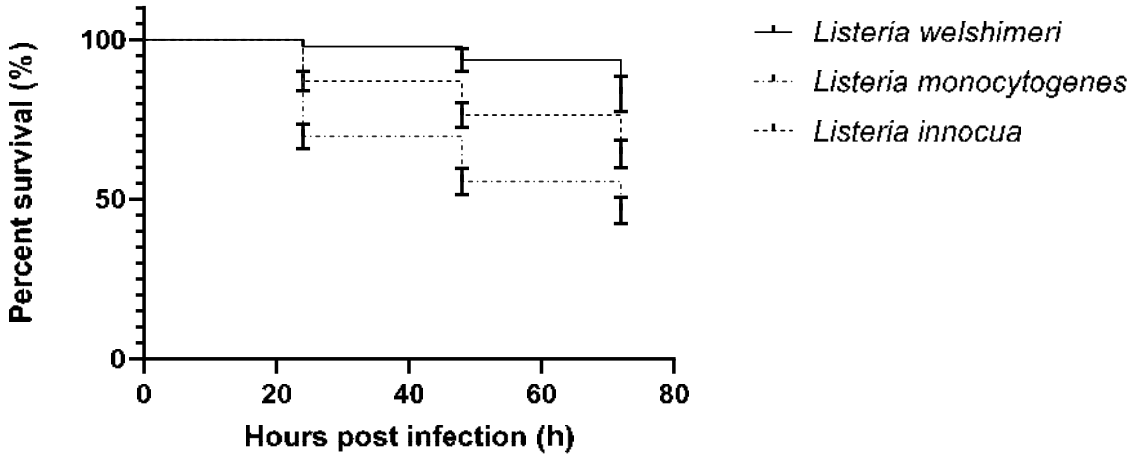


Figure 1. Survival curves of early zebrafish larvae injected with *L. monocytogenes*, *L. innocua*, and *L. welshimeri*.

The lowest survival, after 72 h, among zebrafish larvae can be observed when challenged with *L. monocytogenes* strains (46.5%). The average survival of *L. innocua*-infected larvae is higher and reached 64.2%; the highest survival rate was found in *L. welshimeri*-infected larvae, which was 83.0%. The differences between the species differ significantly (p value < 0.0001) (Figure 1).

The survival rate of larvae infected with *L. monocytogenes* differed statistically significantly (p value < 0.0001) between the strains. After 72 h of the experiment, it was observed that the survival rate varied from 0.0% to 95.5%. In the case of one strain (LM107), none of the infected larvae survived after two days of the experiment (Figure 2).

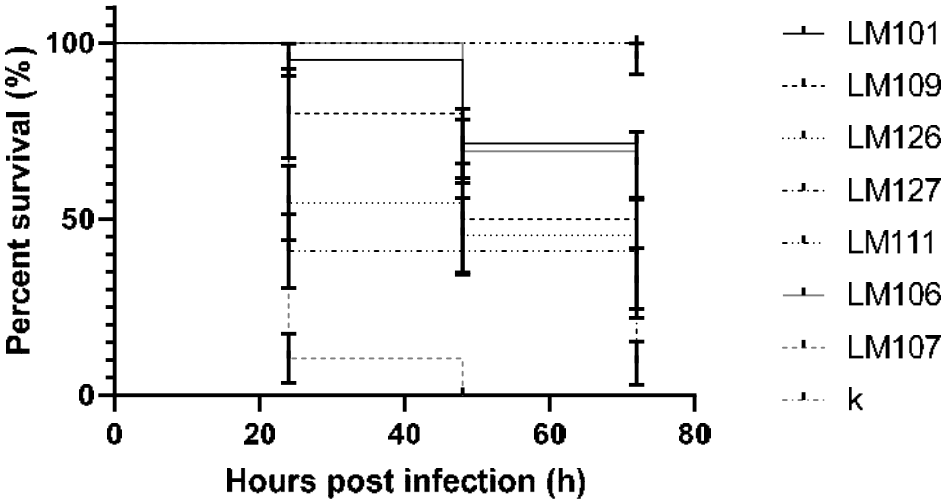


Figure 2. Survival curves of early zebrafish larvae injected with *L. monocytogenes*; k: control; 101, 106, 107, 109, 111 126, 127: strains.

As with *L. monocytogenes*, survival among larvae infected by *L. innocua* also varied widely between strains. For the least virulent strain, the survival rate was 95.4%, while for the most virulent strain, it was 19.0%. The differences between the strains were statistically significant (p value < 0.0001). Survival results for individual strains are presented in Figure 3.

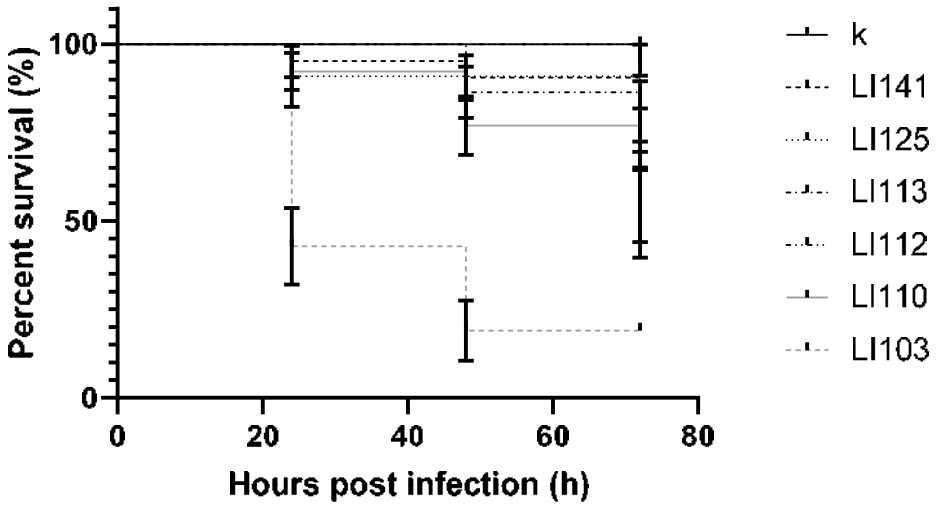


Figure 3. Survival curves of early zebrafish larvae injected with *L. innocua;* k: control; 103, 110, 112, 113, 125, 141: strains.

Of the two *L. welshimeri* strains, LW104 showed no virulence, and all infected larvae survived the 72-h experiment. For the second strain (LW105), larvae survival was 72.0%. These differences are statistically significant (p value = 0.0107). Survival results for individual strains are presented in Figure 4.

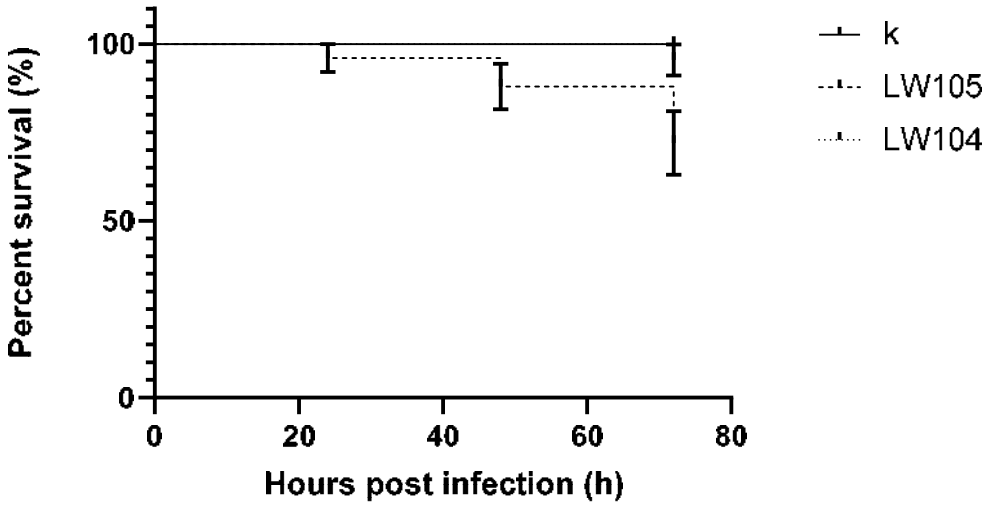


Figure 4. Survival curves of early zebrafish larvae injected with *L. welshimeri;* k: control; 105, 104: strains.

Among the tested strains of *L. monocytogenes* there were two serotypes: 1/2a and 1/2c. The results of average survival for each stereotype are presented in Figure 5. These differences are not large: for serotype 1/2a the average survival was 46.9%, while for serotype 1/2c the average survival was 58.2%; these differences are not statistically significant (p value = 0.1205).

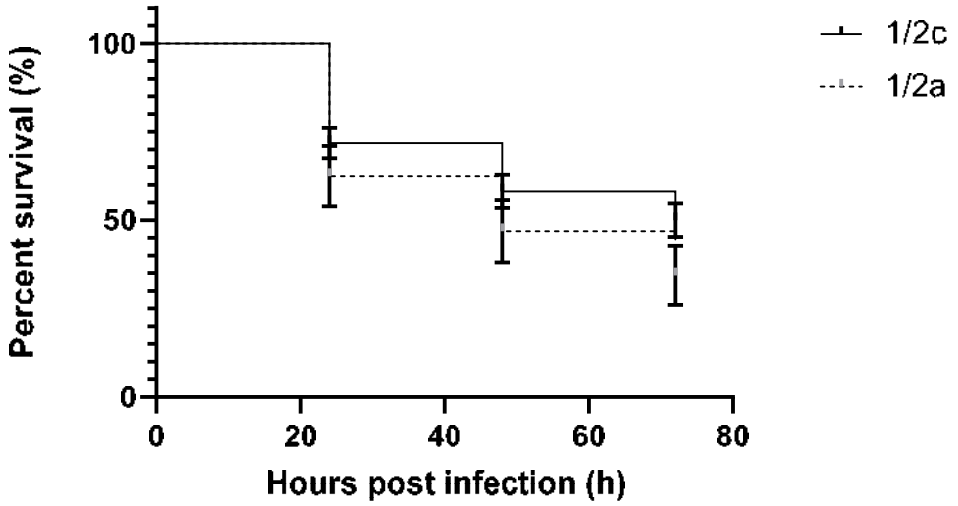


Figure 5. Survival curves of early zebrafish larvae injected with *L. monocytogenes;* serotype 1/2a (filled, black line), serotype 1/2c (dotted, black line).

The frequencies of the virulence genes identified in *Listeria* spp. strains are listed in Table 1.

Nine virulence profiles were characterized in the study. The most common profile was *plc*B-*act*A2-*hly*A-*sig*B-*act*A-*prf* A-*inl*B-*rrn-iap-lux*S (26.7%), the next most common profiles were *sig*B-*rrn* (20.0%) and *plc*B-*hly*A-*sig*B-*act*A-*prf* A-inlB-rrn-iap (13.3%).

Table 1. The frequency of virulence-associated genes among *Listeria* spp. strains.

Prevalence of Virulence-Associated Genes (%)					
Genes	***L. monocytogenes***		***L. innocua***	***L. welshimeri***	**Total**
	1/2a (*n* = 2)	**1/2c (*n* = 5)**	**(*n* = 6)**	**(*n* = 2)**	
*plc*B	100.0	100.0	33.3	0.0	60.0
*act*A2	50.0	100.0	0.0	0.0	40.0
*hly*A	100.0	100.0	16.7	0.0	53.3
*sig*B	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
*act*A	100.0	100.0	33.3	0.0	60.0
*prf*A	100.0	100.0	0.0	0.0	46.7
*inl*B	100.0	80.0	0.0	0.0	40.0
rrn	100.0	80.0	66.7	100.0	80.0
iap	100.0	100.0	0.0	0.0	40.0
*lux*S	0.0	80.0	50.0	0.0	46.7

The study examined the correlation between the occurrence of genes associated with virulence and the survival of zebrafish larvae. The strongest negative correlation was observed for the *actA* (−0.3191) and *hly* (−0.2876) genes. The next genes with negative correlation were the *prf*A and *iap* genes, whose values were both −0.1817. A positive correlation was observed for two genes, 0.2648 for the *lux*S gene and 0.1953 for the *rrn* gene. These results are not statistically significant ($p > 0.005$ for each gene).

3. Discussion

The latest European Food Safety Authority (EFSA) data shows that almost half (41.7%) of the Rapid Alert System for Food and Feed notifications for *L. monocytogenes* in 2008–2016 concerned fish and their products [10]. It is *L. monocytogenes* that is considered the main threat to humans among species of the genus *Listeria*, while there have been rare cases of infection with other species of this genus [11]. Pathogenicity is closely related to the *prf*A-virulence gene cluster (*p*VGC), containing the *prf*A, *plc*A, *hly*, *mpl*, *act*A, and *plc*B genes, although there are other genes that are indirectly treated as virulence factors [12].

In the present study, the intraspecies variations in the virulence profiles were investigated. Research suggests that the *hly* gene is crucial for the virulence of *L. monocytogenes* strains [12,13]. In the present study, the *hly* gene was present in each *L. monocytogenes* strain for both serotype 1/2a and 1/2c. Additionally, it was found in one atypical strain of *L. innocua*. The atypical *L. innocua* strain was characterized by very high survival among larvae (80.9%), while the most virulent strain 103 had only the *sig*B and *rrn* genes. The most likely explanation seems to be the inactive form of the genes from prfA-cluster, while the high mortality rate of larvae infected with strain 103 may be due to genes other than those tested in this experiment. Cases of such strains have already been reported [14,15]. There is also a study indicating other species of the genus *Listeria* possessing the *hly* gene, including *L. seeligeri* [16]. In the study of the frequency of genes from *p*VGC cluster, they were found in each of the *L. monocytogenes* strains. Similar results were obtained by other researchers in the study of food products [17–19]. According to Orsi et al. (2016), *L. welshimeri* possessing a *p*VGC cluster have not been confirmed [2]. Due to possible polymorphism in the *act*A gene, two sets of primers, *actA*1 and *actA*2, were used [20]. For one strain, the *act*A gene was detected by the sequence for *actA*2 primer and was not detected for the second set of primers. In the case of genes unrelated to the *p*VGC cluster, they most often occurred in *L. monocytogenes* and *L. innocua*. Only two of ten genes (*sig*B and *rrn*) occurred in *L. welshimeri*.

In this work, a model for infection was established in zebrafish larvae in order to study the pathogenesis of *Listeria* sp. In vivo research on zebrafish larvae has also been used to study the virulence of various pathogens including *Escherichia coli* [21], *Staphylococcus aureus* [22], and *Aeromonas hydrophila* [23] but also fungal or viral agents. As for the use of zebrafish larvae to study the pathogenicity of *Listeria*, only *L. monocytogenes* has been used in previous research [24]. Until now, in vivo models using *Danio rerio* to study the virulence of *L. monocytogenes* focused on the model itself and not on testing strains from environmental samples. One study from 1996 investigated *Listeria* spp. strains from food samples, however, experiments were carried out at 22 °C, a temperature that differs from the optimal temperature for the expression of *Listeria* virulence genes, therefore this study will not be considered in the discussion [25].

In this study, the pathogenicity of *L. welshimeri* and *L. innocua* strains isolated from raw fish and shrimp was investigated. *L. monocytogenes* strains were characterized by their significant virulence potential. Mortality among zebrafish larvae was 65.6%. The study did not prove statistically significant correlation between the occurrence of known virulence genes and virulence in an in vivo model.

Comparing the virulence of *L. innocua* and *L. monocytogenes*, it can be concluded that *L. innocua* has been observed to be less virulent, however, mortality among larvae varied between 4.6% and 80.9%. Although this species is considered to be avirulent, there are individual data reporting patients with diseases caused by *L. innocua*. In 2014, *L. innocua* was the cause of meningitis. Researchers showed the presence of the *prf*A, *inl*A, *inl*B, *inl*C, *hly*, *plc*A, *plc*B, *mpl*, *iap*, *clp*E, *daa*A, and *act*A genes in the investigated strain [26]. The first fatal case caused by *L. innocua* occurred in 2003. The cause of death was bacteremia. In the cited study, the authors did not specify a virulence profile [27].

There is little data on *L. welshimeri* virulence. In our study, only two *L. welshimeri* strains were tested, none of which showed high mortality among *Danio rerio* larvae. A similar study on a live model, in this case mice, was carried out in 1986. The virulence of 16 *L. welshimeri* strains were investigated, each of which proved to be avirulent [28].

4. Materials and Methods

4.1. Ethics Statement

All fish were housed in the fish facility of Laboratory of Genomics and Transcriptomics in the University of Warmia and Mazury, Olsztyn, Poland, which was built according to local animal welfare standards. All animal procedures were performed in accordance with Polish and European Union animal welfare guidelines. According to the European Directive 2010/63/EU and Polish law regulations Dz.U. z 2015 r. poz. 266, all procedures performed in the present study including the use of early life-stages zebrafish and the euthanasia for the purpose of organ dissection did not require ethics committee permission.

4.2. Bacteria

The different *Listeria* species and serotypes isolated from fish (*Salmo salar* and *Oncorhynchus mykiss*) and shrimp (*Penaeus monodon*) sources used in this study were obtained from the microbiological collection of the Department of Industrial and Food Microbiology University of Warmia and Mazury in Olsztyn and are listed in Table 2. Strains were grown from frozen stocks in 5 mL of Brain Heart Infusionbroth (Merck, Darmstadt, Germany) overnight at 37 °C. Subsequently, the strains were transferred to 5 mL of BHI broth and incubated for 24 h at 37 °C. After incubation, the strains were centrifuged and washed three times with sterile saline. Eventually, phenol red (Merck, Darmstadt, Germany) was added to obtain a 0.05% solution in order to be able to observe the inoculation process.

Table 2. Characteristics of the strains used in the research.

No.	Strain	Species	Serotype	Source
1	LW104	*L welshimeri*	nd.	*Salmo salar*
2	LW105	*L welshimeri*	nd.	*Salmo salar*
3	LI141	*L. innocua*	nd.	*Oncorhynchus mykiss*
4	LI125	*L. innocua*	nd.	*Oncorhynchus mykiss*
5	LI113	*L. innocua*	nd.	*Salmo salar*
6	LI112	*L. innocua*	nd.	*Salmo salar*
7	LI110	*L. innocua*	nd.	*Salmo salar*
8	LI103	*L. innocua*	nd.	*Salmo salar*
9	LM101	*L. monocytogenes*	1/2c	*Salmo salar*
10	LM109	*L. monocytogenes*	1/2a	*Salmo salar*
11	LM126	*L. monocytogenes*	1/2a	*Oncorhynchus mykiss*
12	LM127	*L. monocytogenes*	1/2c	*Salmo salar*
13	LM111	*L. monocytogenes*	1/2c	*Salmo salar*
14	LM106	*L. monocytogenes*	1/2c	*Penaeus monodon*
15	LM107	*L. monocytogenes*	1/2c	*Salmo salar*

nd.: not detected.

4.3. Pathogenicity Assay Using Zebrafish Larvae

All fifteen *Listeria* species strains were analyzed for virulence potential in the zebrafish (*Danio rerio*) larvae model, as described previously [29]. Zebrafish were kept and handled in compliance with the guidelines of the European Union for handling laboratory animals (http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/home_en.htm). Zebrafish studies were performed on wild type and on Tg(mCherry) 72 h post-fertilization.

Larvae were microinjected in yolk with the different strains (ca. 50 bacteria per nL). For survival assays, embryos ($n \geq 15$ per strain per experiment) were kept in 48-well plates and analyzed at regular time intervals for mortality (scored by the absence of heartbeat). Controls for the experiment were larvae inoculated with a 0.05% solution of phenol red (Merck, Darmstadt, Germany). Survival data are presented in Kaplan–Meier plots, and the significance of the data was analyzed with a log rank (Mantel–Cox) test using GraphPad Prism software version 8.0 (GRAPH PAD software Inc, San Diego, CA, USA).

4.4. PCR Assay

Total DNA was extracted from isolated strains according to the instruction manuals of commercial DNA extraction kits (A&A Biotechnology, Gdynia Poland). The presence of the virulence-associated genes were detected by PCR in three reactions (Table 3). PCR amplification was performed using 2 µL of template DNA, 2 µL of each primer (100 pmol), and 12.5 µL of 2 × DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in a total reaction volume of 25 µL. The PCR conditions consisted of an initial denaturation step at 94 °C for 3 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing for 30 s, and elongation at 72 °C for 1 min. A final extension step was carried out at 72 °C for 5 min. Correlations between gene occurrence and *Danio rerio* larval survival were calculated using Pearson correlation because the occurrence of genes was marked as 1 when the gene was present and 0 when it was absent, in which case the results of the Pearson correlation are identical to point-biserial correlation.

Table 3. List of primers used in research [30].

No.	Primers	Sequence (5′–3′)	Size (bp)	Target
1	luxS	F: ATGGCAGAAAAAATGAATGTAGAAA R: TTATTCACCAAACACATTTTTCCA	500	*lux*S
	actA2	F: GACGAAAATCCCGAAGTGAA R: CTAGCGAAGGTGCTGTTTCC	385	*act*A2
	prfA	F: GATACAGAAACATCGGTTGGC R: GTGTAATCTTGATGCCATCAGG	280	*prf*A
	inlB	F: AAAGCACGATTTCATGGGAG R: ACATAGCCTTGTTTGGTCGG	148	*inl*B
	rrn	F: CAG CAG CCG CGG TAA TAC R: CTC CAT AAA GGT GAC CCT	938	*rrn*
	iap	F: CAAACTGCTAACACAGCTACT R: TTATACGCGACCGAAGCCAAC	660	*iap*
2	sigB	F: TCATCGGTGTCACGGAAGAA R: TGACGTTGGATTCTAGACAC	310	*sig*B
3	plcB	F: CTGCTTGAGCGTTCATGTCTCATCCCCC R: ATGGGTTTCACTCTCCTTCTAC	1150	*plc*B
	actA	F: CGCCGCGGAAATTAAAAAAAGA R: ACGAAGGAACCGGGCTGCTAG	839	*act*A
	hlyA	F: GCAGTTGCAAGCGCTTGGAGTGAA R: GCAACGTATCCTCCAGAGTGATCG	456	*hly*A

5. Conclusions

The data presented in this study show that the diversity according to the virulence level of *Listeria* sp. strains isolated from fish and shrimp is complex and based on different mechanisms that seem to differ according to the species of the strains. In addition, as demonstrated by the experiment carried out in vivo, although *L. innocua* is not considered dangerous to human life, it may pose a potential threat.

Author Contributions: Conceptualization: A.J.Z.; methodology: P.P. and A.J.Z.; validation: W.C.-W. and A.Z.; investigation: A.J.Z.; writing—original draft preparation: A.J.Z.; writing—review and editing: A.J.Z.; supervision: W.C.-W. and A.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by The Ministry of Science and Higher Education of Poland (agreement number: 0130/DIA/2018/47) under the project 'Diamentowy Grant' (project number DI 2017013047).

Conflicts of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

1. Cocolin, L.; Rantsiou, K.; Iacumin, L.; Cantoni, C.; Comi, G. Direct identification in food samples of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* by molecular methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 6273–6282. [CrossRef]
2. Orsi, R.H.; Wiedmann, M. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*, 5273–5287. [CrossRef]
3. Buchanan, R.L.; Gorris, L.G.M.; Hayman, M.M.; Jackson, T.C.; Whiting, R.C. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control* **2017**, *75*, 1–13. [CrossRef]
4. Guillet, C.; Join-Lambert, O.; Le Monnier, A.; Leclercq, A.; Mechaï, F.; Mamzer-Bruneel, M.F.; Bielecka, M.K.; Scortti, M.; Disson, O.; Berche, P.; et al. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerg. Infect. Dis.* **2010**, *16*, 136–138. [CrossRef] [PubMed]
5. Sauders, B.D.; Overdevest, J.; Fortes, E.; Windham, K.; Schukken, Y.; Lembo, A.; Wiedmann, M. Diversity of *Listeria* species in urban and natural environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 4420–4433. [CrossRef] [PubMed]

6. Snapir, Y.M.; Vaisbein, E.; Nassar, F. Low virulence but potentially fatal outcome-*Listeria ivanovii*. *Eur. J. Intern. Med.* **2006**, *17*, 286–287. [CrossRef] [PubMed]
7. Liu, D. Molecular Approaches to the Identification of Pathogenic and Nonpathogenic Listeriae. *Microbiol. Insights* **2013**, *6*, MBI.S10880. [CrossRef]
8. Hallstrom, K.N.; McCormick, B.A. Pathogenicity Islands: Origins, Structure, and Roles in Bacterial Pathogenesis. In *Molecular Medical Microbiology*, 2nd ed.; Elsevier Ltd.: Amsterdam, The Netherlands, 2014; Volume 1–3, pp. 303–314, ISBN 9780123971692.
9. Papić, B.; Pate, M.; Félix, B.; Kušar, D. Genetic diversity of *Listeria monocytogenes* strains in ruminant abortion and rhombencephalitis cases in comparison with the natural environment. *BMC Microbiol.* **2019**, *19*, 299. [CrossRef]
10. Ricci, A.; Allende, A.; Bolton, D.; Chemaly, M.; Davies, R.; Fernández Escámez, P.S.; Girones, R.; Herman, L.; Koutsoumanis, K.; Nørrung, B.; et al. *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. *EFSA J.* **2018**, *16*. [CrossRef]
11. Rocourt, J.; Hof, H.; Schrettenbrunner, A.; Malinverni, R.; Bille, J. Acute purulent *Listeria seelingeri* meningitis in an immunocompetent adult. *Schweiz. Med. Wochenschr.* **1986**, *116*, 248–251.
12. Poimenidou, S.V.; Dalmasso, M.; Papadimitriou, K.; Fox, E.M.; Skandamis, P.N.; Jordan, K. Virulence gene sequencing highlights similarities and differences in sequences in *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a and 4b strains of clinical and food origin from 3 different geographic locations. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*. [CrossRef] [PubMed]
13. Roberts, A.; Chan, Y.; Wiedmann, M. Definition of genetically distinct attenuation mechanisms in naturally virulence-attenuated *Listeria monocytogenes* by comparative cell culture and molecular characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 3900–3910. [CrossRef] [PubMed]
14. Johnson, J.; Jinneman, K.; Stelma, G.; Smith, B.G.; Lye, D.; Messer, J.; Ulaszek, J.; Evsen, L.; Gendel, S.; Bennett, R.W.; et al. Natural atypical *Listeria innocua* strains with *Listeria monocytogenes* pathogenicity island 1 genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 4256–4266. [CrossRef] [PubMed]
15. Moreno, L.Z.; Paixão, R.; de Gobbi, D.D.S.; Raimundo, D.C.; Porfida Ferreira, T.S.; Micke Moreno, A.; Hofer, E.; dos Reis, C.M.F.; Matté, G.R.; Matté, M.H. Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* isolated from swine slaughterhouses and meat markets. *Biomed. Res. Int.* **2014**, *2014*, 742032. [CrossRef] [PubMed]
16. Osman, K.M.; Samir, A.; Abo-Shama, U.H.; Mohamed, E.H.; Orabi, A.; Zolnikov, T. Determination of virulence and antibiotic resistance pattern of biofilm producing *Listeria* species isolated from retail raw milk. *BMC Microbiol.* **2016**, *16*, 263. [CrossRef]
17. Wieczorek, K.; Osek, J. Prevalence, genetic diversity and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh and smoked fish in Poland. *Food Microbiol.* **2017**, *64*, 164–171. [CrossRef]
18. Su, X.; Zhang, J.; Shi, W.; Yang, X.; Li, Y.; Pan, H.; Kuang, D.; Xu, X.; Shi, X.; Meng, J. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from foods and humans. *Food Control* **2016**, *70*, 96–102. [CrossRef]
19. Skowron, K.; Kwiecińska-Piróg, J.; Grudlewska, K.; Świeca, A.; Paluszak, Z.; Bauza-Kaszewska, J.; Wałecka-Zacharska, E.; Gospodarek-Komkowska, E. The occurrence, transmission, virulence and antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* in fish processing plant. *Int. J. Food Microbiol.* **2018**, *282*, 71–83. [CrossRef]
20. Conter, M.; Vergara, A.; Di Ciccio, P.; Zanardi, E.; Ghidini, S.; Ianieri, A. Polymorphism of actA gene is not related to in vitro virulence of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, *137*, 100–105. [CrossRef]
21. Stones, D.H.; Fehr, A.G.J.; Thompson, L.; Rocha, J.; Perez-Soto, N.; Madhavan, V.T.P.; Voelz, K.; Krachler, A.M. Zebrafish (*Danio rerio*) as a Vertebrate Model Host to Study Colonization, Pathogenesis, and Transmission of Foodborne *Escherichia coli* O157. *mSphere* **2017**, *2*. [CrossRef]
22. Li, Y.J.; Hu, B. Establishment of Multi-Site Infection Model in Zebrafish Larvae for Studying *Staphylococcus aureus* Infectious Disease. *J. Genet. Genom.* **2012**, *39*, 521–534. [CrossRef] [PubMed]
23. Lamy, B.; Withey, J.H.; Renshaw, S.; Saraceni, P.R.; Romero, A.; Figueras, A.; Novoa, B. Establishment of Infection Models in Zebrafish Larvae (*Danio rerio*) to Study the Pathogenesis of Aeromonas hydrophila. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1219. [CrossRef]
24. Levraud, J.P.; Disson, O.; Kissa, K.; Bonne, I.; Cossart, P.; Herbomel, P.; Lecuit, M. Real-time observation of *Listeria monocytogenes*-phagocyte interactions in living zebrafish larvae. *Infect. Immun.* **2009**, *77*, 3651–3660. [CrossRef] [PubMed]

25. Menudier, A.; Rougier, F.P.; Bosgiraud, C. Comparative virulence between different strains of *Listeria* in zebrafish (*Brachydanio rerio*) and mice. *Pathol. Biol.* **1996**, *44*, 783–789. [PubMed]
26. Favaro, M.; Sarmati, L.; Sancesario, G.; Fontana, C. First case of *Listeria innocua* meningitis in a patient on steroids and eternecept. *JMM Case Rep.* **2014**, *1*, e003103. [CrossRef]
27. Perrin, M.; Bemer, M.; Delamare, C. Fatal Case of *Listeria innocua* Bacteremia. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 5308–5309. [CrossRef]
28. Kluge, R.; Hof, H. Zur Virulenz von *Listeria welshimeri*. *Zent. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. Ser. A Med. Microbiol. Infect. Dis. Virol. Parasitol.* **1986**, *262*, 403–411. [CrossRef]
29. Mesureur, J.; Vergunst, A.C. Zebrafish embryos as a model to study bacterial virulence. *Methods Mol. Biol.* **2014**, *1197*, 41–66. [CrossRef]
30. Soosai, D.M. Identification of Genetic Determinants Associated with Biofilm Formation Capacity of *Listeria monocytogenes*. Master's Thesis, Univeristy of Ottawa, Ottawa, ON, USA, 2017.

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Olsztyn, 26.03.2024
(miejscowość, data)

mgr inż. Arkadiusz Zakrzewski
(imię i nazwisko kandydata)
Technologia żywności i żywienia
(dyscyplina naukowa)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
technologii żywności i żywienia
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak

OŚWIADCZENIE

autora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że w pracy pod tytułem: *Zakrzewski, A. J., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A., Podlasz, P. (2020). Virulence characterization of Listeria monocytogenes, Listeria innocua, and Listeria welshimeri isolated from fish and shrimp using in vivo early zebrafish larvae models and molecular study. Pathogens,, 9(12), 1028* mój wkład merytorycznyw jej przygotowanie polegał na: *opracowaniu koncepcji manuskryptu, zebraniu literatury, współudziale w opracowaniu metodyki, wykonaniu analiz, wizualizacji wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.*

Zakrzewski Arkadiusz

(podpis kandydata)

Olsztyn, 11.03.2024
(miejscowość, data)

dr inż. Wioleta Chajęcka-Wierzchowska
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
technologia żywności i żywienia
Prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem
Zakrzewski, A. J., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A., Podlasz, P. (2020). Virulence characterization of Listeria monocytogenes, Listeria innocua, and Listeria welshimeri isolated from fish and shrimp using in vivo early zebrafish larvae models and molecular study. Pathogens,, 9(12), 1028. https://doi.org/10.3390/PATHOGENS9121028,
mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: *koordynacji prac laboratoryjnych, walidacji wyników oraz udziale w redakcji manuskryptu po recenzji.*

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez *Arkadiusza Zakrzewskiego* jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata *Arkadiusza Zakrzewskiego* polegający na *opracowaniu koncepcji manuskryptu, zebraniu literatury, współudziale w opracowaniu metodyki, wykonaniu analiz, wizualizacji wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.*

.....
podpis

Olsztyn, 11.03.2024
(miejscowość, data)

dr hab. inż. Anna Zadernowska, prof. UWM
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
technologia żywności i żywienia
Prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem
Zakrzewski, A. J., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A., Podlasz, P. (2020). Virulence characterization of Listeria monocytogenes, Listeria innocua, and Listeria welshimeri isolated from fish and shrimp using in vivo early zebrafish larvae models and molecular study. Pathogens,, 9(12), 1028. https://doi.org/10.3390/PATHOGENS9121028,
mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: *koordynacji prac laboratoryjnych, walidacji wyników oraz udziale w redakcji manuskryptu po recenzji.*
Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez *Arkadiusza Zakrzewskiego* jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata *Arkadiusza Zakrzewskiego* polegający na *opracowaniu koncepcji manuskryptu, zebraniu literatury, współudziale w opracowaniu metodyki, wykonaniu analiz, wizualizacji wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.*

Anna Zadernowska
.....
podpis

Olsztyn, 20.03.2024
(miejscowość, data)

dr hab. Piotr Podlasz, prof. UWM
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
technologia żywności i żywienia
Prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem
Zakrzewski, A. J., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A., Podlasz, P. (2020). Virulence characterization of Listeria monocytogenes, Listeria innocua, and Listeria welshimeri isolated from fish and shrimp using in vivo early zebrafish larvae models and molecular study. Pathogens,, 9(12), 1028. https://doi.org/10.3390/PATHOGENS9121028,
mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: *współudziale w opracowaniu metodyki dotyczącej przeżywalności oraz szkoleniu w przeprowadzeniu analiz.*

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez *Arkadiusza Zakrzewskiego* jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata *Arkadiusza Zakrzewskiego* polegający na *opracowaniu koncepcji manuskryptu, zebraniu literatury, współudziale w opracowaniu metodyki, wykonaniu analiz, wizualizacji wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.*

Piotr Podlasz
.....
podpis

Załącznik 3

Zakrzewski, A. J., Kurpas, M., Zadernowska, A., Chajęcka-Wierzchowska, W., Fraqueza, M. J. (2023). A comprehensive virulence and resistance characteristics of *Listeria monocytogenes* isolated from fish and the fish industry environment. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 3581. https://doi.org/10.3390/ijms24043581
MEiN: 140, IF: 5.6

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Article

A Comprehensive Virulence and Resistance Characteristics of *Listeria monocytogenes* Isolated from Fish and the Fish Industry Environment

Arkadiusz Józef Zakrzewski [1], Monika Kurpas [2], Anna Zadernowska [1,*], Wioleta Chajęcka-Wierzchowska [1] and Maria João Fraqueza [3]

[1] Department of Industrial and Food Microbiology, University of Warmia and Mazrui, 10-726 Olsztyn, Poland
[2] Department of Immunobiology and Environmental Microbiology, Medical University of Gdansk, 80-210 Gdansk, Poland
[3] CIISA—Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, 1749-016 Lisboa, Portugal
* Correspondence: anna.zadernowska@uwm.edu.pl

Abstract: *Listeria monocytogenes* is an important pathogen, often associated with fish, that can adapt and survive in products and food processing plants, where it can persist for many years. It is a species characterized by diverse genotypic and phenotypic characteristics. Therefore, in this study, a total of 17 *L. monocytogenes* strains from fish and fish-processing environments in Poland were characterized for their relatedness, virulence profiles, and resistance genes. The Core Genome Multilocus Sequence Typing (cgMLST) analysis revealed that the most frequent serogroups were IIa and IIb; sequence types (ST) were ST6 and ST121; and clonal complexes (CC) were CC6 and CC121. Core genome multilocus sequence typing (cgMLST) analysis was applied to compare the present isolates with the publicly available genomes of *L. monocytogenes* strains recovered in Europe from humans with listeriosis. Despite differential genotypic subtypes, most strains had similar antimicrobial resistance profiles; however, some of genes were located on mobile genetic elements that could be transferred to commensal or pathogenic bacteria. The results of this study showed that molecular clones of tested strains were characteristic for *L. monocytogenes* isolated from similar sources. Nevertheless, it is worth emphasizing that they could present a major public health risk due to their close relation with strains isolated from human listeriosis.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; virulence; WGS; fish

check for updates

Citation: Zakrzewski, A.J.; Kurpas, M.; Zadernowska, A.; Chajęcka-Wierzchowska, W.; Fraqueza, M.J. A Comprehensive Virulence and Resistance Characteristics of *Listeria monocytogenes* Isolated from Fish and the Fish Industry Environment. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 3581. https://doi.org/10.3390/ijms24043581

Academic Editor: Alberto Cuesta

Received: 29 December 2022
Revised: 24 January 2023
Accepted: 31 January 2023
Published: 10 February 2023

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Listeria monocytogenes, as an environmental foodborne pathogen, is considered one of the most significant contaminants in food processing and raw agricultural supplies. *L. monocytogenes* contamination leads to a significant threat for risk groups, including the elderly, pregnant women, neonates, and the immunocompromised [1], for whom fatality rate can reach 20–30% [2]. In recent years, it has been responsible for large-scale outbreaks related to fresh produce, deli meats, and other RTE products worldwide [3]. While listeriosis is often associated with the consumption of contaminated RTE food products, such as cheese, meat and fish products, graved and smoked fish are the most frequently contaminated with *L. monocytogenes* around the world [4–8]. Salmon and salmon products in particular are regarded as important sources of human exposure to *L. monocytogenes* in other countries [9,10].

L. monocytogenes cause flu-like symptoms in most patients. However, in the group with risk (elderly, immunocompromised, and pregnant patients), the pathogen is responsible for central nervous system and fetal–placental infection [11]. *L. monocytogenes* can pass

important barriers in a host, namely the intestinal epithelium, the blood–brain barrier, and the placenta, and subsequently spread to other organs [12]. The process of Listeria's infection involves several different stages: adhesion and invasion of host cells, mentioned above, internalization by host cells, lysis of the vacuole with a high division rate comparable to that in rich broth medium, recruitment and polymerization that generate a network of branched filaments, intracellular multiplication, and intercellular spread to the adjacent cell [13]. *L. monocytogenes* is an extremely dangerous and deadly pathogen, due to the numerous mechanisms that allow it to penetrate host cells and survive in them [14].

The main genetic factors determining the ability to induce listeriosis infection include internalin encoded by the inlAB operon and pathogenic islands (LIPI-1, LIPI-3, and LIPI-4). Both LIPI-1 and the inlAB operon are crucial, and genes clustered there encode adhesion, internalization, intracellular survival, and dissemination [15]. Moreover, internalin A is a major factor inducing the internalization of L. monocytogenes to epithelial cells. Internalin B is important for the placental invasion [11]. LIPI-3 is composed of eight genes that encode listeriolysin S (LLS), a hemolytic and cytotoxic factor important in murine infection, and it participates in polymorphonuclear-cell survival [16,17]. LIPI-4 is a cluster containing six genes encoding a sugar transport system involved in neural and placental infection [18]. A schematic infection model is shown in Figure 1.

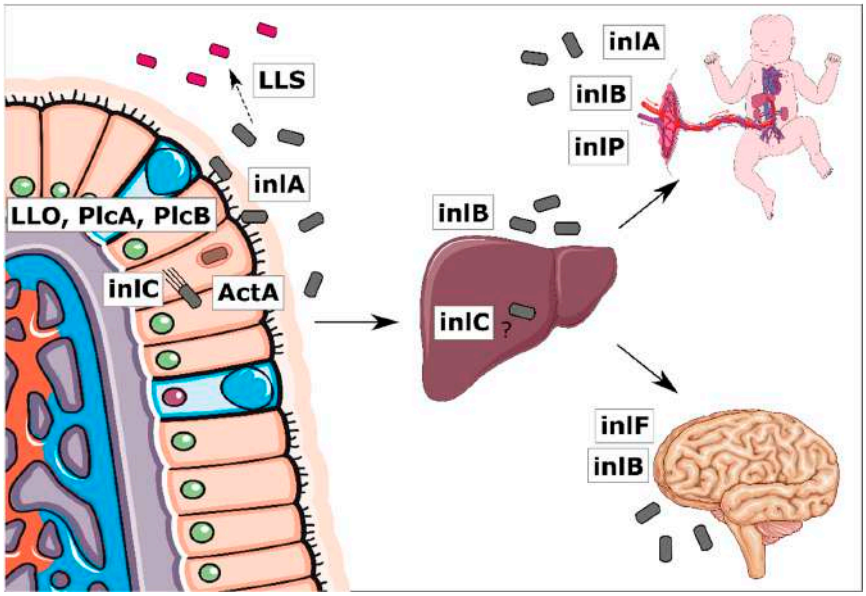


Figure 1. Scheme of *L. monocytogenes* infection including the studied virulence factors [11,14].

L. monocytogenes is a heterogenous group of bacteria. This pathogen can be differentiated into 14 different serogroups, which are prevalent and characterized by PCR or MLST (multilocus sequence type). However, since those methods are based on just several genes, they have low discriminatory power. The PFGE method, a gold standard, is able to discriminate different strains but is laborious and requires close and continuous work to avoid errors. At present, due to whole genome sequencing (WGS), the characterization of core genome MLST (cgMLST) is the most suitable method [19]. Since WGS provides the highest discriminatory power, it provides the possibility of identifying the presence of virulence genes, characterizing them, and correlating them with a reported disease severity.

Therefore, the aim of this study was to perform a WGS-based characterization of the genetic difference in *L. monocytogenes* strains isolated from fish and fish-processing environments.

2. Results

2.1. MLST Analysis

Eleven different MLST sequence types (ST) were identified: ST6 (11.76%, *n* = 2 isolates), ST8 (23.53%, *n* = 4), ST9 (5.88%, *n* = 1), ST31 (5.88%, *n* = 1), ST37 (5.88%, *n* = 1), ST59 (5.88%, *n* = 1), ST77 (5.88%, *n* = 1), ST87 (5.88%, *n* = 1), ST101 (5.88%, n = 1), ST121 (17.65%, *n* = 3), and ST193 (5.88%, *n* = 1). *L. monocytogenes* collection from food-premise environments contained isolates classified into six sequence types (ST101, ST69, ST77, ST 37, ST121, and ST87) whereas those from food samples were classified into seven other STs (ST6, ST8, ST9, ST31, ST87, ST121, and ST193). Moreover, *L. monocytogenes* were grouped into eleven clonal complexes (CC6, CC8, CC9, CC31, CC37, CC59, CC77, CC87, CC101, CC121, and CC193) (Figure 2). The obtained results allowed us to determine that the dominant number of strains fit to Lineage II (72.2%) and the remaining strains to Lineage I (27.8%).

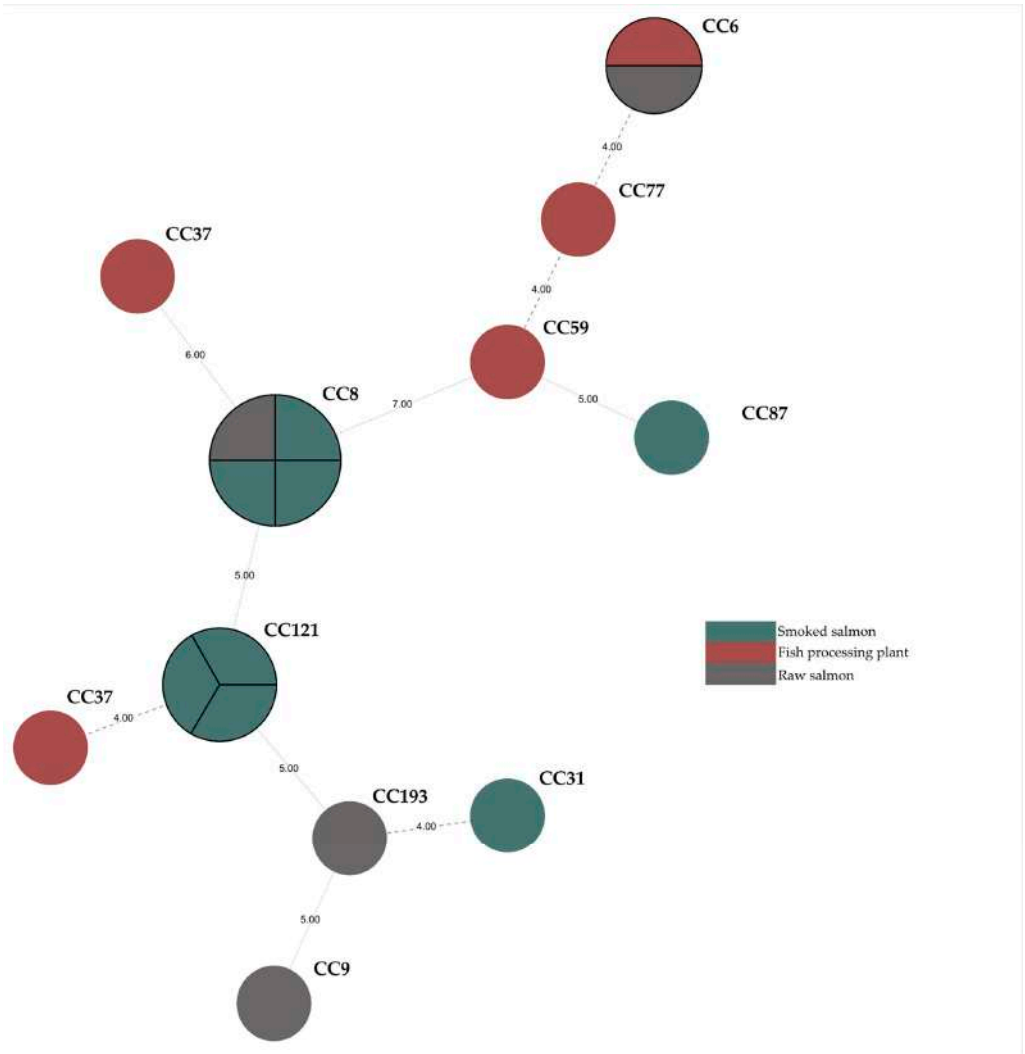


Figure 2. Minimum spanning tree analysis based on the MLST allelic profiles of 17 *L. monocytogenes* isolates. Each circle represents a sequence type (ST). The numbers on the connecting lines illustrate the numbers of target genes with different alleles. The sources of isolates are distinguished by the colors.

2.2. cgMLST Analysis

Obtained results showed that tested isolates belonged to 14 different core genome MLST types (CT), with the most (17.65%) belonging to the CT-1151 type, and all these strains were isolated from smoked salmon. Additionally, two strains (11.76%) belonged to the CT909 type and were also isolated from smoked salmon. The occurrence of one

strain with CT11711, CT11716, CT11717, CT11718, CT1824, CT2283, CT443, CT5641, CT58, CT7220, CT7227, and CT893 (Figure 2) was observed.

2.3. Assessment of Virulence Factor Genotypes across Different Sublineages

The presence and integrity of *Listeria monocytogenes* pathogenicity islands 1 to 4 (LIPI-1 to LIPI-4) and the other 63 genes were investigated. All of the tested strains had genes that belonged to LIPI-1 (six genes: *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA*, *and plcB*), twelve strains (70.59%) had only one gene, namely *inl*I that belonged to LIPI-2, and the rest of the genes were absent. The occurrence of the LIPI-3 (eight genes: llsA, llsG, llsH, *llsX*, *llsB*, *llsY*, *llsD*, and *llsP*) was observed in three strains, two from the ST6 serogroup IVb and one from the ST77 serogroup IIb (isolate LM8, isolate LM10, and isolate LM13) (17.65%), while the LIPI-4 island was found in one strain from ST 87 and serogroup IIb (5.88%), isolated from smoked salmon. Based on Genome Comparator, it was found that the tested strains represented 14 unique types, based on virulence profile, and only the Lm_1, Lm_2, Lm_13 and Lm_16 strains belonged to one type.

Only four genes (*inlA*, *inlE*, *inlH,* and *inlC2*) from the internalin gene family members were found in all isolates tested, whereas the *inlB*, *inlC*, *inlJ*, *inlK,* and *inlD* genes were present on 94.12% of isolates. Moreover, the analysis showed that three of the tested isolates (17.65%) harbored a premature stop codon (PMSC). Isolates with *inlA* gene truncation belonged to serogroup IIa, ST121, ST193, and ST31 (Figure 3).

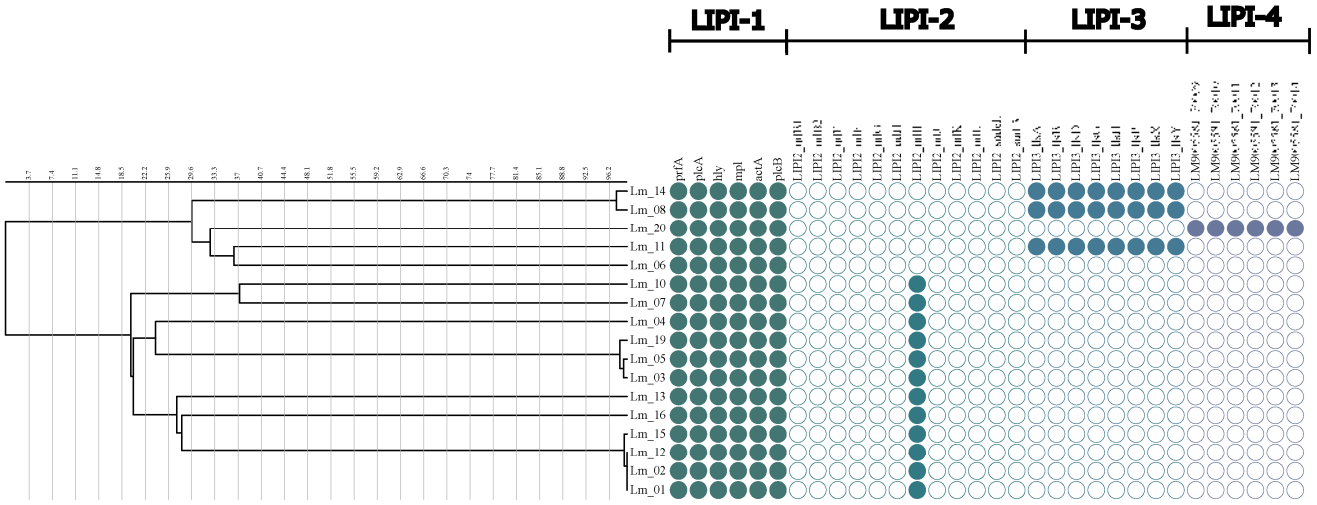


Figure 3. Dendrogram constructed with cgMLST data for the 17 *L. monocytogenes* isolates with gene content characteristics.

2.4. Antimicrobial Resistance and Stress Tolerance Genes

The most prevalent antimicrobial resistance factors were those coding tetracycline resistance, including the *lmo0839*, *tet*A_3, and *tet*C genes, which were found in all strains. The *tet*A_2 and *tet*A_1 genes were found in 94.1% and 72.2% of isolates, respectively. In addition to the tetracycline resistance genes, all strains had lincomycin, trimethoprim, and daunorubicin resistance genes. The presence of the Tn*6188* transposon was observed in four strains, with genes encoding resistance to benzalkonium chloride, tetracyclines, and macrolides; however, just one gene (*ermC*) was found in all four strains. Interestingly just one strain isolated from smoked salmon had the *aacA4* gene, which encoded resistance to aminoglycosides. Additionally, in each of the strains, genes encoding resistance to toxic ions (*lmo1961*) were observed, including the camphor resistance protein CrcB (*lmo2082)* and aluminum (*lmo1297*). Genes encoding resistance to cadmium were observed in 47.05% (*cadC*) and 41.18% (*cadA*) of the strains, respectively (Figure 4).

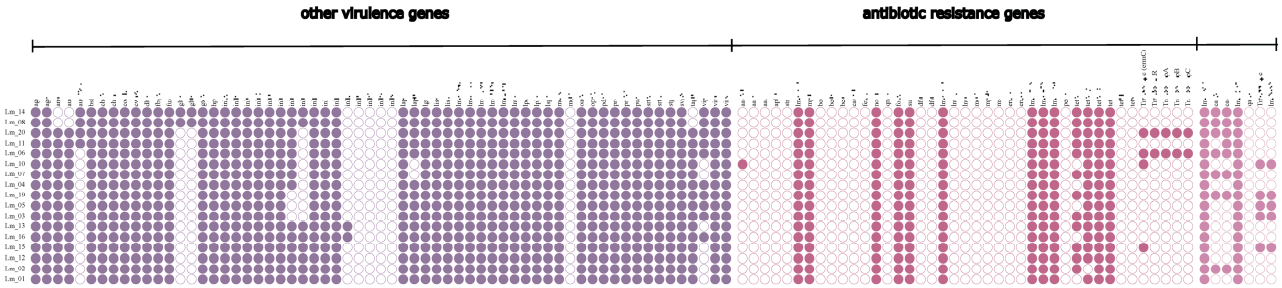


Figure 4. Occurrence of virulence and resistance among *L. monocytogenes* isolates.

2.5. Comparison of Isolates from Food and A Food-Production Environment with Human L. monocytogenes

One hundred and eighty-five strains of *L. monocytogenes* isolated from humans in Europe were selected for strain comparison. The results of the analysis showed that the strains causing infections most often belonged to CC6, of which 45.21% belonged to CT4915. In this study, two isolates obtained from raw salmon and fish-processing environments belong to the most frequent CT-type (CT4915).

Additionally, it was noticed that four strains did not belong to any of the groups of strains isolated from humans; they were Lm_7 (CC193, SL193, and ct11716), Lm_9 (CC31, SL31, and ct7227), and Lm_17 (CC87, SL87, and ct58) (Figure 5).

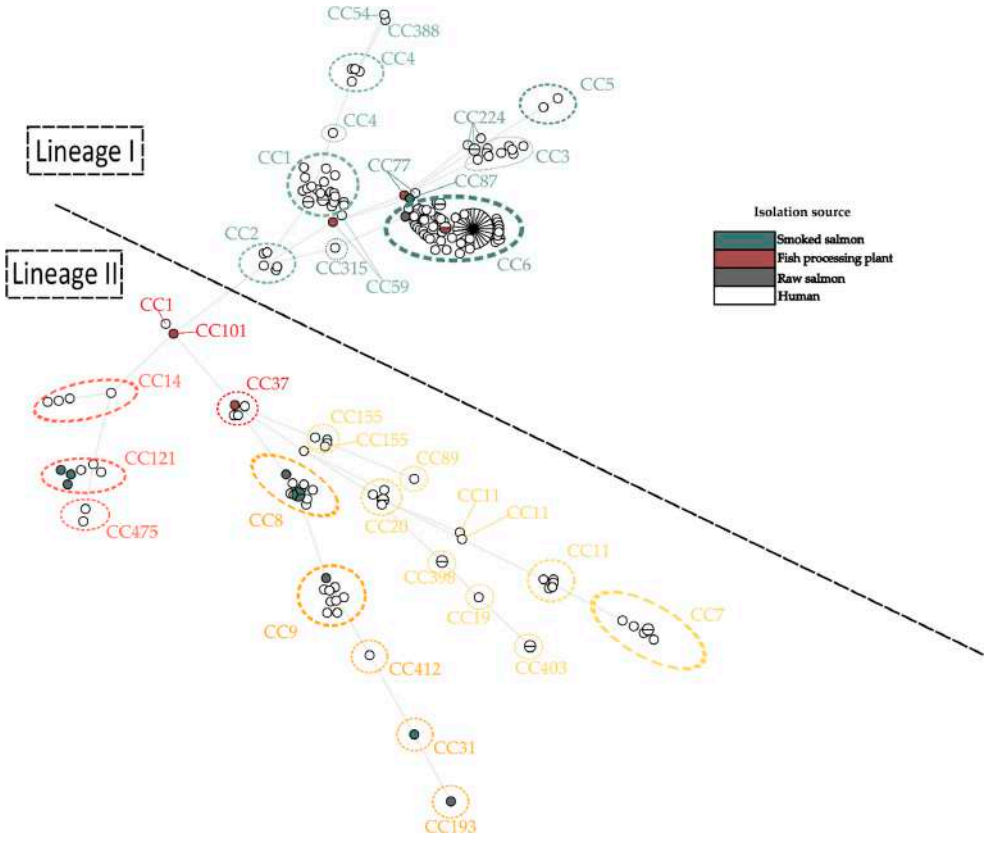


Figure 5. A minimum spanning tree (MST) representing the comparison of *L. monocytogenes* isolated and analyzed in this study with the published genomes recovered from listeriosis cases from Europe. Analysis was made on the base MLST profiles using a single linkage method. The graph was created with BioNumerics v7.6.

In addition, the virulence profiles were compared, which more accurately depicted the virulence potentials, and again confirmed that the Lm_7, Lm_9, and Lm_17 strains could

be described as the strains with the lowest virulence potentials. The strains Lm_1 (CC8, SL8, and CT1151), Lm_2 (CC8, SL8, and CT1151), Lm_11 (CC8, SL8, and CT1151), Lm 14 (CC8, SL8, and CT7220), Lm_8 (CC6, SL6, and CT5641), and Lm_13 (CC6, SL6, and CT443) were those with the highest virulence potentials (Figure 6).

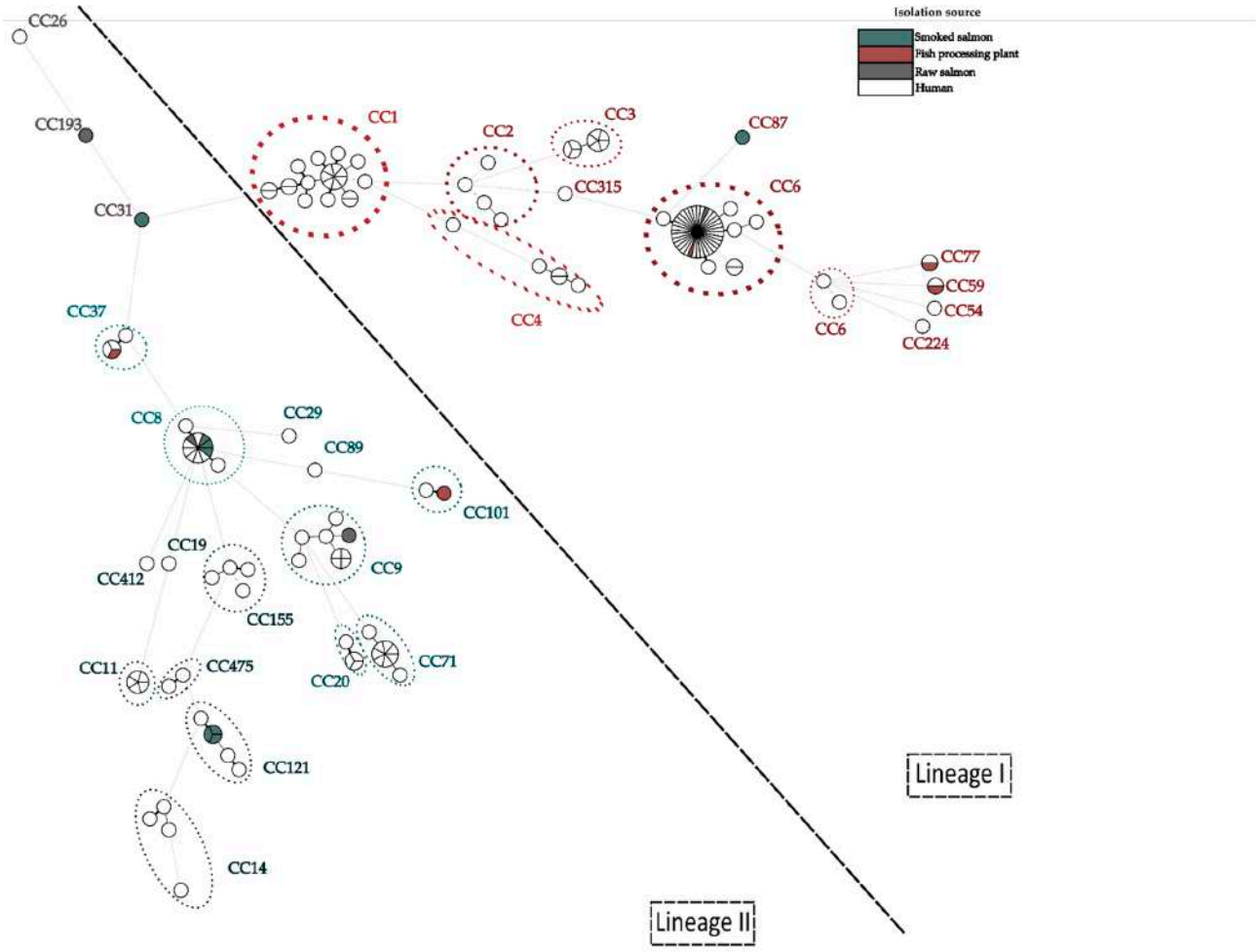


Figure 6. A minimum spanning tree (MST) representing the comparison of the virulence profiles of *L. monocytogenes* isolated and analyzed in this study with the virulence profile of published genomes recovered from listeriosis cases from Europe. The analysis was made on the base of MVLST profiles using a single linkage method. The graph was created with BioNumerics v7.6.

2.6. Detection of Prophage Regions and Plasmid

Prophage profiles of the 17 *L. monocytogenes* genomes sequenced in this study were identified using the Prophage Hunter tool [20]. A total of six different prophage regions were found across different *L. monocytogenes* isolates (Figure 7).

The most prevalent intact prophage was the A006 [NC_009815] (n = 12, 64.71%), followed by the LP_101 [NC_024387] (n = 10, 58.82%). Three different prophages, vB LmoS _293 [NC_028929.1], LP-030-3 [NC_024384.1], and A118 [NC_003216.1], were found in 11.76% (n = 2). The least prevalent prophage was B025 [NC_009812.1], and it was found in just one strain: Lm_04 (CC101, SL101, and CT11711) (Figure 7A). The distribution of plasmids in the genome is shown in Figure 7B.

Analysis of the presence of plasmids revealed that in the genomes, two types of plasmids were present: pLM33 (rep25) and pLI100 (rep26). The distribution of plasmids in the genome is shown in Figure 7B.

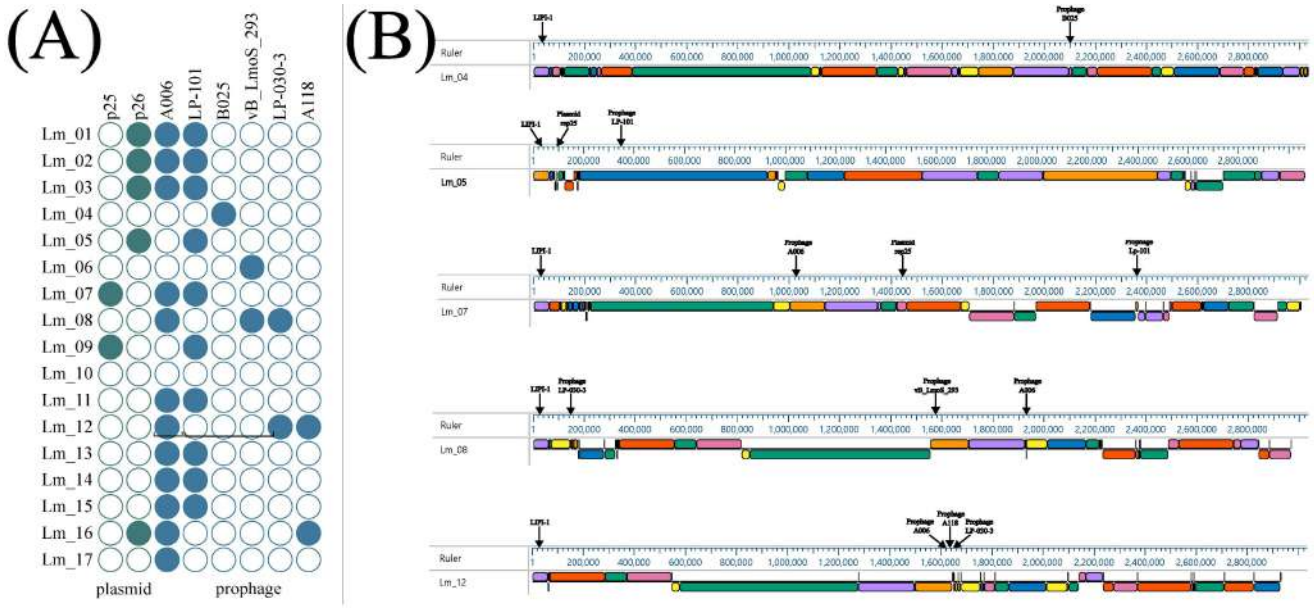


Figure 7. Plasmid (**A**) and prophage (**B**) profiles of isolated *L. monocytogenes* and its location in genomes.

The more common plasmid was pLI100, which was found in five strains, while the plasmid pLM33 was found in only two strains.

2.7. Collinearity Analysis

To investigate the genomic similarity of isolates from the same source, a collinearity relationship was constructed. The evolutionary distance among *L. monocytogenes* strains was evaluated with the DNAstar software. Each color block represented an LCB (Locally Colinear Blocks), indicating that the genome was not rearranged within this region, which was essentially distinct from genetic recombination.

Isolates from the same source were selected as a group for collinear analysis; the strains isolated from raw salmon are shown in 8A. The strains isolated from smoked salmon are shown in 8B, and the strains isolated from the fish-processing environment are shown in 8C. All genomes started with an LCB that contained LIPI-1. It was clearly seen that no strains in the isolation groups were identical.

The collinearity comparison chart of eight strains, Lm_01, Lm_02, Lm_03, Lm_05, Lm_09, Lm_11, Lm_16, and Lm_17, showed high heterogenicity in a group. It can clearly be seen as a translocation and inversion of LCBs (Figure 8A).

Similar conclusions can be drawn from the collinearity comparison chart of four strains: Lm_8, Lm_07, Lm_14, and Lm_15. The differences in LCBs between isolates were shown in deletions, translocation, and inversions (Figure 7B). Translocation and inversion of LCBs in genomes were observed in *L. monocytogenes* isolated from the food-processing environments (Figure 8C).

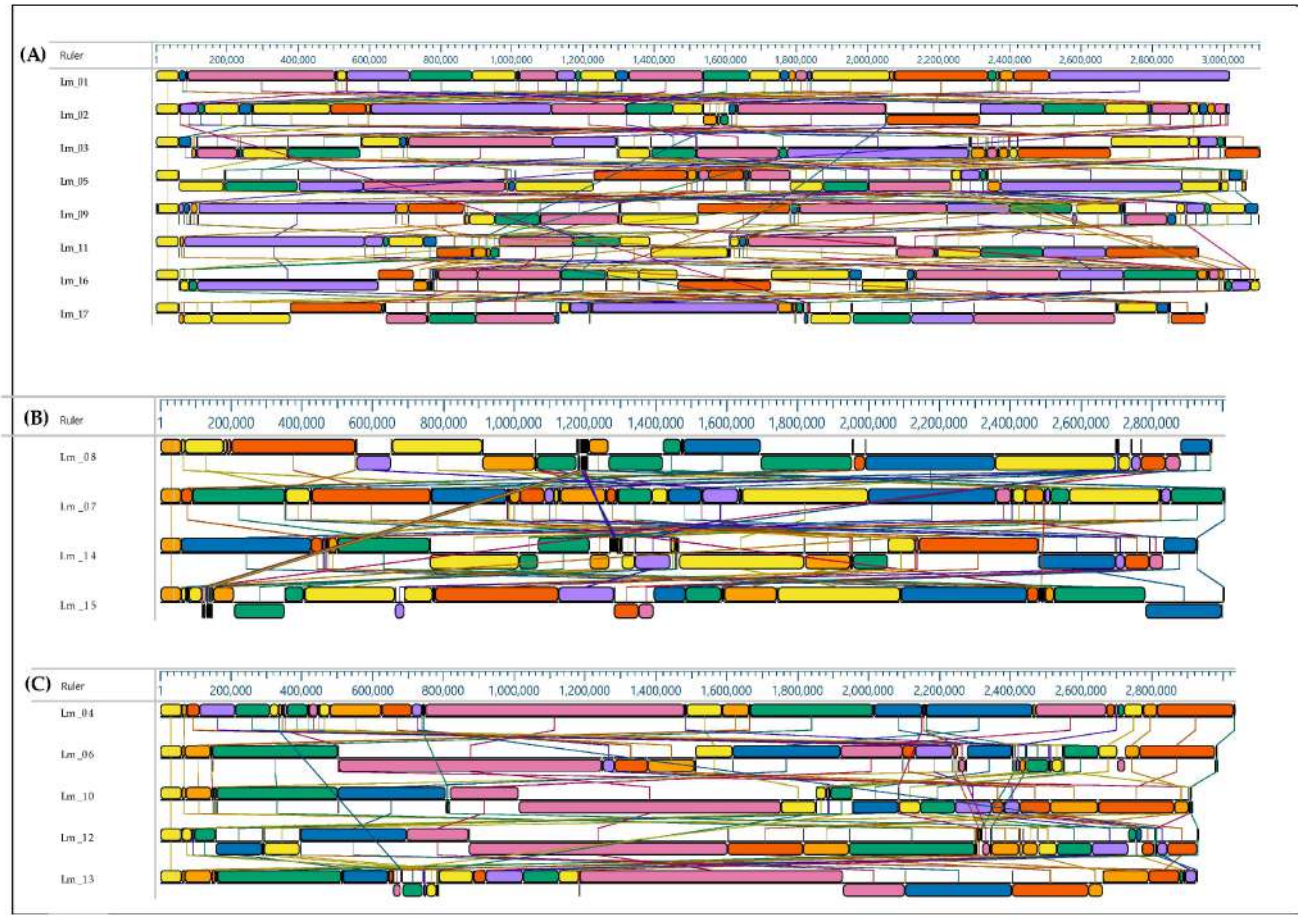


Figure 8. Collinearity analysis of the *L. monocytogenes* genomes isolated from smoked salmon (**A**), raw salmon (**B**) and food environment (**C**). Local collinear blocks are represented by blocks of the same color connected by lines.

3. Discussion

Listeriosis is a major public health problem worldwide, and the monitoring of *L. monocytogenes* in food is mandatory and essential for risk assessment. Ready-to-eat (RTE) food of animal origin is a main source of human listeriosis. Fish products are mentioned as being frequently contaminated with *L. monocytogenes*. It should be emphasized that smoked fish, graved fish, and other fish products are most often associated with this foodborne disease [4–7,21].

Before 2000, two outbreaks were described in the Nordic countries associated with RTE from fish. The first one from Sweden concerned nine patients who consumed graved rainbow trout, and the second concerned Finland and five patients who consumed cold-smoked rainbow trout [22]. In later years, the Scandinavian countries also noted outbreaks linked to fish consumption. In 2013–15, there were three outbreaks that resulted in the deaths of seven patients and one fetus in Denmark [9], and in Sweden, there were 27 clinical cases that were due to graved and smoked fish products produced by one manufacturer [6]. The problem of listeriosis does not concern only the Nordic countries. In Germany, since 2010, there have been 22 independent outbreaks, the sources of which were smoked and/or graved salmon products [4].

In our study, it was determined that the analyzed strains belonged to eleven different MLST sequence types (ST) and fourteen different cgMLST types (CT) (Table S1). The most frequently isolated MLST types were ST8 and ST101, while the most frequently isolated cgMLST types were CT1151 and CT909. The results of other authors suggest that the dominant STs in food are ST155 and ST121 among *L. monocytogenes* of food origin [23–25].

It seems that such isolates may have a molecular background that allows them to survive in food and food production areas [26,27]. There are few reports characterizing *L. monocytogenes* in fish and in the fish-processing environment. Thomannsen et al. [28], analyzing the results of *L. monocytogenes* from the salmon-processing environment, showed that the most common were ST37 (88.9%) and ST8 (11.1%). Wieczorek et al. [29] characterized a total of 28 strains isolated from raw salmon, smoked salmon, and production plants that indicated that the dominant ST was ST121 (46.43%), whereas the remaining isolates belonged to ST8 (14.28%), ST155, and ST173 (10.71% each); ST31 (7.14%); and ST7 and ST504 (3.57% each). In a large study by Maury et al. [30], in which more than 400 strains isolated from seafood were characterized, it was found that over 50.0% of the strains belonged to ST121, which agrees with the results of Wieczorek et al., 2020. In our study, the number of strains belonging to ST212 was < 20%, but this can be explained by a small number of strains.

The results of our research showed a large diversity of *L. monocytogenes* strains in fish and the fish-processing environment. However, there was no straightforward evidence about the main reason for the high diversity of *L. monocytogenes* in fish. The quality of water in the place of breeding and, above all, the proximity of the agricultural runoff, have high influences on that diversity [30]. Changes in the seasons of sampling, handling, and analytical methods are likely to contribute significantly to this as well [30].

Whole genome sequencing seems to be an ideal tool for determining the virulence potentials of strains. It is an effective method for determining highly related isolates, but it can also be used to identify the presence of genes/pathogenicity islands associated with hypervirulence or modes of pathogenesis. Investigating the virulence profiles, we observed that the virulence gene counts and the comparison of virulence profiles, based on the presence of genes and their alleles, differed substantially. The LIPI-1, a Prf-A dependent virulence gene cluster, typical and crucial in the process of causing human listeriosis, was found in all the analyzed strains. In a recent study conducted by Rahman et al., three vital pathogenic proteins of L. monocytogenes, such as listeriolysin O (LLO), phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC), and actin polymerization protein (ActA) encoded by genes located on LIPI-1, were selected using a subtractive proteomics approach to design the multi-epitope vaccine (MEV). The authors' in silico study showed that MEV exhibited a robust binding interaction with toll-like receptor 2 (TLR2), a key player in the innate immune system. The current subtractive proteomics and immunoinformatics study provides a background for the development of a suitable, safe, and effective vaccine against pathogenic *L. monocytogenes* [31].

Complete LIPI-2, which encodes a number of internalins and the enzyme sphingomyelinase, specific for another pathogenic species, *L. ivanovii* [32], was not found in any of the strains. Over 70% of strains possessed the *inl*I gene, which belongs to the internalin gene family; however, there was no evidence that the *inl*I gene increased the virulence potential. In fact, in a study of hypervirulent strains of *L. monocytogenes* responsible for a listeriosis outbreak in China, a unique composition of wall teichoic acids was found. Their genetic origins were in lineage I but also in the *smc*L gene located at the LIPI-2 locus [33].

The LIPI-3, which encodes a potential hemolytic factor with homology to streptolysin S (SLS), was strongly associated with lineage I strains [34]; however, the three strains found with it belonged to lineage II. The presence of the last LIPI-4 island was found in only one Lm_03 strain (lineage II, CC121, SL121, and CT909). Both the islands of LIPI-3 and LIPI-4 were associated with the hypervirulent strains responsible for an outbreak of listeriosis in Italy. The strains belonging to CC1 and CC4 had LIPI-4 present only in CC4 [35]. It was suggested that these additional pathogenicity islands are not common among food isolates and do not correlate to increased hypervirulence [36]. However, in this study, even with a small number of strains from fish, it was possible to find strains with those islands, which may also be the cause of frequent cases of listeriosis after eating fish and fish products.

The data showed the presence of PMSC in three isolates belonging to serotype IIa but of a different clonal complex (CC) and sequence type (ST). The LM_5 isolate (CC121, ST121) had a type 6 mutation (allele 49). The mutation shortened the InlA protein to a

length of 491 (aa), as described before by Olier et al. [37]. The LM_7 isolate (CC193, ST193) had a type 25 mutation (allele 41). The mutation shortened the InlA protein to a length of 25 (aa), as also referred to by Moura et al. [25]. The LM_9 isolate (CC31, ST31) had a type 5 mutation (allele 40 [38]). The mutation shortened the InlA protein to a length of 188 (aa), as was referred to by Olier et al. [37].

So far, 32 types of PMSC have been detected in the *inlA* gene (Table S2). It has not been verified for all types of mutations, but it was already shown that in some isolates, the truncated *inlA* gene affected the attenuation of *L. monocytogenes* isolates and reduced their virulence.

Recent studies in South America, Europe, and Asia on the antimicrobial resistance of *L. monocytogenes* have typically reported low levels of antimicrobial resistance in isolates from food-production environments [39,40]. The latest studies have reported various antibiotic-resistance genes. Interestingly, research on WGSs of *L. monocytogenes* suggest that the dominant genes were *fosX*, *lin*, *mprF*, *norB*, and *mgrA* [41,42]; however, we found a larger group of antibiotic resistance genes. Mafuna et al. [41] reported tetracycline resistance genes, *tetM* and *tetS,* found in a few isolates, although in this study, both of those genes were not found. In strains isolated from fish and food-processing environments, the dominant genes coding tetracycline resistance genes were *tetA* and *tetC*. Tetracycline is believed to be the most frequent resistance trait in *L. monocytogenes* isolated from human and food-processing environments (REF). It is important to highlight the fact that tetracyclines averaged 20% of antibiotic classes used in aquaculture, which can result in increasing resistance against this pharmaceutic [43].

The detection of the *accA4* gene in isolate LM9 (molecular serogroup IIa (CC31, ST31)) is very interesting. In literature, the presence of this gene is associated with mobile genetic elements, such as transposons and prophages. Gene *accA4* was detected in various species, including *K. pneumoniae, P. mirabilis, P. aeruginosa, S. enterica, K. oxytoca, S. maltophilia, and E. cloacae* [44]. In Poland, this gene was recorded in *P. aeruginosa* isolates obtained from patients from intensive therapy units [45]. The presence of the *acca4* gene was also demonstrated by Kurpas et al. on *L. monocytogenes* isolates belonging to the molecular serotype IIb (CC5, ST5) (from the meat-production environment) [42].

In our study, after determining the presence of plasmids, it was found that 41.18% of the strains contained at least one plasmid. *L. monocytogenes* strains are known to carry plasmids with a frequency of up to 79% [46]. This information applies to clinical strains, while for isolates from food or food production, these values are lower (35%) [47]. Plasmid pLM33 is commonly found in food-related lineage II *L. monocytogenes* strains [48], but in our study, plasmid pLI100 (rep26) was more common. Due to the fact that plasmids obtained from *L. monocytogenes* have genes coding resistance to antiseptics and heavy metals, as well as chloramphenicol, clindamycin, erythromycin, streptomycin, and tetracycline [47,49,50], this increases the virulence potential and poses a potential threat for the consumers.

4. Materials and Methods

4.1. Bacterial Strains

A total of 17 *L. monocytogenes* isolate species classified by Vitek MS (bioMerieux, Marcy-l'Étoile, France) were selected for the whole genome sequencing and genomic analyses. The strains came from a collection of the Department of Industrial and Food Microbiology at University of Warmia and Mazury in Olsztyn. Strains were isolated from food samples and food-processing premises (samples were taken from both non-food contact surfaces (drains, floors, freezers, aprons, door handles, and taps) and food contact surfaces) between 2018–2019 using the standard ISO 11290-1:2017-. The identification of the species level was conducted on MALDI-TOF MS (Vitek MS, biomerieux, France) and double confirmed by performing the standard PCR proposed by Ryu at al. [51]. The strains and sources of isolation are listed in Table 1.

Table 1. List of *Listeria monocytogenes* strains used in study.

No.	Source	Year of Isolation	Clonal Complex	Sublineage	cgMLST Type	Serogroup
Lm_1	smoked salmon	2018	CC8	SL8	CT1151	IIa
Lm_2	smoked salmon	2018	CC8	SL8	CT1151	IIa
Lm_3	smoked salmon	2018	CC121	SL121	CT909	IIa
Lm_4	food processing premises	2018	CC101	SL101	CT11711	IIa
Lm_5	smoked salmon	2018	CC121	SL121	CT909	IIa
Lm_6	food processing premises	2018	CC59	SL59	CT2283	IIb
Lm_7	raw salmon	2018	CC193	SL193	CT11716	IIa
Lm_8	raw salmon	2018	CC6	SL6	CT5641	IVb
Lm_9	smoked salmon	2018	CC31	SL31	CT7227	IIa
Lm_10	food processing premises	2018	CC77	SL77	CT11718	IIb
Lm_11	smoked salmon	2018	CC8	SL8	CT1151	IIa
Lm_12	food processing premises	2018	CC37	SL37	CT11717	IIa
Lm_13	food processing premises	2018	CC6	SL6	CT443	IVb
Lm_14	raw salmon	2018	CC8	SL8	CT7220	IIa
Lm_15	raw salmon	2018	CC9	SL9	CT1824	IIc
Lm_16	smoked salmon	2018	CC121	SL121	CT893	IIa
Lm_17	smoked salmon	2018	CC87	SL87	CT58	IIb

4.2. Library Preparation and Sequencing

Samples were sequenced in an external company Genomed (Warsaw, Poland). The concentration of genomic DNA was measured using the fluorimetric method using PicoGreen reagent (Life Technologies, Eugene, OR, USA). The measurement was performed on the Tecan Infinite apparatus. Genomic DNA was fragmented by sonication using Covaris E210 (Covaris, Brighton, UK). DNA Library was prepared by the NEBNext® Ultra ™ II DNA Library Prep Kit for Illumina® (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). Sequencing was made on MiSeq Illumina® in PE 2 × 300 cycles with MiSeq Reagent Kit v3 reagents (600 cycles) (MS-102-3003). Readings from MiSeq were filtered with Cutadapt version 3.0. Quality control of the results was performed using the FastQC program. Denovo folding was performed by Spades version 3.14.1.

4.3. MLST and cgMLST Characterization

The MLST and cgMLST analyses were based on a comparison of allele profiles for 7 and 1748 genes, respectively. All calculations and determinations of allele numbers, sequence types (ST), and clonal complexes (CC) were performed by the tools available on the BIGSdb-Lm platform (https://bigsdb.pasteur.fr/listeria/ accessed on 28 September 2022). (MLST—10.1371/journal.ppat.1000146; cgMLST—10.1038/nmicrobiol.2016.185; 10.1186/1471-2105-11-595). MLST and cgMLST profile comparisons were performed using Bionumerics 7.6 software (Applied Maths, Belgium) with a single linkage algorithm.

4.4. Identification of Virulence-, Antimicrobial-, and Stress-Related Genes

Identification of all genes related to virulence and resistance to antimicrobials or stress factors were performed by the tools available on the BIGSdb-Lm platform (https://bigsdb.pasteur.fr/listeria/ accessed on 10 October 2022). Additionally, MVLST analysis was performed based on 93 virulence-related genes. For comparison, the strains available in the database (BIGSdb-Lm platform) were selected, and the criteria were the strain origin (Europe) and the isolation source (human). One hundred eighty-five strains of *L. monocytogenes* isolated from humans in Europe were selected.

4.5. Prophage and Plasmids Identification

The prophage identification was investigated using the Prophage Hunter Tool [20], used for putative prophage identification and annotation in all *L. monocytogenes* genomes. For the purpose of our analysis, only active (according to Phage Hunter) prophages were

considered. Additionally, FASTA files of sequences from each strain were analyzed using PlasmidFinder 2.1 to identify predicted plasmids [52].

4.6. Collinearity Analysis

The evolutionary distance among *L. monocytogenes* isolates was evaluated with the DNAstar software (SeqMan NGen®. Version 17.2. DNASTAR. Madison, WI, USA).

5. Conclusions

The results indicated that *L. monocytogenes* strains isolated from fish and fish-processing premises contain a wide variety of genes encoding virulence and resistance to antimicrobials and are closely related to the CT4915 (CC6) strains that caused listeriosis in Europe. Fish and fish-processing premise isolates had high tetracycline resistance, encoded by *lmo0839*, *tet*A_3, and *tet*C genes, which were found in all strains. These strains can also cause a serious threat because many of them carry both transposons and plasmids; they can be transferred to other pathogens or commensal bacteria. The data might be useful for epidemiological investigations related to listeriosis that require more genetic information on *L. monocytogenes* from different countries in order to identify the origin of the bacterium and track these microbes along the food chain.

Future Work

Due to the enlargement of the database of genomes of L. monocytogenes isolated from fish and the fish-processing environment, in the near future, Synthetic Microbial Communities (SynCom) can be used to study the interactions between microbes and the fish matrix. The SynCom approach is an emerging research area that involves a synthetic biology approach coupled with knowledge gained from microbial community analysis and metagenomic and bioinformatics approaches (WGS). Understanding the dynamic interactions within microbial ecosystems is useful for constructing microbial consortia with robust, stable, and predictable behavior [53,54]. The holistic approaches can aim to study the fish microbiome as a whole, focusing on diminishing interferences to reduce environmental variation and elucidate how it operates in its natural environment. Additionally, SynCom can also predict microbes–host interactions; thus, it would be interesting to predict *L. monocytogenes* isolated from fish during listeriosis outbreaks.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms24043581/s1. References [25,38,42,55–62] are cited in the Supplementary Materials.

Author Contributions: Conceptualization, A.J.Z. and M.K.; methodology, A.J.Z. and M.K.; formal analysis, A.J.Z.; investigation, A.J.Z. and M.K.; resources, A.Z., writing—original draft preparation, A.J.Z.; writing—review and editing, A.Z., W.C.-W. and M.J.F.; visualization, A.J.Z.; supervision, A.Z., W.C.-W. and M.J.F.; funding acquisition, A.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by the National Science Centre, Kraków, Poland, project number 2018/29/B/NZ9/00645. The publication was written as a result of the author's internship in Faculty of Veterinary Medicine, University of Lisbon, co-financed by the European Union under the European Social Fund (Operational Program Knowledge Education Development), carried out in the project Development Program at the University of Warmia and Mazury in Olsztyn (POWR.03.05.00-00-Z310/17).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All genome sequences were deposited at NCBI; the corresponding BioProject Accession Number is PRJNA860799.

Acknowledgments: Figure were made with using pictures from Servier Medical Art (Creative Commons Attribution 3.0 accessed on 28 December 2022) with the use of Inkscape software [Internet] Available from: https://inkscape.org (accessed on 28 December 2022).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Tiensuu, T.; Guerreiro, D.N.; Oliveira, A.H.; O'Byrne, C.; Johansson, J. Flick of a switch: Regulatory mechanisms allowing listeria monocytogenes to transition from a saprophyte to a killer. *Microbiology* **2019**, *165*, 819–833. [CrossRef] [PubMed]
2. Choi, M.H.; Park, Y.J.; Kim, M.; Seo, Y.H.; Kim, Y.A.; Choi, J.Y.; Yong, D.; Jeong, S.H.; Lee, K. Increasing Incidence of Listeriosis and Infection-associated Clinical Outcomes. *Ann. Lab. Med.* **2018**, *38*, 102–109. [CrossRef] [PubMed]
3. Bland, R.; Brown, S.R.B.; Waite-Cusic, J.; Kovacevic, J. Probing antimicrobial resistance and sanitizer tolerance themes and their implications for the food industry through the Listeria monocytogenes lens. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2022**, *21*, 1777–1802. [CrossRef] [PubMed]
4. Lachmann, R.; Halbedel, S.; Lüth, S.; Holzer, A.; Adler, M.; Pietzka, A.; Al Dahouk, S.; Stark, K.; Flieger, A.; Kleta, S.; et al. Invasive listeriosis outbreaks and salmon products: A genomic, epidemiological study. *Emerg. Microbes Infect.* **2022**, *11*, 1308–1315. [CrossRef]
5. Lambertz, S.T.; Nilsson, C.; Brådenmark, A.; Sylvén, S.; Johansson, A.; Jansson, L.M.; Lindblad, M. Prevalence and level of Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods in Sweden 2010. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *160*, 24–31. [CrossRef] [PubMed]
6. Lopez-Valladares, G.; Danielsson-Tham, M.L.; Tham, W. Implicated Food Products for Listeriosis and Changes in Serovars of Listeria monocytogenes Affecting Humans in Recent Decades. *Foodborne Pathog. Dis.* **2018**, *15*, 387–397. [CrossRef] [PubMed]
7. Ricci, A.; Allende, A.; Bolton, D.; Chemaly, M.; Davies, R.; Fernández Escámez, P.S.; Girones, R.; Herman, L.; Koutsoumanis, K.; Nørrung, B.; et al. Listeria monocytogenes contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. *EFSA J.* **2018**, *16*, e05134. [CrossRef]
8. Kurpas, M.; Wieczorek, K.; Osek, J. Ready-to-eat Meat Products As a Source of Listeria Monocytogenes. *J. Vet. Res.* **2018**, *62*, 49–55. [CrossRef]
9. Gillesberg Lassen, S.; Ethelberg, S.; Björkman, J.T.; Jensen, T.; Sørensen, G.; Kvistholm Jensen, A.; Müller, L.; Nielsen, E.M.; Mølbak, K. Two listeria outbreaks caused by smoked fish consumption—Using whole-genome sequencing for outbreak investigations. *Clin. Microbiol. Infect.* **2016**, *22*, 620–624. [CrossRef]
10. Lunestad, B.T.; Truong, T.T.T.; Lindstedt, B.A. A multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) of Listeria monocytogenes isolated from Norwegian salmon-processing factories and from listeriosis patients. *Epidemiol. Infect.* **2013**, *141*, 2101–2110. [CrossRef]
11. Lecuit, M. Listeria monocytogenes, a model in infection biology. *Cell Microbiol.* **2020**, *22*, e13186. [CrossRef]
12. Chen, J.; Luo, X.; Jiang, L.; Jin, P.; Wei, W.; Liu, D.; Fang, W. Molecular characteristics and virulence potential of Listeria monocytogenes isolates from Chinese food systems. *Food Microbiol.* **2009**, *26*, 103–111. [CrossRef] [PubMed]
13. Cossart, P.; Toledo-Arana, A. Listeria monocytogenes, a unique model in infection biology: An overview. *Microbes Infect.* **2008**, *10*, 1041–1050. [CrossRef]
14. Ireton, K.; Mortuza, R.; Gyanwali, G.C.; Gianfelice, A.; Hussain, M. Role of internalin proteins in the pathogenesis of Listeria monocytogenes. *Mol. Microbiol.* **2021**, *116*, 1407–1419. [CrossRef] [PubMed]
15. Quereda, J.J.; Morón-García, A.; Palacios-Gorba, C.; Dessaux, C.; García-del Portillo, F.; Pucciarelli, M.G.; Ortega, A.D. Pathogenicity and virulence of Listeria monocytogenes: A trip from environmental to medical microbiology. *Virulence* **2021**, *12*, 2509–2545. [CrossRef] [PubMed]
16. Quereda, J.J.; Dussurget, O.; Nahori, M.A.; Ghozlane, A.; Volant, S.; Dillies, M.A.; Regnault, B.; Kennedy, S.; Mondot, S.; Villoing, B.; et al. Bacteriocin from epidemic Listeria strains alters the host intestinal microbiota to favor infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 5706–5711. [CrossRef] [PubMed]
17. Vilchis-Rangel, R.E.; Espinoza-Mellado, M. del R.; Salinas-Jaramillo, I.J.; Martinez-Peña, M.D.; Rodas-Suárez, O.R. Association of Listeria monocytogenes LIPI-1 and LIPI-3 marker llsX with invasiveness. *Curr. Microbiol.* **2019**, *76*, 637–643. [CrossRef]
18. Maury, M.M.; Tsai, Y.H.; Charlier, C.; Touchon, M.; Chenal-Francisque, V.; Leclercq, A.; Criscuolo, A.; Gaultier, C.; Roussel, S.; Brisabois, A.; et al. Uncovering Listeria monocytogenes hypervirulence by harnessing its biodiversity. *Nat. Genet.* **2016**, *48*, 308. [CrossRef]
19. Schiavano, G.F.; Ateba, C.N.; Petruzzelli, A.; Mele, V.; Amagliani, G.; Guidi, F.; De Santi, M.; Pomilio, F.; Blasi, G.; Gattuso, A.; et al. Whole-Genome Sequencing Characterization of Virulence Profiles of Listeria monocytogenes Food and Human Isolates and In Vitro Adhesion/Invasion Assessment. *Microorganisms* **2022**, *10*, 62. [CrossRef]
20. Song, W.; Sun, H.X.; Zhang, C.; Cheng, L.; Peng, Y.; Deng, Z.; Wang, D.; Wang, Y.; Hu, M.; Liu, W.; et al. Prophage Hunter: An integrative hunting tool for active prophages. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, W74–W80. [CrossRef]
21. Heinitz, M.L.; Johnson, J.M. The incidence of Listeria spp., Salmonella spp., and Clostridium botulinum in smoked fish and shellfish. *J. Food Prot.* **1998**, *61*, 318–323. [CrossRef] [PubMed]
22. Miettinen, M.K.; Siitonen, A.; Heiskanen, P.; Haajanen, H.; Björkroth, K.J.; Korkeala, H.J. Molecular Epidemiology of an Outbreak of Febrile Gastroenteritis Caused by Listeria monocytogenes in Cold-Smoked Rainbow Trout. *J. Clin. Microbiol.* **1999**, *37*, 2358. [CrossRef] [PubMed]
23. Wagner, E.; Zaiser, A.; Leitner, R.; Quijada, N.M.; Pracser, N.; Pietzka, A.; Ruppitsch, W.; Schmitz-Esser, S.; Wagner, M.; Rychli, K. Virulence characterization and comparative genomics of Listeria monocytogenes sequence type 155 strains. *BMC Genomics* **2020**, *21*, 847. [CrossRef] [PubMed]

24. Wang, Y.; Ji, Q.; Li, S.; Liu, M. Prevalence and Genetic Diversity of Listeria monocytogenes Isolated From Retail Pork in Wuhan, China. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 459. [CrossRef]
25. Moura, A.; Criscuolo, A.; Pouseele, H.; Maury, M.M.; Leclercq, A.; Tarr, C.; Björkman, J.T.; Dallman, T.; Reimer, A.; Enouf, V.; et al. Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of Listeria monocytogenes. *Nat. Microbiol.* **2016**, *2*, 16185. [CrossRef]
26. Hurley, D.; Luque-Sastre, L.; Parker, C.T.; Huynh, S.; Eshwar, A.K.; Nguyen, S.V.; Andrews, N.; Moura, A.; Fox, E.M.; Jordan, K.; et al. Whole-Genome Sequencing-Based Characterization of 100 Listeria monocytogenes Isolates Collected from Food Processing Environments over a Four-Year Period. *mSphere* **2019**, *4*, e00252-19. [CrossRef] [PubMed]
27. Thomassen, G.M.B.; Krych, L.; Knøchel, S.; Mehli, L. ON-rep-seq as a rapid and cost-effective alternative to whole-genome sequencing for species-level identification and strain-level discrimination of Listeria monocytogenes contamination in a salmon processing plant. *Microbiologyopen* **2021**, *10*, e1246. [CrossRef]
28. Wieczorek, K.; Bomba, A.; Osek, J. Whole-Genome Sequencing-Based Characterization of Listeria monocytogenes from Fish and Fish Production Environments in Poland. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 9419. [CrossRef]
29. Maury, M.M.; Bracq-Dieye, H.; Huang, L.; Vales, G.; Lavina, M.; Thouvenot, P.; Disson, O.; Leclercq, A.; Brisse, S.; Lecuit, M. Hypervirulent Listeria monocytogenes clones' adaption to mammalian gut accounts for their association with dairy products. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 2488. [CrossRef]
30. Gram, L. Potential Hazards in Cold-Smoked Fish: Listeria monocytogenes. *J. Food Sci.* **2001**, *66*, S1072–S1081. [CrossRef]
31. Rahman, S.; Das, A.K. A subtractive proteomics and immunoinformatics approach towards designing a potential multi-epitope vaccine against pathogenic Listeria monocytogenes. *Microb. Pathog.* **2022**, *172*, 105782. [CrossRef] [PubMed]
32. Domínguez-Bernal, G.; Müller-Altrock, S.; González-Zorn, B.; Scortti, M.; Herrmann, P.; Monzó, H.J.; Lacharme, L.; Kreft, J.; Vázquez-Boland, J.A. A spontaneous genomic deletion in Listeria ivanovii identifies LIPI-2, a species-specific pathogenicity island encoding sphingomyelinase and numerous internalins. *Mol. Microbiol.* **2006**, *59*, 415–432. [CrossRef] [PubMed]
33. Yin, Y.; Yao, H.; Doijad, S.; Kong, S.; Shen, Y.; Cai, X.; Tan, W.; Wang, Y.; Feng, Y.; Ling, Z.; et al. A hybrid sub-lineage of Listeria monocytogenes comprising hypervirulent isolates. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 4283. [CrossRef]
34. Cotter, P.D.; Draper, L.A.; Lawton, E.M.; Daly, K.M.; Groeger, D.S.; Casey, P.G.; Ross, R.P.; Hill, C. Listeriolysin S, a novel peptide haemolysin associated with a subset of lineage I Listeria monocytogenes. *PLoS Pathog.* **2008**, *4*, e1000144. [CrossRef]
35. Guidi, F.; Chiaverini, A.; Repetto, A.; Lorenzetti, C.; Centorotola, G.; Bazzucchi, V.; Palombo, B.; Gattuso, A.; Pomilio, F.; Blasi, G. Hyper-Virulent Listeria monocytogenes Strains Associated With Respiratory Infections in Central Italy. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2021**, *11*, 765540. [CrossRef]
36. Palaiodimou, L.; Fanning, S.; Fox, E.M. Genomic insights into persistence of Listeria species in the food processing environment. *J. Appl. Microbiol.* **2021**, *131*, 2082–2094. [CrossRef] [PubMed]
37. Olier, M.; Pierre, F.; Rousseaux, S.; Lemaitre, J.P.; Rousset, A.; Piveteau, P.; Guzzo, J. Expression of truncated internalin A is involved in impaired internalization of some Listeria monocytogenes isolates carried asymptomatically by humans. *Infect. Immun.* **2003**, *71*, 1217–1224. [CrossRef]
38. Van Stelten, A.; Nightingale, K.K. Development and implementation of a multiplex single-nucleotide polymorphism genotyping assay for detection of virulence-attenuating mutations in the Listeria monocytogenes virulence-associated gene inlA. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 7365–7375. [CrossRef]
39. Li, L.; Olsen, R.H.; Ye, L.; Wang, W.; Shi, L.; Yan, H.; Meng, H. Characterization of Antimicrobial Resistance of Listeria monocytogenes Strains Isolated from a Pork Processing Plant and Its Respective Meat Markets in Southern China. *Foodborne Pathog. Dis.* **2016**, *13*, 262–268. [CrossRef]
40. Wilson, A.; Gray, J.; Scott Chandry, P.; Fox, E.M. Phenotypic and Genotypic Analysis of Antimicrobial Resistance among Listeria monocytogenes Isolated from Australian Food Production Chains. *Genes* **2018**, *9*, 80. [CrossRef]
41. Mafuna, T.; Matle, I.; Magwedere, K.; Pierneef, R.E.; Reva, O.N. Whole Genome-Based Characterization of Listeria monocytogenes Isolates Recovered From the Food Chain in South Africa. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 669287. [CrossRef] [PubMed]
42. Kurpas, M.; Osek, J.; Moura, A.; Leclercq, A.; Lecuit, M.; Wieczorek, K. Genomic Characterization of Listeria monocytogenes Isolated From Ready-to-Eat Meat and Meat Processing Environments in Poland. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 1412. [CrossRef] [PubMed]
43. Schar, D.; Klein, E.Y.; Laxminarayan, R.; Gilbert, M.; Van Boeckel, T.P. Global trends in antimicrobial use in aquaculture. *Sci. Reports* **2020**, *10*, 21878. [CrossRef] [PubMed]
44. Ramirez, M.S.; Tolmasky, M.E. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist. Updat.* **2010**, *13*, 151–171. [CrossRef]
45. Sacha, P.; Jaworowska, J.; Ojdana, D.; Wieczorek, P.; Czaban, S.; Tryniszewska, E. Occurrence of the aacA4 gene among multidrug resistant strains of Pseudomonas aeruginosa isolated from bronchial secretions obtained from the Intensive Therapy Unit at University Hospital in Bialystok, Poland. *Folia Histochem. Cytobiol.* **2012**, *50*, 322–324. [CrossRef] [PubMed]
46. Hingston, P.; Brenner, T.; Hansen, L.T.; Wang, S. Comparative Analysis of Listeria monocytogenes Plasmids and Expression Levels of Plasmid-Encoded Genes during Growth under Salt and Acid Stress Conditions. *Toxins* **2019**, *11*, 426. [CrossRef]
47. Harvey, J.; Gilmour, A. Characterization of recurrent and sporadic Listeria monocytogenes isolates from raw milk and nondairy foods by pulsed-field gel electrophoresis, monocin typing, plasmid profiling, and cadmium and antibiotic resistance determination. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 840–847. [CrossRef]

48. Canchaya, C.; Giubellini, V.; Ventura, M.; De Los Reyes-Gavilán, C.G.; Margolles, A. Mosaic-Like Sequences Containing Transposon, Phage, and Plasmid Elements among Listeria monocytogenes Plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 4851. [CrossRef]
49. Elhanafi, D.; Utta, V.; Kathariou, S. Genetic characterization of plasmid-associated benzalkonium chloride resistance determinants in a Listeria monocytogenes strain from the 1998-1999 outbreak. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 8231–8238. [CrossRef]
50. Katharios-Lanwermeyer, S.; Rakic-Martinez, M.; Elhanafi, D.; Ratani, S.; Tiedje, J.M.; Kathariou, S. Coselection of cadmium and benzalkonium chloride resistance in conjugative transfers from nonpathogenic Listeria spp. to other Listeriae. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 7549–7556. [CrossRef]
51. Ryu, J.; Park, S.H.; Yeom, Y.S.; Shrivastav, A.; Lee, S.H.; Kim, Y.R.; Kim, H.Y. Simultaneous detection of Listeria species isolated from meat processed foods using multiplex PCR. *Food Control* **2013**, *32*, 659–664. [CrossRef]
52. Carattoli, A.; Zankari, E.; Garciá-Fernández, A.; Larsen, M.V.; Lund, O.; Villa, L.; Aarestrup, F.M.; Hasman, H. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 3895–3903. [CrossRef] [PubMed]
53. Marín, O.; González, B.; Poupin, M.J. From Microbial Dynamics to Functionality in the Rhizosphere: A Systematic Review of the Opportunities With Synthetic Microbial Communities. *Front. Plant Sci.* **2021**, *12*, 843. [CrossRef] [PubMed]
54. Shayanthan, A.; Ordoñez, P.A.C.; Oresnik, I.J. The Role of Synthetic Microbial Communities (SynCom) in Sustainable Agriculture. *Front. Agron.* **2022**, *4*, 58. [CrossRef]
55. Felício, M.T.S.; Hogg, T.; Gibbs, P.; Teixeira, P.; Wiedmann, M. Recurrent and sporadic Listeria monocytogenes contamination in alheiras represents considerable diversity, including virulence-attenuated isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 3887–3895. [CrossRef]
56. Gelbíčová, T.; Koláčková, I.; Pantůček, R.; Karpíšková, R. A novel mutation leading to a premature stop codon in inlA of Listeria monocytogenes isolated from neonatal listeriosis. *New Microbiol.* **2015**, *38*, 293–296. [PubMed]
57. Handa-Miya, S.; Kimura, B.; Takahashi, H.; Sato, M.; Ishikawa, T.; Igarashi, K.; Fujii, T. Nonsense-mutated inlA and prfA not widely distributed in Listeria monocytogenes isolates from ready-to-eat seafood products in Japan. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, *117*, 312–318. [CrossRef]
58. Jonquières, R.; Bierne, H.; Mengaud, J.; Cossart, P. The inlA gene of Listeria monocytogenes LO28 harbors a nonsense mutation resulting in release of internalin. *Infect. Immun.* **1998**, *66*, 3420–3422. [CrossRef]
59. Nightingale, K.K.; Windham, K.; Martin, K.E.; Yeung, M.; Wiedmann, M. Select Listeria monocytogenes subtypes commonly found in foods carry disctinct nonsense mutations in inlA. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 8764–8772. [CrossRef]
60. Ragon, M.; Wirth, T.; Hollandt, F.; Lavenir, R.; Lecuit, M.; Le Monnier, A.; Brisse, S. A new perspective on Listeria monocytogenes evolution. *PLoS Pathog.* **2008**, *4*, e1000146. [CrossRef]
61. Rousseaux, S.; Olier, M.; Lemaître, J.P.; Piveteau, P.; Guzzo, J. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism of inlA for rapid screening of Listeria monocytogenes strains deficient in the ability to invade Caco-2 cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 2180–2185. [CrossRef] [PubMed]
62. Van Stelten, A.; Simpson, J.M.; Ward, T.J.; Nightingale, K.K. Revelation by single-nucleotide polymorphism genotyping that mutations leading to a premature stop codon in inlA are common among Listeria monocytogenes isolates from ready-to-eat foods but not human listeriosis cases. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 2783–2790. [CrossRef] [PubMed]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Olsztyn, 26.03.2024
(miejscowość, data)

mgr inż. Arkadiusz Zakrzewski
(imię i nazwisko kandydata)
Technologia żywności i żywienia
(dyscyplina naukowa)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
technologii żywności i żywienia
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak

OŚWIADCZENIE

autora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że w pracy pod tytułem: *Zakrzewski, A. J., Kurpas, M., Zadernowska, A., Chajęcka-Wierzchowska, W., Fraqueza, M. J. (2023). A comprehensive virulence and resistance characteristics of Listeria monocytogenes isolated from fish and the fish industry environment. International Journal of Molecular Sciences, 24(4), 3581* mój wkład merytorycznyw jej przygotowanie polegał na: *współudziale w opracowaniu koncepcji manuskryptu, opracowaniu metodyki, wykonaniu analiz, wizualizacji wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.*

Zakrzewski Arkadiusz

(podpis kandydata)

Olsztyn, 19.03.2024
(miejscowość, data)

dr Monika Kurpas
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
technologia żywności i żywienia
Prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:
Zakrzewski, A. J., Kurpas, M., Zadernowska, A., Chajęcka-Wierzchowska, W., Fraqueza, M. J. (2023). A comprehensive virulence and resistance characteristics of Listeria monocytogenes isolated from fish and the fish industry environment. International Journal of Molecular Sciences, 24(4), 3581. https://doi.org/10.3390/ijms24043581,
mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: *współudziale w opracowaniu konceptu pracy, przygotowaniu metodyki oraz współudziale w przeprowadzeniu analiz.*
Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez *Arkadiusza Zakrzewskiego* jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata *Arkadiusza Zakrzewskiego* polegający na *współudziale w opracowaniu koncepcji manuskryptu, opracowaniu metodyki, wykonaniu analiz, wizualizacji wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.*

Monika Kurpas
.....
podpis

Olsztyn, 19.03.2024
(miejscowość, data)

dr hab. inż. Anna Zadernowska, prof. UWM
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
technologia żywności i żywienia
Prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:
Zakrzewski, A. J., Kurpas, M., Zadernowska, A., Chajęcka-Wierzchowska, W., Fraqueza, M. J. (2023). A comprehensive virulence and resistance characteristics of Listeria monocytogenes isolated from fish and the fish industry environment. International Journal of Molecular Sciences, 24(4), 3581. https://doi.org/10.3390/ijms24043581,
mój wkład merytorycznyw jej przygotowanie polegał na: *korekcie pierwotnej wersji manuskryptu, koordynowaniu prac laboratoryjnych oraz zdobyciu funduszy na realizację prac.*

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez *Arkadiusza Zakrzewskiego* jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata *Arkadiusza Zakrzewskiego* polegający na *współudziale w opracowaniu koncepcji manuskryptu, opracowaniu metodyki, wykonaniu analiz, wizualizacji wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.*

Anna Zadernowska
podpis

Olsztyn, 19.03.2024
(miejscowość, data)

dr inż. Wioleta Chajęcka-Wierzchowska
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
technologia żywności i żywienia
Prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:
Zakrzewski, A. J., Kurpas, M., Zadernowska, A., Chajęcka-Wierzchowska, W., Fraqueza, M. J. (2023). A comprehensive virulence and resistance characteristics of Listeria monocytogenes isolated from fish and the fish industry environment. International Journal of Molecular Sciences, 24(4), 3581. https://doi.org/10.3390/ijms24043581,
mój wkład merytorycznyw jej przygotowanie polegał na: *korekcie pierwotnej wersji manuskryptu oraz koordynowaniu prac laboratoryjnych.*

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez *Arkadiusza Zakrzewskiego* jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata *Arkadiusza Zakrzewskiego* polegający na *współudziale w opracowaniu koncepcji manuskryptu, opracowaniu metodyki, wykonaniu analiz, wizualizacji wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.*

.....
podpis

Lisbon, 20.03.2024
(date)

Prof. Maria João Fraqueza
(name)

Chairperson of the scientific council
nutrition and food technology
Prof Anna Iwaniak
University of Warmia and Mazury in Olsztyn

COAUTHOR's DECLARATION

I hereby declare that in the work entitled:
Zakrzewski, A. J., Kurpas, M., Zadernowska, A., Chajęcka-Wierzchowska, W., Fraqueza, M. J. (2023). A comprehensive virulence and resistance characteristics of Listeria monocytogenes isolated from fish and the fish industry environment. International Journal of Molecular Sciences, 24(4), 3581. https://doi.org/10.3390/ijms24043581,
my substantive contribution to its preparation consisted of: *proofreading the initial version of the manuscript and participating in the editing of the manuscript after the review.*
Concurrently, I consent to the submission of the aforementioned work by *Arkadiusz Zakrzewski* as part of a doctoral dissertation in the form of a thematically coherent collection of scientific articles published in scientific journals.
I declare that the independent and distinguishable part of the aforementioned work demonstrates the individual contribution of the candidate *Arkadiusz Zakrzewski*, consisting of *co-developing the manuscript's concept, developing the methodology, conducting analyses, visualizing results, and participating in the preparation of the preliminary and final versions of the manuscript*.



Załącznik 4

Zakrzewski, A. J., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2022). Ceviche-natural preservative: possibility of microbiota survival and effect on *L. monocytogenes*. *Foods*, 11(6), 860. https://doi.org/10.3390/FOODS11060860

MEiN: 100, IF: 5.2

foods

MDPI

Article

Ceviche-Natural Preservative: Possibility of Microbiota Survival and Effect on *L. monocytogenes*

Arkadiusz Józef Zakrzewski, Wioleta Chajęcka-Wierzchowska and Anna Zadernowska *

Department of Industrial and Food Microbiology, University of Warmia and Mazury, Plac Cieszyński 1, 10-726 Olsztyn, Poland; arkadiusz.zakrzewski@uwm.edu.pl (A.J.Z.); wioleta.chajecka@uwm.edu.pl (W.C.-W.)
* Correspondence: anna.zadernowska@uwm.edu.pl

Abstract: Ceviche is a marinated raw fish dish ready for consumption; it is a part of the cuisine of various countries on the Pacific coast and its preparation may differ among them. Although the process uses the traditional method of food preservation by lowering the pH, the exposure time is very limited, so the aim of the study was to determine the viability of bacteria often isolated from fish after the process of preparing traditional ceviche. For this purpose, the traditional plate method and flow cytometry were used, and for pathogenic *L. monocytogenes* strains, the influence of stress during the preparation of the dish on the pathogenic potential was determined. The study showed that the highest percentage of viable cells was observed in the case of *L. monocytogenes* and remained at the level of 98.54%, slightly less for *L. innocua*, 96.93%. For the remaining species the reduction did not exceed 10%, for *E. faecalis* it was 92.76%, for *S. liqefaciens* 91.44%, *H. alvei* 93.68%. In addition, the study of the antibacterial properties of individual ingredients showed that habanero and coriander did not show any bactericidal effect, while for onions the amount of live cells was 99.11%, and for lime juice 97.26%, Additionally, the study of changes in virulence, antibiotic resistance and gene expression showed that the stress during the preparation of ceviche has different effects depending on the strain and may cause virulence potential increase, levofloxacin and daptomycin minimum inhibiotory concentration increase and some crucial virulence gene expression induction; therefore, it is important to take care of the quality of the products used to prepare the ceviche and accurate pretreatment.

Keywords: ceviche; *Listeria*; *Listeria monocytogenes*; survival

check for updates

Citation: Zakrzewski, A.J.; Chajęcka-Wierzchowska, W.; Zadernowska, A. Ceviche-Natural Preservative: Possibility of Microbiota Survival and Effect on *L. monocytogenes*. *Foods* **2022**, *11*, 860. https://doi.org/10.3390/foods11060860

Academic Editor: Paula Teixeira

Received: 17 February 2022
Accepted: 14 March 2022
Published: 18 March 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Ceviche (or cebiche) is a traditional dish in many Latin American countries; however, it is particularly popular in Peru and Mexico, though, over the years, growing popularity of this dish in restaurants and special events in countries outside Latin America can be observed. Traditionally, it is made from raw fish meat that is marinated in citrus juices for up to 30 min to kill potential pathogens and give the meat a taste and texture similar to cooking. Lime juice (*Citrus aurantifolia*) is one of the most widely used ingredients in its production, regardless of the region in which it is produced. However, depending on where it is made, other citrus juices such as sour orange and weak organic acids such as acetic acid can also be used. These products have been described as effective antibacterial agents due to their dissociation within the bacterial cell into a proton, which ultimately reduces the pH of the cytoplasm, and an anion, which induces metabolic disorders in the acidified cytoplasm [1]. Lime juice has shown antibacterial activity against *Vibrio parahemolyticus* and *Vibrio cholerae* when used on raw shellfish [2,3]. However, the marinating time is important, as the ceviche preparation takes only up to 30 min, which may not be enough time to reduce pathogens and food spoilage bacteria. The pilot studies conducted for the project focused on the food spoilage bacteria order Enterobacterales and showed that the most common genera were *Serratia* spp. and *Hafnia* spp., so they were used in this

study. Additionally, in non-Latin American countries, one of the main threats isolated from fish and seafood is *L. monocytogenes*, which is the causative agent of listeriosis, a serious foodborne illness with a high associated case-fatality rate [4], so the aim of the study was a determination survival of bacteria including food spoilage bacteria; *Serratia* spp. and *H. alvei*, opportunistic pathogens; *Enteroccocus faecalis* and pathogenic *L. monocytogenes* isolated from fish meat using a sensitive method of flow cytometry and the effect that the stress of ceviche preparation may have on *L. monocytogenes*.

2. Materials and Methods

2.1. Bacterial Strains and Culture Methods

Strains isolated from salmon (*Salmo salar*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*) were used in the survival study, including the following: 5 strains belonging to the species *Listeria. monocytogenes*, 5 strains belonging to the species *Listeria innocua*, 5 strains belonging to the species *H. alvei*, 5 strains belonging to the species *Seratia liquefaciens* and 5 strains belonging to the to the species *E.s faecalis* (Table S1). Additionally, twenty *L. monocytogenes* strains were used in the study of changes in the antibiogram in order to increase the number of biological samples (Table S2). All strains used in the study come from the strain collection of the Department of Industrial and Food Microbiology of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn. The strains were kept in microbanks (Biomaxima, Lublin, Poland) at −80 °C until use. Tryptic soy broth (TSB; Merck, Darmstadt, Germany) was used to prepare 24 h bacterial cultures. Aliquots (2 mL) from each overnight culture were added to fresh TSB tubes and incubated for 24 h at 37 °C.

2.2. Ceviche

A ceviche recipe was prepared as follows 680 g of mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*) with coriander (*Coriandrum sativum*) (30.8 g), red onion (*Allium cepa*) (50 g), habanero pepper (*Capsicum chinense*) (6.2 g), marinated together with lime juice (*Citrus aurantifolia*) (236 g) for 30 min.

2.3. A Limited Medium—Fish Flesh Medium

From the need to use a clear medium in cytometric analyses, the medium proposed by Chandrasekaran (1985) [5], with modifications, was prepared. Fresh mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*) fish fillets were washed with distilled water and the meat was then cut into small pieces. One hundred Grams of meat was homogenized with an equal volume of tap water, and another 100 g with 1% NaCl solution. Homogenates were prepared in a volume of 1000 mL and centrifuged (10,000 rpm for 30 min at room temperature (22 ± 2 °C)). The supernatant was mechanically filtered using filters 0.2 µm and stored at refrigeration temperature.

2.4. Flow Cytometry

2.4.1. Flow Cytometer Adjustment

Fluorochrome stock solutions were prepared with accordance to producer instructions by adding SYTO9 (5 mM) and PI (20 mM) in proportion 1:1 to a tube as a working solution. For live (LCS) and dead (DCS) cell suspensions, 1 mL of 24 h bacterial suspension was centrifuged at 10,000× *g* for 5 min and resuspended in 1 mL of PBS for LCS or 1 mL of 70% isopropanol for DCS. Staining was performed by adding 2 mL of LCS or DCS with 6 µL of working solutions. The mixtures were incubated for 15 min at room temperature and read with a flow cytometer (FACSlyric, Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). The excitation laser of the flow cytometer had a wavelength of 488 nm and the fluorescence emissions were collected in the red and green channels. SYTO9-stained LCS and PI-stained DCS were used to locate appropriate bacterial populations and standardize the most appropriate cytometric parameters to avoid interference from emission spectra. Forward scatter, side scatter, and fluorescence were recorded with logarithmic signal amplification. First, the forward and side scatter enhancements were configured, followed by the green fluores-

cence enhancement to detect live bacteria, and finally the red fluorescence enhancement was combined to indicate dead bacteria.

2.4.2. Antibacterial Properties of Ceviche and Ceviche Components

To evaluate antimicrobial properties of ceviche and ceviche components fish flesh medium were used. To use the same proportion as for traditional ceviche, the amount of fish media used were equal to fresh fish ceviche, achieving a pH of 3.2–3.3. Each of the ceviche ingredients was separately combined with the fish flesh media, then homogenized, and filtered with a vacuum pump on 0.2 µm pore size filters. The filtered medium was combined with the previously centrifuged bacterial cultures so that the final concentration was about 6×10^8 cfu/mL. The samples were incubated at 4 °C for 30 min, then the samples were centrifuged for 10 min at 10,000× *g*, the supernatant was removed, and 1 mL of PBS was added. Then, steps from the flow cytometer adjustment section were followed.

2.5. Bacterial Total Count

Samples (10 g) of ceviche (time = 0 and time = 30 min) were aseptically taken and homogenized in stomacher (Masticator Homogenizator, IUL S.A., Barcelona, Spain) with 90 mL NaCl solution (9 g/L). The homogenate was serially diluted, and the total viable rate (TVC) was determined by the pore plate method using Nutrient Agar (Merck, Darmstadt, Germany). The plates were incubated at 30 °C for 72 h and cfu/g were determinate. Additionally, determination of dominant morphological colonies was performed. For this purpose, the 10 most frequent colonies (based on morphological characteristic) were selected and then identified using the MALDI-TOF system. Measurements were taken using a VITEK® MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) with acceleration voltage 200 kV, mass range 2–20 kDa, laser frequency 50 Hz, and extraction delay time 200 ns. All mass fingerprints were analyzed by the VITEK® MS v2.0 MALDI-TOF mass spectrometry systemV2.0 research use only (RUO; SARAMIS version 4.13) databases (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

Isolates were tested in duplicate using the direct transfer protocol according to the manufacturers' recommendations. Briefly, the isolates were cultured for 48 h at 30 °C on TSA (Merck, Darmstadt, Germany) than were transferred to the target plate. One microliter of MALDI matrix VitekMS-CHCA (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) (In the case of identification of yeasts, this step was preceded by the addition of 0.5 µL of formic acid) was added to the spots. After crystallization of the matrix solution, the target was loaded into the MALDI-TOF MS, and the analysis was started. The confidence level was determined in percentage.

2.6. Phenotypic and Genotypic Changes

2.6.1. Virulence Potential Changes in a Live Model

Galleria mellonella larvae were infected with *Listeria monocytogenes* (~100 CFU/larvae). The studies were carried out on strains that had previously been subjected to stress related to ceviche preparation. Bacterial inoculums were injected dorsolaterally into the hemocoel of last-instar larvae using a 10 µL disposable Hamilton syringe. After injection, the larvae were incubated at 37 °C. Larvae were considered dead if they did not move when touched. Galleria larvae infused with 0.9% NaCl were a control group [6].

2.6.2. RNA Isolation and Reverse Transcription into cDNA

Total RNA was isolated from the overnight culture (control) and strains subjected to the ceviche preparation process using the Total RNA Mini Plus Kit (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland) and purified and concentrated according to the manufacturer's instructions using the CleanUp RNA Concentrator (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland). RNA integrity of all samples was checked by loading 10 µL RNA into a 1.2% agarose gel in 0.5% TBE buffer and running at 90 V for 1 h. Once the RNA integrity is confirmed by visualizing the two bands (16S and 23S RNA) with little smearing. RNA concentration and purity were

measured optically using a DeNovix DS11 FX spectrophotometer/fluorometer (DeNovix Inc., Wilmington, NC, USA) based on sample absorption at wavelengths of 260 nm and 280 nm. All RNA samples were immediately partially reverse-transcribed and the rest stored at −80 °C. All the RNA samples were normalized to 5 µg/µL and transcribed into the cDNA using the TranScriba kit (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland) for the synthesis of first-strand cDNA. This kit uses recombinant MMLV reverse transcriptase, which has low RNAseH activity at 37–42 °C and optimal DNA polymerase activity. Template RNA was protected with a recombinant RNAse inhibitor. Random sequence hexamer was used as a primer.

2.6.3. Real Time PCR Analysis of Gene Expression

Nine genes were selected for expression evaluation: *cspL*A, *gad*B, *opu*CA, *rpo*E, *fla*A, *inl*A, *mpr*F, *lin* and *fos*X. For each gene, a threshold line and quantitative cycle (Cq) were determined using the Rotor-Gene series software (Qiagen Inc., Montreal, ON, Canada). Genomic DNA standard curves (5 points of dilutions. For each primer pair, amplification efficiency was calculated as E = 10 (−1/slope) [7,8]. The level of gene expression was determined fluorometrically using SYBR green with the RotorGene Q system (Qiagen Inc., Montreal, ON, Canada). Samples were examined for differences in gene expression using relative quantification, in which relevant gene expression is normalized to a housekeeping gene using the mathematical model proposed and reviewed by [7]. A threshold was determined by the software for real-time PCR reactions. Expression ratios equal to or greater than 2 represented a significant increase in gene expression, while expression ratios equal to or less than 0.5 represented a significant decrease in gene expression. Primer sequences for the housekeeping gene 23 S rRNA as well as the virulence-associated genes *gel*E, *asa*1, *esp* and *cyl*L were obtained from Shepard and Gilmore (2002) (Table S3). Gene expression analysis was performed three times. Additionally, three independent real-time PCR reactions were conducted in each replicate. The RGEs detected for each gene and each stress condition were considered significant ($p < 0.05$) on the basis a t-test performed using the RGE of the control as reference.

Real-time PCR reactions was performed in a final volume of 20 µL containing 10 µL of PowerUp SYBR Green MasterMix (ThermoFischer Scientific, Waltham, MA, USA), 1.0 µL of each primer (10 pmol/1 µL) and 5 ng of template cDNA, filled up with ddH_2O to a final volume. The real-time PCR cycling conditions were following 50 °C for 2 min, 95 °C for 2 min and 40 cycles of 15 s at 95 °C, 15 s at temperature adjust for primer set and 60 s at 72 °C. The specificity of the real-time PCR product was checked by the construction of the melting curve by heating in a slow ramp between 60 and 95 °C in increments of 0.5 °C for 5 s.

2.6.4. Antibiotic Susceptibility

The study of changes in susceptibility to antibiotics was carried out on strains from 24 h culture (control) and those subjected to stress related to the preparation of ceviche. VITEK 2 Compact with AST–P643 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) was used to access the antimicrobial susceptibility of the A8-1 to 18 clinical antibiotics, which included benzylpenicillin (Bp, 0.125–64 µg/mL), ampicillin (Amp, 0.25–32 µg/mL), high-level gentamicin (synergistic) (HLG, 500 µg/mL; Gen, 8–64 µg/mL), high-level streptomycin (HLS, 1000 µg/mL), clindamycin (Cli, 0.125–4µg/mL), levofloxacin (Lev, 0.12–8 µg/mL), erythromycin (E, 0.25–8 µg/mL), quinupristin/dalofopine (Qd, 0.25–16 µg/mL), linezolid (Lzd, 0.5–8 µg/mL), vancomycin (VA, 0.5–32 µg/mL), tetracycline (Tet, 1–16 µg/mL), tigecycline (Tgc, 0.12–2 µg/mL), chloramphenicol (C, 4–64 µg/mL), daptomycin (Dap, 0.12–8 µg/mL), Trimethoprim/sulphamethoxazole (SXT, 0.5/9.5–16/304 µg/mL), and nitrofurantoin (F, 16–512 µg/mL). According to the MIC obtained, the results were judged according to Clinical Laboratory Standard Institute criteria (CLSI M100) (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018) and the European Food Safety Authority (EFSA) for

assessment of bacterial resistance to antimicrobials. The study increased the bioassays to 20 to increase the plausibility of the changes (Table S3).

2.7. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using Student's *t*-test and/or the one-way ANOVA for microbial reduction analysis. For transcriptome changes, analyses were performed using two-way ANOVA, for groups of genes. For the analyses, $p \leq 0.05$ was considered significant. The statistical analyses were performed using Prism 8.0.1 (Prism, GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3. Results

As a result of the conducted experiment, it was observed that during the traditional preparation of ceviche, i.e., marinating for 30 min, a statistically significant ($p < 0.05$) reduction in microorganisms were noticed, although the reduction was from 5.2 to 4.4 log cfu/g (Figure 1).

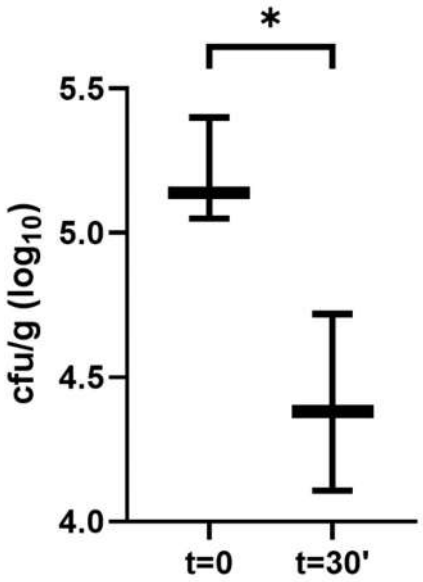


Figure 1. The reduction in viable rate of bacteria during ceviche preparation, *—$p = 0.0182$.

As a result of the experiment, it was observed that 10 morphologically dominant colonies belonged to four species: *Staphylococcus captis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida parapsilosis* and *Carnobacterium divergens*. The results are shown in Table 1.

Table 1. Identification of the most common species after the preparation of ceviche using MALDI-TOF technique.

No.	Species	Identification to Species Level%	Quality of Protein Extraction (Datacount)
1	*S. captis*	91.80–99.90	117–182
2	*S. epidermidis*	99.00	130–158
3	*C. parapsilosis*	99.00	117–132
4	*C. divergens*	75.50–92.00	144–152

In the experiment, it was observed that the traditional use of habanero pepper and coriander did not affect the reduction in bacteria from the species *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *L. innouca*, *S. liqefaciens* and *H. alvei* (Figure 2). In the case of the use of onion, it was observed that *L. monocytogenes* was the most resistant and the number of viable cells remained at 99.93% after 30 min. The species *S. liqefaciens* 98.31% were the most sensitive to the use

of the onion. Of the four ingredients used, lime juice was the most effective against all bacteria. Again, the most sensitive bacteria were *S. liqefaciens* (95.67% of live cells), while the most resistant ones were *Listeria* sp., 99.57% of live *L. monocytogenes* cells and 99.69% of live *L. innocua* cells.

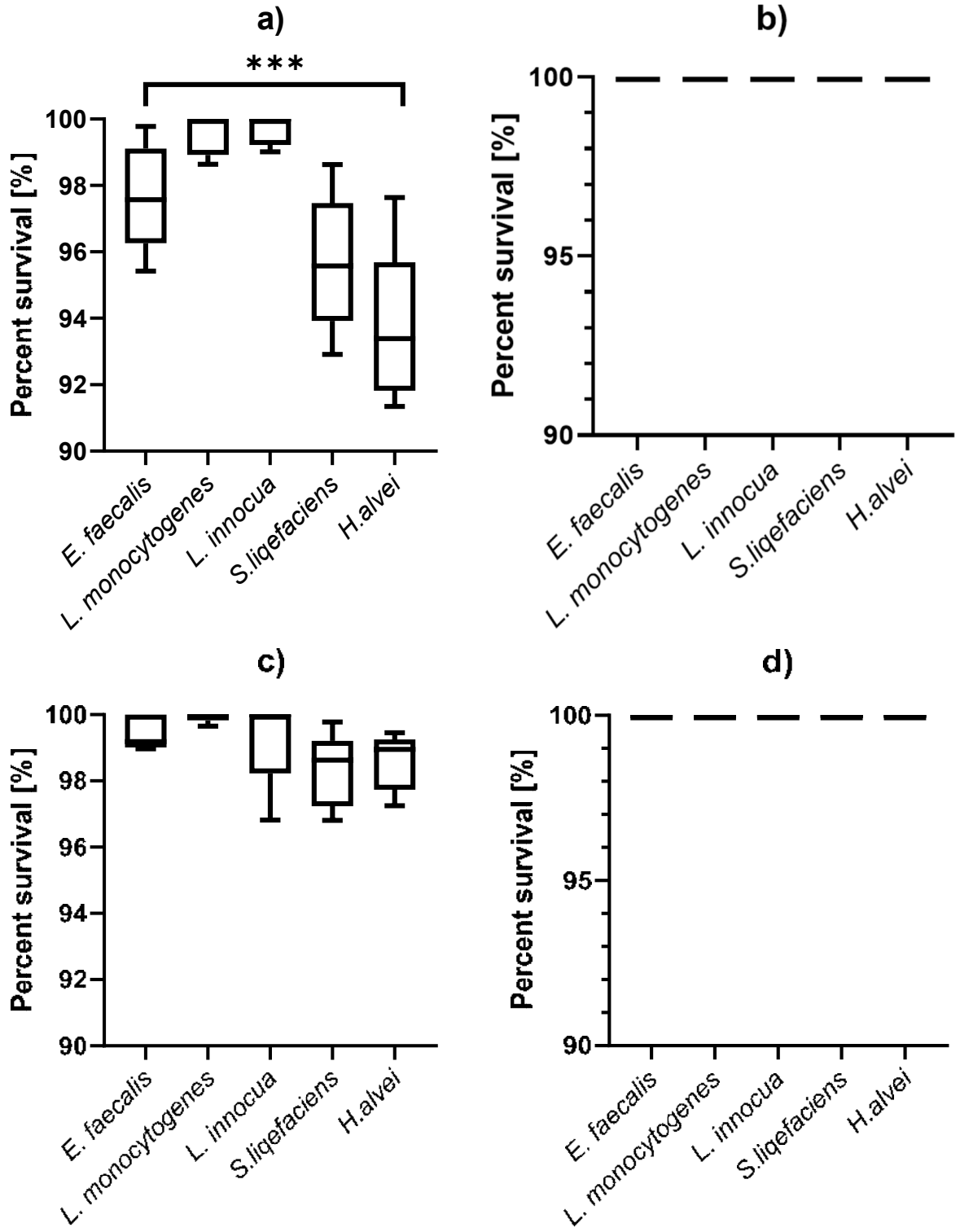


Figure 2. Reduction in the number of live cells of selected species by individual ceviche components: (**a**) lime (23.5%), (**b**) habanero (0.6%), (**c**) onion (5%), (**d**) coriander (3%), ***—$p < 0.0001$.

The study of microbial reduction during the preparation of ceviche has proven that the complex action of many components is more effective than the action of individual components (Figures 2 and 3). The highest percentage of viable cells was observed in the case of *L. monocytogenes* and remained at the level of 98.54%, slightly less for *L. innocua* bacteria—96.93%. For the remaining species the reduction did not exceed 10%, for *E. faecalis* it was 92.76%, for *S. liqefaciens* 91.44%, *H. alvei* 93.68%.

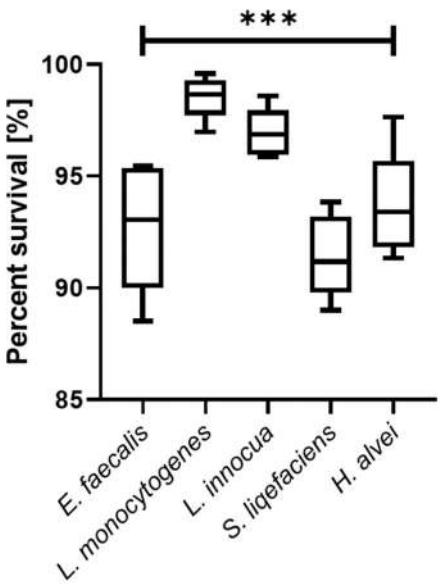


Figure 3. Reduction in the number of live cells of selected species of bacteria during the preparation of ceviche, ***—$p < 0.0001$.

In the conducted experiment on a live model using *Galleria mollonella* larvae, it was observed that the results from the control sample and from the process of preparing the ceviche differ statistically significantly ($p < 0.05$) (Figure 4). Only one strain (109) was more virulent after the ceviche preparation process than before. In the case of the remaining strains, a significant decrease in mortality among larvae was observed. The most drastic change was observed for strain 118, where the death of each infected larva after 48 h was recorded, while 60% of the larvae were still alive after 168 h of onion preparation.

In the conducted study, the expression of selected genes for two serotypes of *L. monocytogenes* 1/2a and 1/2c was tested. The results of the research showed that for the expression of genes from each group, higher results were obtained for serotype 1/2a. Comparing genes related directly or indirectly to virulence, it was observed that significantly overexpression was noticeable for the *inl*A gene, the stress induced by ceviche preparation did not noticeably affect the relative expression of the *fla*A gene responsible for movement. Expression of the stress response genes indicated that the highest expression value, 1.17 for serotype 1/2a and 1.16 for serotype 1/2c, was observed for the *csp*L gene. For the remaining genes: *gad*B, *opu*CA and *rpo*E, in the case of 1/2c, underexpression was observed with the results of 0.93, 0.51 and 0.19, respectively. For the serotype 1/2a, these values were slightly higher and amounted to 1.06 for *gad*B and *rop*E and 0.37 for *opu*CA.

For the antibiotic resistance genes, it was shown that for the serotype 1/2a, the *fosX* and *mpr* genes were overexpressed during the stress associated with ceviche preparation, while underexpression was observed for the *lin* gene responsible for lincomycin resistance. For serotype 1/2c, underexpression occurred with every gene (Figure 5).

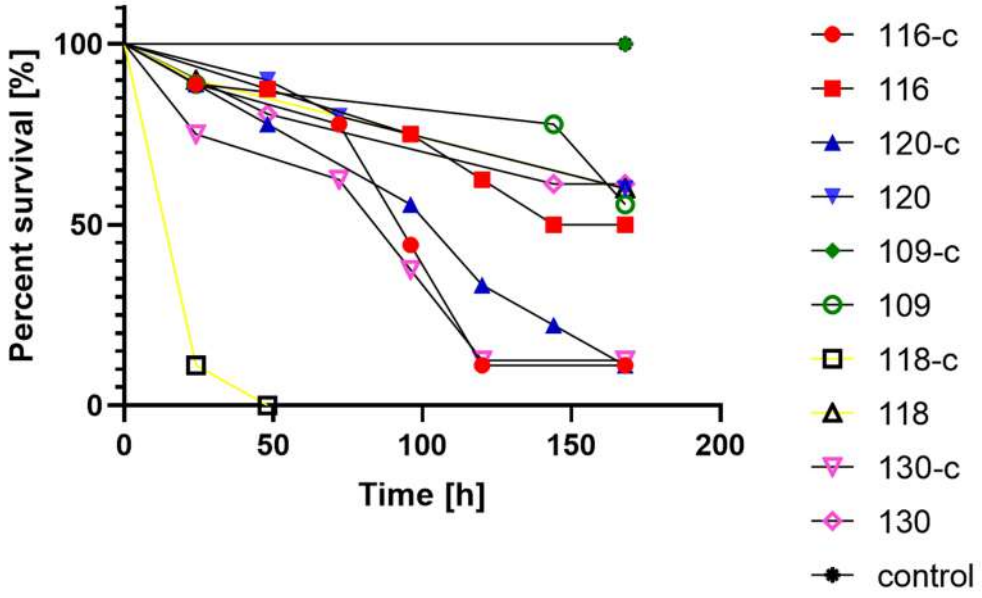


Figure 4. Survival curves of *G. mollonella* larvae injected with *L. monocytogenes*; c—ceviche.

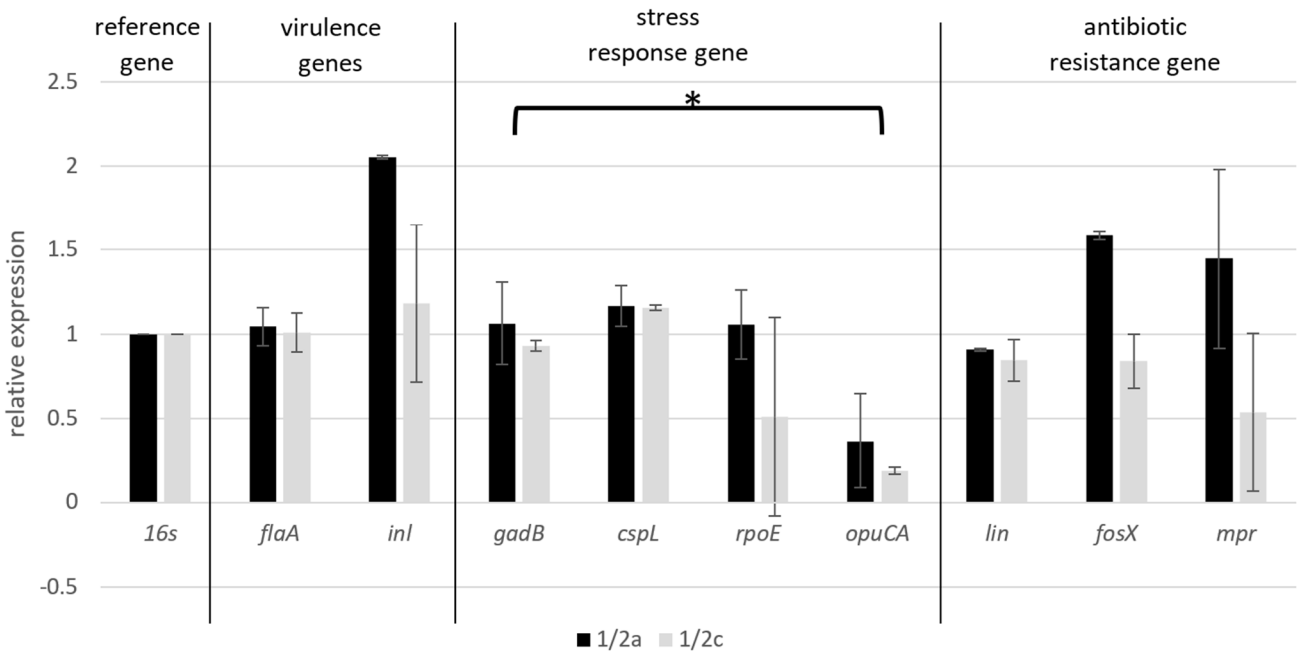


Figure 5. Relative expression of selected *L. monocytogenes* strains, *—p = 0.0393.

As a result of the conducted research, it was shown that out of 18 tested antibiotics, among 11, no changes caused by stress related to the preparation of ceviche were observed (Figure 6). Changes for the largest number of strains were observed in the case of nitrofurantoin, for which the stressor caused a decrease in the MIC value for most of the strains. For levofloxacin, the MIC value increased for as many as six strains, while for four strains it increased. The greatest decrease was observed in the case of nitrofurantoin and chloramphenicol, which, for some whispers, was three times lower than in the case of optimal conditions. In contrast, the greatest increase in MIC values was observed with daptomycin (five-fold increase).

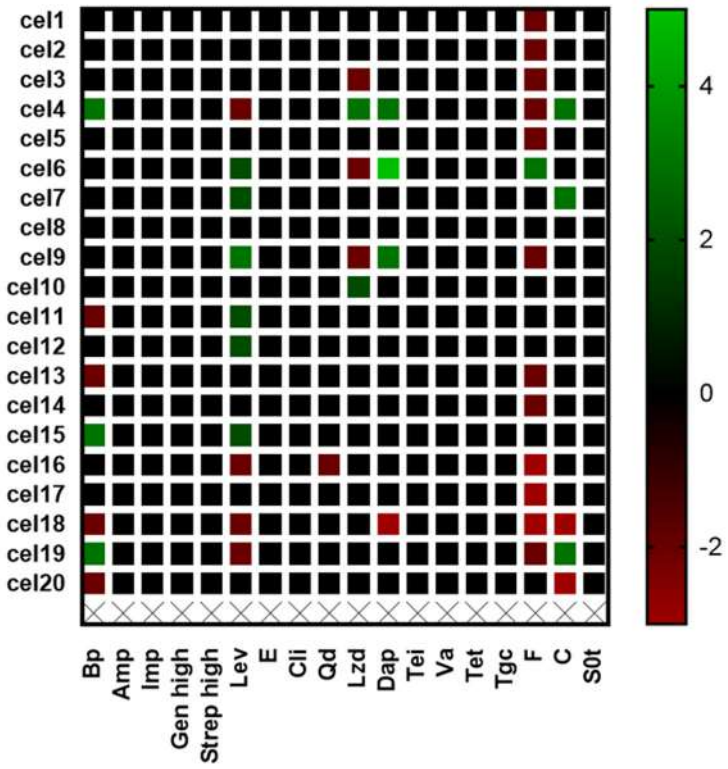


Figure 6. Antibiogram changes after ceviche preparation among *L. monocytogenes* strains; benzypenicillin (Bp), ampicillin (Amp), high-level gentamicin (Gen High), high-level streptomycin (Strep High), clindamycin (Cli), levofloxacin (Lev), erythromycin (E), quinupristin/dalofopine (Qd), linezolid (Lzd), vancomycin (Va), tetracycline (Tet), tigecycline (Tgc), chloramphenicol (C), daptomycin (Dap), Trimethoprim/sulphamethoxazole (Sxt), and nitrofurantoin (F).

4. Discussion

An experiment was carried out to determine the viability of bacteria often isolated from fish—*Listeria* sp., *E. faecalis*, *H. alvei* and *S. liqefaciens*—in the preparation of a traditional Peruvian ceviche. As a result of the experiment, it was proved that despite the combination of several components with the potential antibacterial effect, no significant decrease in viability was observed in any of the tested microorganisms. Although the preparation of ceviche is an effective method to reduce, but not eliminate, bacteria of the genus *Vibrio*, in the case of other microorganisms there is no significant decrease in the number of viable cells [9]. In a study conducted by Mathur et al. on the effects of lime juice, the main antibacterial agent in ceviche, the reduction in Gram-negative bacteria of the genus *Salmonell*a was shown to be as low as 0.5log cfu/g [9]. In our study, although the bacteria of the species *S. liquefaciens* were the most sensitive to the components of ceviche, the reduction was only 10%, it may additionally explain the frequent occurrence of even Gram-negative bacteria in sold RTE ceviche [10].

Identification of the dominant species has shown that *S. captis*, *S.s epidermidis*, *C. parapsilosis* and *C. divergens* are among them. The research results are in line with those obtained by Ramírez-Martínez et al., in which they examined the microbiota of ceviche products; due to the metagenome study usage, researchers were able to assess the microbiome much more accurately [4]. Among the genera overlapping with the researchers is the genus *Staphylococcu*s belonging to the phylum *Firmicutes*, although the researchers did not specify the species. Additionally, *C. divergens* belongs to the same *Firmicutes* phylium. Eukaryotic types have not been determined.

Aromatic plants and spices such as Umbelliferae/Umbelliferae coriander (*C. sativum* L.) contain biologically active compounds with antibacterial, antifungal and antioxidant properties and are widely used in the pharmaceutical and food processing industries.

Coriander is a bare aromatic herbaceous annual plant with a long culinary history and serves as a source of fragrances and essential oils, and those are usually considered as affective against variety of microorganisms.

In research conducted by Kačániová et al. [11] it was shown that the main volatile compounds of coriander essential oil were β-linalool 66.07%, camphor tree 8.34%, geranyl acetate 6.91% and cymene 6.35% and expressed the strongest antibacterial activity against *B. subtilis* followed by *S. maltophilia* and *P. expansum.* However, research on coriander extracts showed that it has poor or non-antimicrobial properties [12–14], which was also proven in our research, although a more sensitive method of antimicrobial activity was performed.

As in the case of aromatic plants, habanero peppers also have an antibacterial potential, while capsaicin and its derivatives are characterized by high MIC values of 512 mg/L against most Gram-negative bacteria, including *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae,* and *Proteus* species and shows a slightly lower MIC value for Gram-positive including various methicillin-resistant bacteria. A minimum MIC of 128 mg/L was determined for capsaicin against *Bacillus subtilis* [15]. Although habanero pepper extracts may contain as much as 5.88 mg/mL of capsaicin, its amount and very short exposure time do not affect the viability of bacterial cells.

While testing the individual components of ceviche, onion resulted in a slight reduction in the number of viable cells, ranging from 98.31% for *S. liqefaciens* to 99.93% for *L. monocytogenes*. There are numerous reports of the antibacterial effects of onions. Ramos et al. [16] examined onion waste containing dried onions as the main component and excellent antibacterial and antioxidant properties were observed. In addition, high antibacterial activity of onion skin waste extract against *E. coli, P. fluorescens, B. cereus*, and the fungi *Aspergillus niger, Trichoderma viride*, *Penicillium cyclopium* was observed [17]. It has been reported that onion excretion contains a large amount of phenol and flavonoids, mainly quercetin, which has high antibacterial activity [18].

In our experiment, it was determined whether the preparation of ceviche can influence the virulence expressed phenotypically in the model using *G. mollonella* larvae, and the results showed that only one *L. monocytogenes* strain was observed to be more virulent after preparing the ceviche than in the control. This can be explained by sudden and short-term stress, as there are reports explaining that the greatest changes in the transcriptome of genes responsible for virulence are observed after prolonged exposure to the stress factor which is lowering the pH. [19,20]. Li et al., using *G. mollonella* larvae to study the virulence of *L. monocytogenes* exposed to organic acids, proved that the action of the stress factor causes an increase in the pathogenic potential for a long time; however, those are still strain-dependent features [20–22].

The main stressor in the preparation of ceviche is the lowered pH. This stress contributes to the upregulated gene expression associated with acid stress. In the case of *L. monocytogenes*, several decarboxylation systems are responsible for survival [23]. These decarboxylation systems include the glutamate decarboxylase (GAD) and the arginine decarboxylase (ADI) systems. The GAD system comprises three homologous glutamate decarboxylases, GadD1, GadD2, and GadD3 and two antiporters GadT1 and GadT2, encoded at three distinct genetic loci [24,25]. In this study, the expression of one of the genes encoding GAD was investigated and it was observed that overexpression occurs only in serotype 1/2a, while resistance to low pH in serotype 1/2c may be related to the ADI system, which consists of three enzymes and one membrane bound transporter: arginine deiminase (ArcA), catabolic ornithine carbamoyltransferase (ArcB, also known as AguB), carbamate kinase (ArcC, also known as AguC), and the arginine/ornithine antiporter ArcD [26]. The action of stressors may also influence the expression of other genes, including virulence genes. There is ample evidence that high osmolarity, bile, acid, ethanol, blood increase the virulence potential of *L. monocytogenes* strains [26]. The study examined the effect of lowering the pH during the preparation of ceviche on the *inl* and *fla*A genes and observed significant expression induction for serotype 1/2a.

L. monocytogenes strains are generally susceptible to a wide range of antibiotics, occasionally antibiotic resistant *L. monocytogenes* strains have been observed. The first multidrug-resistant strain of *L. monocytogenes* was reported in 1988 by Poyart-Salmeron et al. (1990) [27]. This is confirmed by the characteristics of the *L. monocytogenes* strains used in our study, which were mainly resistant to two antibiotics, daptomycin and nitrofurnantoin. The stress of ceviche preparation resulted in changes, especially with nitrofurantoin and chlorpahonicol, where a decrease in MIC was observed, and doptamycin, with the greatest increase. In a study of the impact of stress associated with the food industry and cooking, Al-Nabulsi et al. only observed a positive trend, an increase in MIC values during acid stress [28,29]. Results obtained by McMahon et al. showed that NaCl or acid stress on *E. coli* and *S. aureus* cells were more resistant (4-fold) to the antibiotics tested than control cells. On the other hand, *S. Typhimurium* cells stressed after NaCl or acid stress were comparable to or less resistant to unstressed cells. The differences in the research may result from the use of *L. monocytogenes* by the authors of the stocks, after a minimum of 1 day after stress (about 10 generations of cells). These can vary considerably between stalks and serogroups. The changed antibiotic resistance observed in this study is possibly linked to the reduction in cell wall antibiotic binding sites, the amplification of genes involved in the synthesis and manipulation of excretion pumps, and the induction of stress shock proteins [30].

5. Conclusions

The conducted study allowed us to determine that despite the fact that almost all of the components in ceviche preparation have bactericidal potential, the use of fresh ingredients and a short exposure time to these ingredients is not effective in reducing *L. monocytogenes* and other bacteria that are commonly isolated from fish meat. Therefore, it is important to ensure the quality and accurate pretreatment of the products used to prepare the ceviche, as the stress associated with bacteria may contribute to negative changes of the strains.

Supplementary Materials: The following are available online at https://www.mdpi.com/article/10.3390/foods11060860/s1, Table S1: Strains used in study, Table S2: Antibiogram of L, monocytogenes strains used in study, Table S3: RT-qPCR oligonucleotide primers used in this study.

Author Contributions: Conceptualization, A.J.Z.; methodology, A.J.Z.; validation, W.C.-W. and A.Z.; investigation, A.J.Z., W.C.-W. and A.Z.; writing—original draft preparation A.J.Z. writing—review and editing, W.C.-W. and A.Z.; funding acquisition, A.J.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by The Ministry of Science and Higher Education of Poland (agreement number: 0130/DIA/2018/47) under the project 'Diamentowy Grant' (project number DI 2017013047).

Institutional Review Board Statement: Ethical review and approval were waived for this study, due to fact that class Insecta do not require any ethical approval.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The dataset used during this study is the available form given author upon reasonable request.

Acknowledgments: I would like to thank Mateusz Prusak, Zuzanna Wasilewska and Filip Misiewicz for their efficient support to obtain survival results.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Hirshfield, I.N.; Terzulli, S.; O'Byrne, C. Weak organic acids: A panoply of effects on bacteria. *Sci. Prog.* **2003**, *86*, 245–269. [CrossRef] [PubMed]
2. Ramírez-Martínez, M.E.; Rodríguez-Castillejos, G.C.; Hernández-Jiménez, M.C.; Ramírez-Quintanilla, L.Y.; Siller-López, F.; Acosta-Cruz, E.; Martínez-Montoya, H. Analysis of microbial diversity in raw fish ceviche. *bioRxiv* **2020**. [CrossRef]

3. Tomotake, H.; Koga, T.; Yamato, M.; Kassu, A.; Ota, F. Antibacterial activity of citrus fruit juices against Vibrio species. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **2006**, *52*, 157–160. [CrossRef]
4. Farber, J.M.; Zwietering, M.; Wiedmann, M.; Hedberg, C.W.; Harrison, M.A.; Hartnett, E.; Chapman, B.; Donnelly, C.W.; Goodburn, K.E.; Gummalla, S. NC-ND license Alternative approaches to the risk management of Listeria monocytogenes in low risk foods. *Food Control* **2021**, *123*, 107601. [CrossRef]
5. Chandrasekaran, M.; Lakshmanaperumalsamy, P.; Chandramohan, D. Fish flesh agar medium — a suitable experimental medium for the detection of spoilage bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **1985**, *51*, 219–225. [CrossRef]
6. Rakic Martinez, M.; Wiedmann, M.; Ferguson, M.; Datta, A.R. Assessment of Listeria monocytogenes virulence in the Galleria mellonella insect larvae model. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0184557. [CrossRef]
7. Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, E45. [CrossRef]
8. Rasmussen, R. Quantification on the LightCycler. *Rapid Cycle Real-Time PCR* **2001**, 21–34. [CrossRef]
9. Mathur, P.; Schaffner, D.W. Effect of Lime Juice on Vibrio parahaemolyticus and Salmonella enterica Inactivation during the Preparation of the Raw Fish Dish Ceviche. *J. Food Prot.* **2013**, *76*, 1027–1030. [CrossRef]
10. Castillo, A.; Villarruel-López, A.; Navarro-Hidalgo, V.; Martínez-González, N.E.; Torres-Vitela, M.R. Salmonella and Shigella in freshly squeezed orange juice, fresh oranges, and wiping cloths collected from public markets and street booths in Guadalajara, Mexico: Incidence and comparison of analytical routes. *J. Food Prot.* **2006**, *69*, 2595–2599. [CrossRef]
11. Kačániová, M.; Galovičová, L.; Ivanišová, E.; Vukovic, N.L.; Štefániková, J.; Valková, V.; Borotová, P.; Žiarovská, J.; Terentjeva, M.; Felšöciová, S.; et al. Antioxidant, Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Coriander (*Coriandrum sativum* L.) Essential Oil for Its Application in Foods. *Foods* **2020**, *9*, 282. [CrossRef]
12. Oudah, I.M.; Ali, Y.H. Evaluation of Aqueous and Ethanolic Extraction for Coriander Seeds, Leaves and Stems and Studying their Antibacterial Activity. *Iraqi Natl. J. Nurs. Spec.* **2010**. Available online: https://www.iasj.net/iasj/download/d470991fab885f2e (accessed on 16 February 2022).
13. Srikumar, R.; Jeya Parthasarathy, N.; Shankar, E.M.; Manikandan, S.; Vijayakumar, R.; Thangaraj, R.; Vijayananth, K.; Sheeladevi, R.; Rao, U.A. Evaluation of the growth inhibitory activities of Triphala against common bacterial isolates from HIV infected patients. *Phyther. Res.* **2007**, *21*, 476–480. [CrossRef] [PubMed]
14. Ateş, D.; Erdoğrul, Ö. Antimicrobial Activities of Various Medicinal and Commercial Plant Extracts. *Turk. J. Biol.* **2003**, *27*, 157–162.
15. Oyedemi, B.O.; Kotsia, E.M.; Stapleton, P.D.; Gibbons, S. Capsaicin and gingerol analogues inhibit the growth of efflux-multidrug resistant bacteria and R-plasmids conjugal transfer. *J. Ethnopharmacol.* **2019**, *245*, 111871. [CrossRef] [PubMed]
16. Ramos, F.A.; Takaishi, Y.; Shirotori, M.; Kawaguchi, Y.; Tsuchiya, K.; Shibata, H.; Higuti, T.; Tadokoro, T.; Takeuchi, M. Antibacterial and Antioxidant Activities of Quercetin Oxidation Products from Yellow Onion (Allium cepa) Skin. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 3551–3557. [CrossRef]
17. Singh, V.; Krishan, P.; Shri, R. Extraction of antioxidant phytoconstituents from onion waste. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **2017**, *6*, 502–505.
18. Santas, J.; Almajano, M.P.; Carbó, R. Antimicrobial and antioxidant activity of crude onion (*Allium cepa*, L.) extracts. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2010**, *45*, 403–409. [CrossRef]
19. Makariti, I.P.; Printezi, A.; Kapetanakou, A.E.; Zeaki, N.; Skandamis, P.N. Investigating boundaries of survival, growth and expression of genes associated with stress and virulence of Listeria monocytogenes in response to acid and osmotic stress. *Food Microbiol.* **2015**, *45*, 231–244. [CrossRef]
20. Neuhaus, K.; Satorhelyi, P.; Schauer, K.; Scherer, S.; Fuchs, T.M. Acid shock of Listeria monocytogenes at low environmental temperatures induces prfA, epithelial cell invasion, and lethality towards Caenorhabditis elegans. *BMC Genom.* **2013**, *14*, 285. [CrossRef]
21. Li, M.; Carpenter, C.E.; Broadbent, J.R. Organic Acid Exposure Enhances Virulence in Some Listeria monocytogenes Strains Using the Galleria mellonella Infection Model. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 1874. [CrossRef] [PubMed]
22. Zakrzewski, A.J.; Chajęcka-Wierzchowska, W.; Zadernowska, A.; Podlasz, P. Virulence characterization of Listeria monocytogenes, Listeria innocua, and Listeria welshimeri isolated from fish and shrimp using in vivo early zebrafish larvae models and molecular study. *Pathogens* **2020**, *9*, 1028. [CrossRef] [PubMed]
23. Arcari, T.; Feger, M.L.; Guerreiro, D.N.; Wu, J.; O'byrne, C.P. Comparative Review of the Responses of Listeria monocytogenes and Escherichia coli to Low pH Stress. *Genes* **2020**, *11*, 1330. [CrossRef] [PubMed]
24. Chen, J.; Cheng, C.; Xia, Y.; Zhao, H.; Fang, C.; Shan, Y.; Wu, B.; Fang, W. Lmo0036, an ornithine and putrescine carbamoyltransferase in Listeria monocytogenes, participates in arginine deiminase and agmatine deiminase pathways and mediates acid tolerance. *Microbiology* **2011**, *157*, 3150–3161. [CrossRef] [PubMed]
25. Ryan, S.; Begley, M.; Gahan, C.G.M.; Hill, C. Molecular characterization of the arginine deiminase system in Listeria monocytogenes: Regulation and role in acid tolerance. *Environ. Microbiol.* **2009**, *11*, 432–445. [CrossRef]
26. Soutourina, O.; Chabelskaya, S.; Chaturongakul, S.; Krawczyk-Balska, A.; Ładziak, M.; Burmistrz, M.; Scibek, K.; Kallipolitis, B.H. RNA-Mediated Control in Listeria monocytogenes: Insights into Regulatory Mechanisms and Roles in Metabolism and Virulence. *Front Microbiol.* **2021**, *12*, 622829. [CrossRef]
27. Chen, M.; Wu, Q.; Zhang, J.; Wu, S.; Guo, W. Prevalence, enumeration, and pheno- and genotypic characteristics of Listeria monocytogenes isolated from raw foods in South China. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1026. [CrossRef]

28. Al-Nabulsi, A.A.; Osaili, T.M.; Shaker, R.R.; Olaimat, A.N.; Jaradat, Z.W.; Zain Elabedeen, N.A.; Holley, R.A. Effects of osmotic pressure, acid, or cold stresses on antibiotic susceptibility of Listeria monocytogenes. *Food Microbiol.* **2015**, *46*, 154–160. [CrossRef]
29. Komora, N.; Bruschi, C.; Magalhães, R.; Ferreira, V.; Teixeira, P. Survival of Listeria monocytogenes with different antibiotic resistance patterns to food-associated stresses. *Int. J. Food Microbiol.* **2017**, *245*, 79–87. [CrossRef]
30. McMahon, M.A.S.; Xu, J.; Moore, J.E.; Blair, I.S.; McDowell, D.A. Environmental stress and antibiotic resistance in food-related pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 211–217. [CrossRef]

Olsztyn, 26.03.2024
(miejscowość, data)

mgr inż. Arkadiusz Zakrzewski
(imię i nazwisko kandydata)
Technologia żywności i żywienia
(dyscyplina naukowa)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
technologii żywności i żywienia
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak

OŚWIADCZENIE

autora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że w pracy pod tytułem: *Zakrzewski, A. J., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2022). Ceviche-natural preservative: possibility of microbiota survival and effect on L. monocytogenes. Foods, 11(6), 860* mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: *współudziale w opracowaniu koncepcji manuskryptu, opracowaniu metodyki, wykonaniu analiz, wizualizacji wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.*

Zakrzewski Arkadiusz

(podpis kandydata)

Olsztyn,

19.03.2024

(miejscowość, data)

dr inż. Wioleta Chajęcka-Wierzchowska
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
technologia żywności i żywienia
Prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:
Zakrzewski, A. J., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2022). Ceviche-natural preservative: possibility of microbiota survival and effect on L. monocytogenes. Foods, 11(6), 860. https://doi.org/10.3390/FOODS11060860
mój wkład merytorycznyw jej przygotowanie polegał na: *korekcie pierwotnej wersji manuskryptu, koordynowaniu i współudziale w pracach laboratoryjnych nad badaniem wirulencji.*

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez *Arkadiusza Zakrzewskiego* jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata *Arkadiusza Zakrzewskiego* polegający na *współudziale w opracowaniu koncepcji manuskryptu, opracowaniu metodyki, wykonaniu analiz, wizualizacji wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.*

.....
podpis

Olsztyn, 19.03.2024

(miejscowość, data)

dr hab. inż. Anna Zadernowska, prof. UWM
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
technologia żywności i żywienia
Prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:
Zakrzewski, A. J., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2022). Ceviche-natural preservative: possibility of microbiota survival and effect on L. monocytogenes. Foods, 11(6), 860. https://doi.org/10.3390/FOODS11060860
mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: *korekcie pierwotnej wersji manuskryptu, koordynowaniu i współudziale w pracach laboratoryjnych nad badaniem wirulencji.*

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez *Arkadiusza Zakrzewskiego* jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata *Arkadiusza Zakrzewskiego* polegający na *współudziale w opracowaniu koncepcji manuskryptu, opracowaniu metodyki, wykonaniu analiz, wizualizacji wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.*

Anna Zadernowska
podpis

Załącznik 5

Zakrzewski, A., Gajewska, J., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2023). Effect of sous vide processing of fish on the virulence and antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes*. *NFS Journal*, 31, 155–161. https://doi.org/10.1016/J.NFS.2023.05.003
MEiN: 140, IF: 0.663

NFS Journal 31 (2023) 155–161

Contents lists available at ScienceDirect

NFS Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/nfs

Effect of sous-vide processing of fish on the virulence and antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes*

Arkadiusz Zakrzewski *, Joanna Gajewska, Wioleta Chajęcka-Wierzchowska, Anna Zadernowska

Department of Industrial and Food Microbiology, Faculty of Food Science, University of Warmia and Mazury, Plac Cieszyński 1, 10-726 Olsztyn, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:
Sous-vide
Listeria
Listeria monocytogenes
Fish
Virulence

ABSTRACT

Sous-vide is a cooking technique which is considered safe for food preparation, however, the recommended temperatures and times for preparing seafood and fish may not be sufficient to ensure safety, and additionally, thermal stress may cause changes in virulence and resistance. The objective of the present investigation was to determine the reduction of *Listeria monocytogenes* isolated from fish after sous-vide preparation. For this purpose flow cytometry was used. The impact of stress during the preparation of the fish-based dish using the sous-vide technique on the virulence potential and resistance profile was determined geno- and phenotypically. The study was conducted at four different temperatures, that are typical for fish preparation (42, 52, 57 and 60 °C) showing that none of them could be effective against L. *monocytogenes*. In addition, the investigation of changes in the virulence, phenotypic antibiotic resistance and gene expression showed that the stress during the preparation of sous-vide decrease virulence potential of the L. *monocytogenes* strains. It was observed that the greatest changes in antibiotic resistance profile were noted for tetracycline and notable changes were also observed for some strains in the case of fosfomycin and ciprofloxacin. Therefore it is important not to consider the sous-vide method as ensuring the microbiological quality of products, especially those with high contamination levels, and choose products of the best quality for processing.

1. Introduction

Listeria monocytogenes is one of the major human pathogens and it is primarily transmitted through the consumption of contaminated food including dairy, meat products, fish and seafood [1,2]. Invasive listeriosis is rare, with approximately >2000 cases reported annually in Europe [3]. Listeriosis can have severe symptoms such as bacteremia and neurolisteriosis causing high mortality <30% in those with compromised immunity including the elderly and newborns [4].

Sous-vide is a cooking technique in which raw food is sealed in a heat-stable vacuum bag and cooked in a water bath at a precise temperature and time. Sous-vide by definition utilizes the concept of low-temperature long-time (LTLT) cooking. The temperature range for the sous-vide is between 65 and 95 °C. Due to the improved sensory quality and increased nutrient preservation, it is becoming more and more popular than conventional heat treatment (boiling, roasting, frying and steaming) [5].

Due to the high water activity and neutral pH, fish and seafood are among the fastest perishable foods, which makes them ideal for the development of spoilage and growth of pathogenic bacteria. Their shelf life of them is limited and also due to high amounts of free amino acids vulnerable to oxidation [6]. However, oxidation and off-flavour caused by this are inhibited by the vacuum packaging used in sous-vide technology. Seafood that has been cooked sous-vide has a longer shelf life than seafood cooked in a traditional manner. Following the heating treatment, the initial microbiome of the food may be reduced, however, recommended temperatures for processing fish and seafood are often much lower than those mentioned by definition, therefore, this treatment may be ineffective in controlling microorganisms.

There are many publications specifying the reduction of microorganisms, this work was conducted in response to the need to understand the influence of sous-vide processing on resistance and virulence of L. *monocytogenes*. The objectives of this study were to 1) evaluate the number of dead cells of L. *monocytogenes* during sous-vide processing; 2) examine virulence potential changes among L. *monocytogenes* strains after processing; 3) test phenotypic and genotypic antibiotic resistance

* Corresponding author.
E-mail address: arkadiusz.zakrzewski@uwm.edu.pl (A. Zakrzewski).

https://doi.org/10.1016/j.nfs.2023.05.003
Received 10 March 2023; Received in revised form 2 May 2023; Accepted 12 May 2023
Available online 13 May 2023
2352-3646/© 2023 University of Warmia and Mazury in Olsztyn. Published by Elsevier GmbH on behalf of Society of Nutrition and Food Science e.V. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

changes among L. *monocytogenes* strains after sous-vide processing.

2. Methods

2.1. Strains and culture methods used in this study

Four L. *monocytogenes* strains isolated from salmon (*Salmo salar*) and fish processing plants were used in this study (Table 1). All strains are a part of the strain collection of the Department of Industrial and Food Microbiology of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn. Before usage, the isolates were stored at −80 °C in microbanks (Biomaxima, Lublin, Poland). The Tryptic Soy Broth (TSB; Merck, Darmstadt, Germany) was utilized to cultivate microorganisms for 24 h. For further investigation, 2 mL of each overnight cultures was transferred to the TSB broth and incubated at 37 °C for 24 h.A characterisation description of the strains in detail was published in our previous paper [7].

2.2. A limited broth consisting of fish flesh

In response to the need for a clear broth in cytometric analyses, a modified version of the broth proposed by Chandrasekaran [8] was developed. The fillets of fresh trout (*Oncorhynchus mykiss*) were rinsed with distilled water and cut. One hundred grams of trout was homogenized with an equal volume of potable water and a NaCl solution (1%). The prepared homogenates were centrifuged at 10,000 rpm for 30 min at ambient temperature. Finally, the supernatant was mechanically filtered using 0.2 mm filter and cooled to 4 °C before use.

2.2.1. Flow cytometer adjustment

A flow cytometer was adjusted as described in our previous work [8]. Shortly fluorochrome stock solutions were prepared in proportion 1:1 of SYTO®9 (5 mM) and PI (20 mM). Staining of live (24 h culture) and dead (killed with 70% isopropanol) cells was performed by a combination of culture with working solutions in proportion 333:1. The solutions were kept at room temperature for 15 min and analyzed with a flow cytometer (FACSlyric, Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). The flow cytometer's excitation laser had a wavelength of 488 nm, and the red and green channels were used to capture fluorescence emissions. Two solutions with SYTO®9 - or PI-stained bacteria were utilized for identification of live and dead populations and for calibration of the most suitable cytometric parameters to prevent interference from emission spectra. Logarithmic signal amplification was used to capture forward scatter, side scatter, and fluorescence.

2.2.2. L. monocytogenes survival during sous-vide preparation

To evaluate bacterial survival during the sous-vide process, fish flesh broth was used. The filtered broth was combined with the previously centrifuged 24-h cultures so that the final concentration was about 6×10^3 CFU/mL. Then, the samples were sealed in a PP bags and processed at four different temperatures: 42, 52, 57 and 60 °C for 60 min at 10 min intervals in a sous-vide device (Hendi 225,264, Germany). Samples were then cooled down in a shock cooler (Atitila ATT05, Italy) then the samples were centrifuged for 10 min at 10,000 g, the supernatant was removed and 1 mL PBS was added. Similar approaches have been used previously in the flow cytometer adjustment section.

2.3. Effect of sous-vide processing on the virulence and antibiotic resistance of Listeria monocytogenes

Based on the results obtained during the survival analysis, further tests were carried out for the highest tested temperature (60 °C) in the finished product, i.e. after full processing (60 min).

2.3.1. Antibiotic susceptibility testing by microdilution broth assay

Antibiotic susceptibility profiles for each strain and the changes caused by stress exposure for the L. *monocytogenes* isolates were determined by the micro broth dilution method according to ISO 20776-1 [9] using a 96-well V-bottom polystyrene plate.

In the study, 5 different antibiotics were used: lincomycin (Sigma Aldrich, Germany), fosfomycin (Sigma Aldrich, Germany), tetracycline, trimethoprim/sulfamethoxazole and clindamycin (TOKU-E; Bellingham, WA). Antibiotic solution stocks were made with the solvents and diluents recommended by ISO 20776-1, Annex B: Solvents and diluents for making stock solutions of selected antimicrobial agents [10]. For each day of testing, antibiotic solution stocks were freshly diluted according to ISO 20776-1, Annex C [10] in the Mueller -Hinton broth (Merck, Darmstadt, Germany). The concentration applied to the plate was 2× higher than the target concentration. *L. monocytogenes* isolates were plated on TSA (Merck, Darmstadt, Germany) and incubated for 24 h at 37 °C. After, single colonies were then suspended in 0.9% saline solution to obtain turbidity equal to the 0.5 McFarland. The turbidity was measured with a McFarland densitometer DEN 1B, Bioscan, and a (Bioscan, Latvia). Then, 50 μL of each antibiotic solution and bacteria solution was added to the well of each row in the 96-well plates (Promed®, Italy). One set of wells was left without bacterial solutions as media controls, and another (without antibiotic solutions) as growth controls. The experiment was conducted in triplicate. [10].

Plates were aerobically incubated at 35 ± 2 °C for 20 h. After incubation, the turbidity of the medium was measured with the naked eye. The minimum inhibitory concentration (MIC) was the lowest concentration at which no bacterial growth was observed. The results were interpreted by the Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI 2022 [11] as susceptible, intermediate resistant or resistant. Results were acceptable only if there was sufficient growth of the tested strain (i.e. obvious button or definite turbidity in the positive growth control), and when no growth in the un-inoculated or negative growth control was observed. The amount of growth in each well was compared with the positive growth control. *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 was used as a quality control.

2.3.2. Virulence changes in a live model

The experiments were conducted on all strains individually, previously subjected to sous-vide cooking-related stress and under optimal conditions. *Galleria mellonella* larvae ($n = 11$/strain) were infected with L. *monocytogenes* strains (100 CFU/larvae). Using a 10 μL disposable Hamilton syringe, bacterial inoculums were injected dorsolaterally into the hemocoel of larvae in their last instar. After injection, 37 °C incubation for 7 days was performed on the larvae. If a larvae did not move when touched, it was deemed dead. The control group was *G. mellonella* larvae injected with 0.9% NaCl [12]. Survival analysis were performed using Kaplan-Meier model, comparison of survival curves was performed using the logrank. RNA isolation and reverse transcription into

Table 1
Strain characterisation.

Isolate	Source	MLST		cgMLST type	Antimicrobials resistance	Virulence factors
		Clonal complex	Sequence type			
Lm_1	smoked salmon	8	8	1151	*fosX, lmo0919, lmo1695,norB, sul*	LIPI-1
Lm_2	smoked salmon	8	8	1151	*fosX, lmo0919, lmo1695,norB, sul*	LIPI-1
Lm_3	smoked salmon	121	121	909	*fosX, lmo0919, lmo1695,norB, sul*	LIPI-1
Lm_4	fish processing plant	101	101	11,711	*fosX, lmo0919, lmo1695,norB, sul*	LIPI-1

cDNA

Using the Total RNA Mini Plus Kit and the CleanUp RNA Concentrator (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland), a total RNA was extracted from the overnight culture (control) and strains subjected to the sous-vide preparation procedure. All samples' RNA integrity was evaluated by depositing 10 µL of RNA onto a 1.2% agarose gel in a 0.5% TBE buffer and running it at 90 V for 1 h. The integrity of the RNA was determined by observing the two bands (16S and 23S RNA) with minimal dispersion. RNA concentration and purity were determined with a spectrophotometer/fluorometer (DeNovix DS11 FX, DeNovix Inc., Wilmington, NC, USA). All RNA samples were normalized to 5 g/L and promptly reverse-transcribed using a kit (TranScriba, A&A Biotechnology, Gdynia, Poland) for the synthesis of first-strand cDNA utilizing a random sequence hexamer as a primer.

2.3.3. Real-Time PCR analysis of gene expression

A total of 16 genes, including two groups, virulence genes- LIPI-1 genes (prfA, plcA, hly, mpl, actA, plcB, and osfX) and resistance genes (drfA, fosX, lin, mpr, tetA1, tetA2, tetA3, tetC, sul) were selected for expression analysis. A threshold line and quantitative cycle (Cq) were determined for each gene (Rotor-Gene, Qiagen Inc., Montreal, ON, Canada). Then, using five dilution points, DNA standard curves were determined. The amplification efficacy of each primer pair was calculated using the formula E = 10 (1/slope) [8,13]. Samples were analyzed for differences in gene expression using relative quantification, where relevant gene expression is normalized to a housekeeping gene using a mathematical model proposed and reviewed by Pfaffl [14]. The Rotor-Gene Q 2.1.0.9 software (Qiagen Inc., Montreal, ON, Canada) established a threshold for real-time PCR reactions. Expression ratios of 2 or greater indicated a significant increase in gene expression, while ratios of 0.5 or less indicated a significant decrease. In this study, primer sequences for the housekeeping gene 16 S rRNA as well as the virulence- and resistance-associated genes were provided in supplemented materials (Table S1). Three separate gene expression analyses were conducted. The relative gene expression (REG) detected for each gene and stress condition were deemed significant (p 0.05) based on a *t*-test utilizing the RGE of the control as the reference. Real-time PCR reactions were carried out in a final volume of 20 µL containing 10 µL of PowerUp SYBR Green MasterMix (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA), 1.0 µL of each primer (10 pmol/1 µL), and 5 ng of template cDNA, with the remaining volume being filled with ddH2O. The cycling conditions for the real-time PCR were as follows: 50 °C for 2 min, 95 °C for 2 min, and 40 cycles of 15 s at 95 °C, 15 s at temperature adjustment for the primer set, and 60 s at 72 °C. The specificity of the real-time PCR product was evaluated by constructing the melting curve using a gradual rise between 60 and 95 °C with 0.5 °C increments for 5 s.

3. Results

3.1. L. monocytogenes survival during sous-vide processing

A study of L. *monocytogenes'* survival at four different temperatures shows that none of them could be effective against this pathogen. The results differ among strains,r the most heat-susceptible strain after 60 min at 60 °C 69.66% live cells were noticed, on the contrary, most heat-resistant strain was 90.66%. Both lowest temperatures 42 and 52 °C, did not affect the L. *monocytogenes* strains, the reduction of live cells was marginal, 0.5–1.9% for 42 °C and 1.2–3.5% for 52 °C. Sous-vide processing at 57 °C reduced live cells to 94.9%. The results of this analysis are summarized in Fig. 1.

3.2. Expression of virulence and antibiotic resistance related gene

In the study carried out, the expression of selected genes related to virulence and antibiotic resistance of L. *monocytogenes* was tested. Comparing genes related directly to virulence, all genes that are located

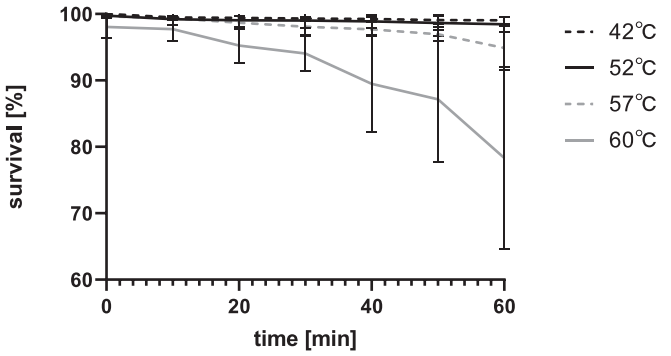


Fig. 1. Reduction of L. *monocytogenes* (n = 4) live cells during the preparation of sous-vide. Curves represent four different temperatures and error bars represent SD.

on LIPI-1 were observed to have no significant overexpression. Four out of seven genes, after the thermal stress, had similar expression levels as per the optimal condition, with gene *mpl*, zinc metalloproteinase precursor, having the highest expression (1.27). However, in two genes *plcA* (listeriolysin positive regulatory protein) and *osfX,* significant underexpression was noted, the values of which were 0.03 and 0.01, respectively (Fig. 2).

For the antibiotic resistance genes, it was shown that the stress related to sous-vide preparation caused overexpression for some genes encoding resistance to tetracyclines. For the *tetA2* gene, the relative expression scores were 3.44, while for the *tetC* gene, the value was as high as 3.56. For the *tetA3* gene, an increase in relative expression was also observed, but it was not defined as significant (1.95). The other resistance genes showed expression similar to that under optimal conditions.

3.3. Virulence changes in a live model

In a study of the virulence potential in a live model using *G. mellonella* larvae, based on the results, we made the following observations. It was found that for strains grown under optimal conditions, the average larval survival was only 11.46%. In the least virulent strain, the survival rate was estimated at 33.33%. The study found that thermal stress reduces the virulence potential of the strains, and the average survival rate rose up to 58.81%. For the Lm_1 strain, under optimal conditions, it was noted that all larvae were already dead by the 4th day, while after stressful conditions, it was found that even on the last (7th day), 50% of the larvae were still alive (Fig. 3). For the logrank test $p < 0.001$.

3.4. Changes in the antibiotic resistance phenotype

While examining changes in antibiotic resistance of strains, it was observed that the greatest changes were noted for tetracycline. An increase in resistance was observed in 3 strains, where for one of the strains it was a 5-fold increase. Notable changes were also observed for some strains in the case of fosfomycin and ciprofloxacin. No decrease in resistance was observed for any of the tested antibiotics. For the two antibiotics lincomycin and trimethoprim/ sulfamethoxazole no changes were observed after exposure to stress (Fig. 4).

4. Discussion

For almost 10 years, in Europe, it was noticed that consumption of fish and seafood increased by >1 kg/capita/year from 22.6 kg [15] in 2011 to 23.97 kg in 2019 [16]. This increase relates mainly to the consumption of fish from aquaculture, which is associated with the purchase of unprocessed fish by producers and directly by consumers.

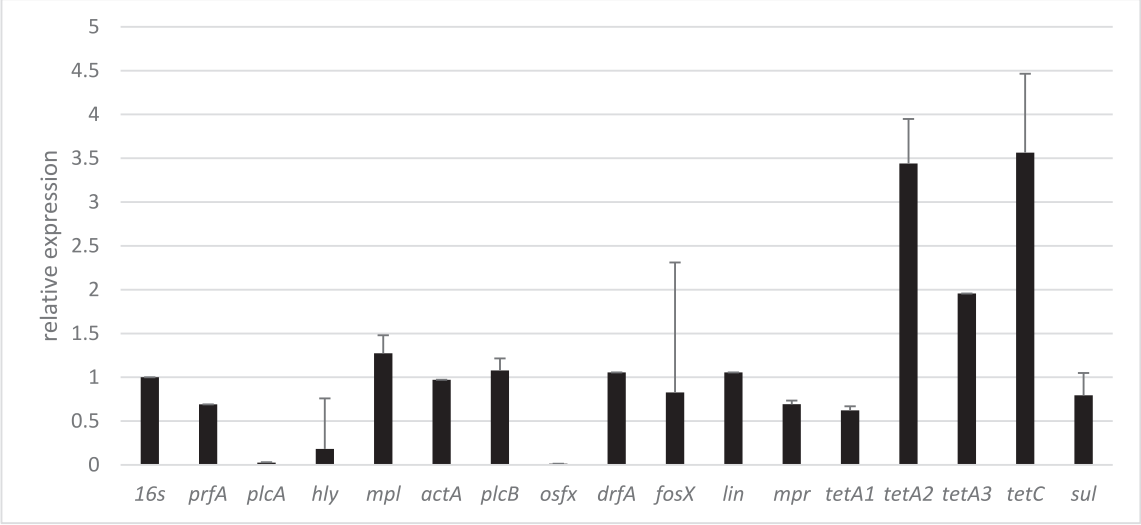


Fig. 2. Relative expression of virulence and antibiotic resistance genes of L. *monocytogenes* strains ($n = 4$) after sous-vide processing (60 °C for 60 min); Error bars represent SD.

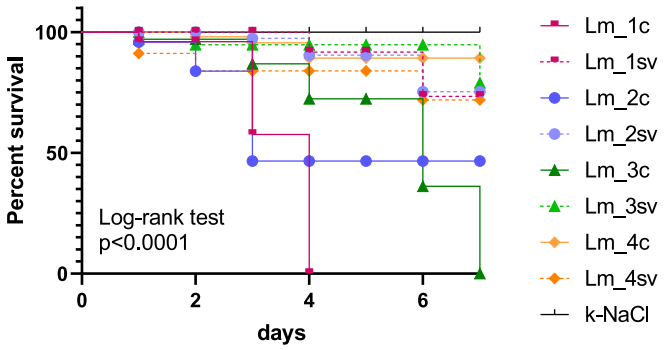


Fig. 3. Survival curves of *G. mellonella* larvae injected with L. *monocytogenes* before and after sous-vide processing stress (60 °C for 60 min); c- control, growth in optimal conditions, sv- sous-vide, k- control (saline).

This trend contributes to the search for new techniques, which include sous-vide, because although it is a technique that appeared in the 70s for several years, due to its low price and widespread availability, it is more and more often found in homes.

Processing food using the sous-vide method allows to achieve better texture, increase the taste and ensure the microbiological quality of the finished products. For sous-vide processing, food is placed into heat-stable plastic bags (usually PP) preceded by preliminary preparation including evisceration, deboning, and washing [6]. Pouches are hermetically sealed and heat-treated after the addition of seasonings or spices to enhance a flavour. The requisite time-temperature parameter is applied to vacuum-packaged products placed in a heating vessel with specific temperature control and then cooked at the specified temperature. Increasing the temperature to the desired level, maintaining it for a sufficient amount of time, and rapidly cold the product after heat treatment are crucial steps for guaranteeing food safety during heat processing. Ready products are served directly or refrigerated promptly for later consumption [6]. However, in the case of fish and seafood, much lower temperatures are used, which often do not exceed 60 °C and a short time of around 20 min [17,18]. In our experiment, we chose four temperatures of 42, 52, 57 and 60 °C based on internet recipes and our experiment working in gastronomy. Interestingly, other researchers rarely choose temperatures below 60 °C, though there are a few, the Nile tilapia study studied treatment at 50 °C [19], salmon at 52 °C [20] or the study of rainbow trout at 55 °C [21]. In tests, this temperature usually oscillates around 60–70 °C [6] and can be even 90 °C [22]. The choice of temperature can be determined by the content of connective tissue, fat, and the desired sensory characteristics.

To our knowledge, it is the first sous-vide research that focuses not only on the survival of L. *monocytogenes* itself, but many on genotypic and phenotypic changes during the sous-vide preparation. *L. monocytogenes* is not considered a heat-resistant microbe, however, it is known to be found in many niches in food production and on the products. Researchers who assessed the survival rate of L. *monocytogenes* during sous-vide fish processing described it as effective. In a research by Dogruyol (2020) [23], the D-values of the L. *monocytogenes* were D55 = 33.38, D57.5 = 9.54, D60 = 3.10, and D62.5 = 1.49 min. However, it is important that this study was carried out on one strain, and the studies show that resistance to stress factors among L. *monocytogenes* strains is a strain trait, so it is difficult to draw clear conclusions.

Nevertheless, in our study, it was decided to measure the survival rate by flow cytometry, using SYTO®9 and propidium iodide dyes, which can distinguish bacteria that show the characteristics of living cells, but are not able to multiply on solid media. It was decided to do this experiment in this way due to the fact that bacterial cells may still pose a threat to consumers by expressing their virulence [24]. The study showed that even the highest temperature of 60 °C killed only 31.44% of bacterial cells. Although this result may appear low, *L. monocytogenes*, despite being a non-spore-forming organism that is generally susceptible to heat stress, it has been reported to show thermotolerance when exposed to heat [25]. It is possible due to involving the increased transcription of heat shock genes coding for three classes of heat shock proteins (HSPs) [26].

To our knowledge, there is a lack of research on virulence transcriptome changes of L. *monocytogenes* during heat stress. In the research of Sheikh-Zeinoddin [27] heat stress effects it was observed that the heat processing of media also reduces the level of virulence gene expression in L. *monocytogenes* without affecting its growth. Thus, different stress responses of this pathogen were investigated. Veen et al. [28] showed that the heat shock response of L. *monocytogenes* included upregulation of SOS response, heat shock, and cell wall-associated genes during the first 3 min after heat exposure while genes encoding for cell division proteins were upregulated late. In a research of low-shear, modelled microgravity researchers observed downregulation *of prfA, hly, inlA* and *bsh* were noticed in cells cultured under stress conditions [29]. In this study, it was shown that most of the genes from LIPI-1 did not change when exposed to stress related to heat, but three genes (*plcA, hly* and *osfX*) downregulation was observed. These results are also reflected in

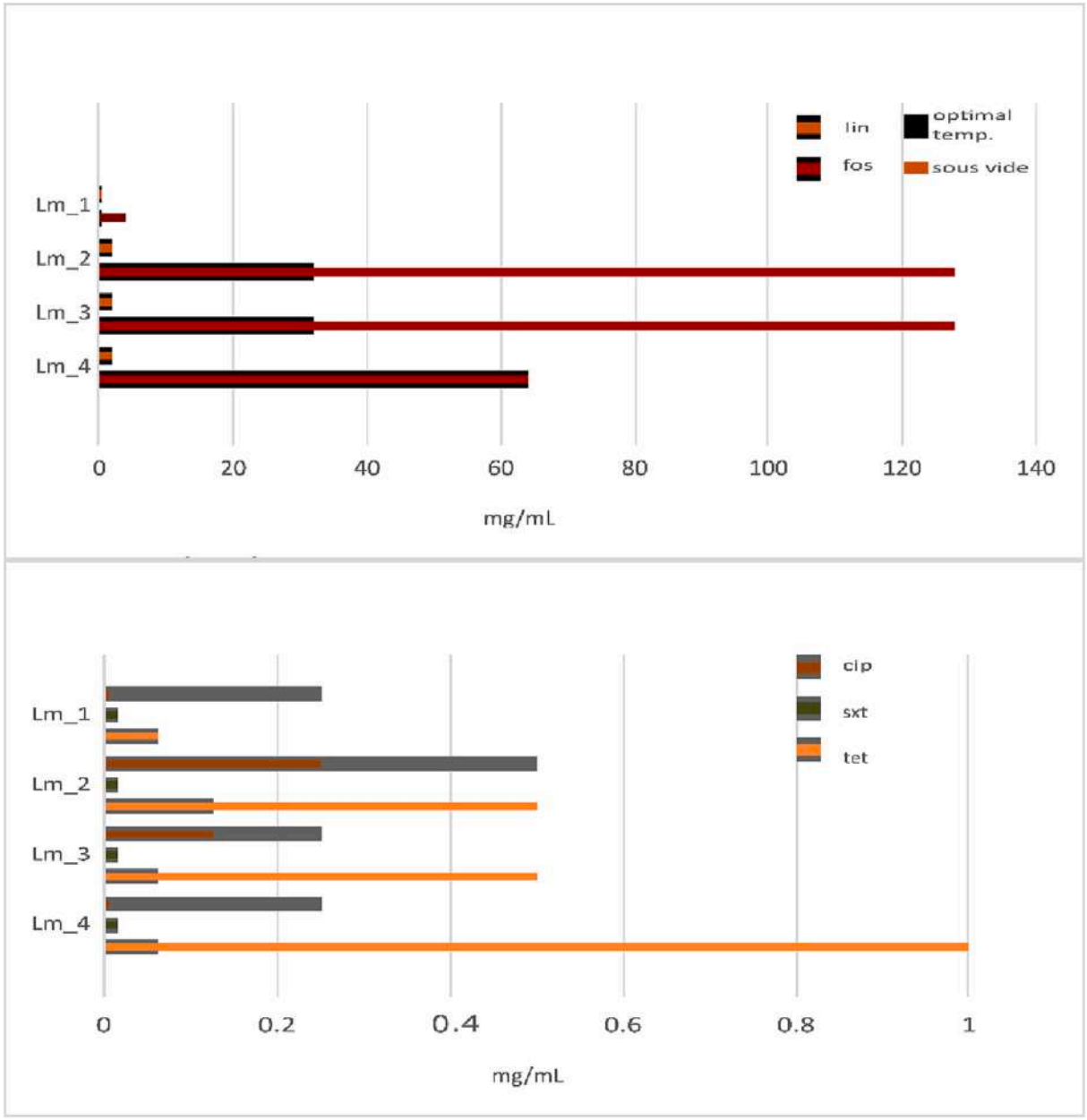


Fig. 4. Resistance profile changes *of* L. *monocytogenes* after sous-vide preparation stress(60 °C for 60 min); lin-lincomycin, fos-fosfomycin, cip-ciprofloxacin, tet-tetracycline, sxt- trimethroprim/sulfametaxazole.

an in vivo study in a live model using *G. mellonella* larvae. Lower mortality among larvae was observed for all strains, which did not exceed 50%.

The preferred antibiotic for treating human listeriosis are penicillin and ampicillin, either by itself or in combination with gentamicin. Patients who are allergic to penicillin, however, typically receive a second-choice medication that combines trimethoprim with a sulfonamide, such as sulfamethoxazole in co-trimoxazole. Erythromycin is used to treat infected pregnant women, while vancomycin is used to treat bacteremia. Listeriosis can also be treated with rifampicin, tetracycline, chloramphenicol, and fluoroquinolones [30,31]. In this study, we determined resistance to antibiotics for which the strains had genes lincomycin, fosfomycin, tetracycline, trimethoprim/ sulfamethoxazole and ciprofloxacin.

In our study, it was observed that thermal stress did not affect the resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole and lincomycin, which was confirmed phenotypically and genotypically. The highest overexpression was observed in the *tetC* and *tetA2* genes, which was also confirmed phenotypically.

Few studies determine the impact of stress on the antibiotic resistance profile of strains. In the study of the effect of HPP on the transcriptome, it was possible to determine that *norB* was only upregulated at the 24 h time point after 400 MPa treatment in barotolerant strains [32]. In turn, the effect of low pH, studied in our previous studies, showed that the stressor induced a decrease in the MIC value for the majority of the strains when it came to nitrofurantoin. Levofloxacin's MIC value rose for six different strains. The nitrofurantoin and chloramphenicol cases showed the most significant decrease, with some values being three times lower than under optimal conditions. Contrarily, daptomycin showed the largest increase in MIC values [8]. In another study examining the effect of pH, it was found that L. *monocytogenes* isolates exposed to acid stress tended to become more resistant to most antibiotics. All isolates of L. *monocytogenes* were shown to be moderately resistant to penicillin when exposed to pH 5.0. This study

also determined the effect of cold (10 °C for 24 h) increased the resistance of L. *monocytogenes* toward the tested antibiotics including tetracycline and ciprofloxacin [33].

5. Conclusions

The outcome ofthe experimentation allowed us to determine that the temperatures and times suggested for processing fish and seafood are not effective in killing L. *monocytogenes* cells. Although many of them will not be able to multiply, their cellular activity may remain. Thermal stress caused by sous-vide processing, reduces the virulence potential of L. *monocytogenes*, while it can increase tolerance to antibiotics such as tetracycline or ciprofloxacin. Therefore, remembering that L. *monocytogenes* infections rarely occur as outbreaks, but only as single cases it is important not to consider the sous-vide method as ensuring the microbiological quality of products, especially those with high contamination levels, and choose products of the best quality for processing.

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.nfs.2023.05.003.

CRediT authorship contribution statement

Arkadiusz Zakrzewski: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation. **Joanna Gajewska:** Formal analysis, Investigation, Writing – review & editing. **Wioleta Chajęcka-Wierzchowska:** Validation, Writing – review & editing, Funding acquisition. **Anna Zadernowska:** Validation, Writing – review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgment

This research was funded by the National Science Centre (Poland), grant number 2018/29/B/NZ9/00645 (OPUS-15).

References

[1] A.R. Conrad, S. Tubach, V. Cantu, L.M. Webb, S. Stroika, S. Moris, M. Davis, D. C. Hunt, K.K. Bradley, Z. Kucerova, E. Strain, M. Doyle, A. Fields, K.P. Neil, L. H. Gould, K.A. Jackson, M.E. Wise, P.M. Griffin, B.R. Jackson, Listeria monocytogenes illness and deaths associated with ongoing contamination of a multiregional brand of ice cream products, United States, 2010–2015, Clin. Infect. Dis. 76 (2023) 89–95, https://doi.org/10.1093/CID/CIAC550.

[2] J.L. Self, A. Conrad, S. Stroika, A. Jackson, L. Whitlock, K.A. Jackson, J. Beal, A. Wellman, M.K. Fatica, S. Bidol, P.P. Huth, M. Hamel, K. Franklin, L. Tschetter, C. Kopko, P. Kirsch, M.E. Wise, C. Basler, Multistate outbreak of listeriosis associated with packaged leafy green salads, United States and Canada, 2015-2016, Emerg. Infect. Dis. 25 (2019) 1461–1468, https://doi.org/10.3201/EID2508.180761.

[3] Ecdc, Listeriosis Annual Epidemiological Report for 2021 Key facts, 2021.

[4] C. Charlier, É. Perrodeau, A. Leclercq, B. Cazenave, B. Pilmis, B. Henry, E. Al, Clinical features and prognostic factors of listeriosis: the MONALISA national prospective cohort study, Lancet Infect. Dis. 17 (2017) 510–519, https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30521-7.

[5] H. Ayub, A. Ahmad, Physiochemical changes in sous-vide and conventionally cooked meat, Int. J. Gastron. Food Sci. 17 (2019), 100145, https://doi.org/10.1016/J.IJGFS.2019.100145.

[6] S. Coşansu, S. Mol, G. Haskaraca, Sous-vide cooking: effects on seafood quality and combination with other hurdles, Int. J. Gastron. Food Sci. 29 (2022), 100586, https://doi.org/10.1016/J.IJGFS.2022.100586.

[7] A.J. Zakrzewski, M. Kurpas, A. Zadernowska, W. Chaj Ecka-Wierzchowska, M. J. Fraqueza, A Comprehensive Virulence and Resistance Characteristics of *Listeria monocytogenes* Isolated from Fish and the Fish Industry Environment, Int. J. Mol. Sci. 24 (2023) 3581, https://doi.org/10.3390/IJMS24043581.

[8] A.J. Zakrzewski, W. Chajęcka-Wierzchowska, A. Zadernowska, Ceviche-natural preservative: possibility of microbiota survival and effect on *L. monocytogenes*, Foods 11 (2022) 860, https://doi.org/10.3390/FOODS11060860.

[9] British Standards Institution, Susceptibility Testing of Infectious Agents and Evaluation of Performance of Antimicrobial Susceptibility Test Devices. Part 1, Broth Micro-Dilution Reference Method for Testing the In Vitro Activity of Antimicrobial Agents against Rapidly Growing Aerobic Bacteria Involved in Infectious Diseases., (n.d.) 30. https://www.en-standard.eu/bs-en-iso-20776-1-2020-susceptibility-testing-of-infectious-agents-and-evaluation-of-performance-of-antimicrobial-susceptibility-test-devices-broth-micro-dilution-reference-method-for-testing-the-in-vitro-activity-of-antimicrobial-agents-against-rapidly-g/ (accessed November 9, 2022).

[10] J. Gajewska, W. Chajęcka-Wierzchowska, A. Zadernowska, Occurrence and characteristics of *Staphylococcus aureus* strains along the production chain of raw milk cheeses in Poland, Mol. 27 (2022) 6569, https://doi.org/10.3390/MOLECULES27196569.

[11] CLSI, CLSI M100-ED29: 2021 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 30th edition, 2020.

[12] M. Rakic Martinez, M. Wiedmann, M. Ferguson, A.R. Datta, Assessment of Listeria monocytogenes virulence in the galleria mellonella insect larvae model, PLoS One 12 (2017), https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0184557.

[13] R. Rasmussen, Quantification on the LightCycler, Rapid Cycle Real-Time PCR. (2001) 21–34, https://doi.org/10.1007/978-3-642-59524-0_3.

[14] M.W. Pfaffl, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, Nucleic Acids Res. 29 (2001) E45, https://doi.org/10.1093/NAR/29.9.E45.

[15] C. Belchior, Seafood in Europe — A Food System Approach for Sustainability, (n.d.).

[16] Consumption, (n.d.). https://oceans-and-fisheries.ec.europa.eu/facts-and-figures/facts-and-figures-common-fisheries-policy/consumption_en (accessed March 6, 2023).

[17] L.Q. Fetterman, M. Halm, S. Peabody, Sous Vide at Home The Modern Technique for Perfectly Cooked Meals, 2016, pp. 1–385. https://www.barnesandnoble.com/w/sous-vide-at-home-lisa-q-fetterman/1123383554 (accessed February 5, 2023).

[18] The Complete Sous Vide Cookbook: 200+ Recipes to Cook at Home Like a Chef - Martha Scott - Google Książki, (n.d.). https://books.google.pl/books/about/The_Complete_Sous_Vide_Cookbook.html?id=NMbNuAEACAAJ&redir_esc=y (accessed February 5, 2023).

[19] J. Pongsetkul, S. Benjakul, S. Boonanuntanasarn, J. Yongsawatdigul, Sensory characteristics and microbiological quality changes of Nile Tilapia fillet processed by various sous-vide conditions during chilled storage, Turk. J. Fish. Aquat. Sci. 22 (2022), https://doi.org/10.4194/TRJFAS21079.

[20] S. Redfern, M. Dermiki, S. Fox, R. Lordan, K. Shiels, S. Kumar Saha, A. Tsoupras, I. Zabetakis, The effects of cooking salmon sous-vide on its antithrombotic properties, lipid profile and sensory characteristics, Food Res. Int. 139 (2021), 109976, https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2020.109976.

[21] P. Çalış Erümit, O. Yıldız Pınar, Determination of shelf life of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) fillets cooked at different combinations of temperatures using the sous vide technique, Mar. Sci. Technol. Bull. 11 (2022) 221–230, https://doi.org/10.33714/MASTEB.1091600.

[22] C.B. Singh, N. Kumari, S.R. Senapati, M. Lekshmi, K. Nagalakshmi, A.K. Balange, M.K. Chouksey, G. Venkateshwarlu, K.A.M. Xavier, Sous vide processed ready-to-cook seerfish steaks: process optimization by response surface methodology and its quality evaluation, LWT. 74 (2016) 62–69, https://doi.org/10.1016/J.LWT.2016.07.017.

[23] H. Dogruyol, S. Mol, S. Cosansu, Increased thermal sensitivity of Listeria monocytogenes in sous-vide salmon by oregano essential oil and citric acid, Food Microbiol. 90 (2020), 103496, https://doi.org/10.1016/J.FM.2020.103496.

[24] T. Ramamurthy, A. Ghosh, G.P. Pazhani, S. Shinoda, Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria, Front. Public Health 2 (2014) 103, https://doi.org/10.3389/FPUBH.2014.00103/BIBTEX.

[25] O. Haykir, C. Mohácsi-Farkas, T. Engelhardt, Enhanced heat resistance of Listeria innocua as a surrogate of Listeria monocytogenes after sublethal heat treatment, Acta Aliment. 51 (2022) 241–248, https://doi.org/10.1556/066.2022.00013.

[26] T. Sibanda, E.M. Buys, *Listeria monocytogenes* pathogenesis: the role of stress adaptation, Microorg. 10 (2022) 1522, https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10081522.

[27] M. Sheikh-Zeinoddin, T.M. Perehinec, S.E. Hill, C.E.D. Rees, Maillard reaction causes suppression of virulence gene expression in Listeria monocytogenes, Int. J. Food Microbiol. 61 (2000) 41–49, https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00371-8.

[28] S. van der Veen, T. Hain, J.A. Wouters, H. Hossain, W.M. de Vos, T. Abee, T. Chakraborty, M.H.J. Wells-Bennik, The heat-shock response of Listeria monocytogenes comprises genes involved in heat shock, cell division, cell wall synthesis, and the SOS response, Microbiology. 153 (2007) 3593–3607, https://doi.org/10.1099/MIC.0.2007/006361-0.

[29] S. Sheet, S. Yesupatham, K. Ghosh, M.S. Choi, K.S. Shim, Y.S. Lee, Modulatory effect of low-shear modeled microgravity on stress resistance, membrane lipid composition, virulence, and relevant gene expression in the food-borne pathogen Listeria monocytogenes, Enzym. Microb. Technol. 133 (2020), 109440, https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2019.109440.

[30] A. Alonso-Hernando, M. Prieto, C. García-Fernández, C. Alonso-Calleja, R. Capita, Increase over time in the prevalence of multiple antibiotic resistance among isolates of Listeria monocytogenes from poultry in Spain, Food Control 23 (2012) 37–41, https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2011.06.006.

[31] A.N. Olaimat, M.A. Al-Holy, H.M. Shahbaz, A.A. Al-Nabulsi, M.H. Abu Ghoush, T. M. Osaili, M.M. Ayyash, R.A. Holley, Emergence of antibiotic resistance in Listeria monocytogenes isolated from food products: a comprehensive review, Compr. Rev.

Food Sci. Food Saf. 17 (2018) 1277–1292, https://doi.org/10.1111/1541-4337.12387.

[32] I.C. Duru, F.I. Bucur, M. Andreevskaya, B. Nikparvar, A. Ylinen, L. Grigore-Gurgu, T.M. Rode, P. Crauwels, P. Laine, L. Paulin, T. Løvdal, C.U. Riedel, N. Bar, D. Borda, A.I. Nicolau, P. Auvinen, High-pressure processing-induced transcriptome response during recovery of Listeria monocytogenes, BMC Genomics 22 (2021) 1–20, https://doi.org/10.1186/S12864-021-07407-6/FIGURES/5.

[33] A.A. Al-Nabulsi, T.M. Osaili, R.R. Shaker, A.N. Olaimat, Z.W. Jaradat, N.A. Zain Elabedeen, R.A. Holley, Effects of osmotic pressure, acid, or cold stresses on antibiotic susceptibility of Listeria monocytogenes, Food Microbiol. 46 (2015) 154–160, https://doi.org/10.1016/J.FM.2014.07.015.

Olsztyn, 26.03.2024
(miejscowość, data)

mgr inż. Arkadiusz Zakrzewski
(imię i nazwisko kandydata)
Technologia żywności i żywienia
(dyscyplina naukowa)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
technologii żywności i żywienia
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak

OŚWIADCZENIE

autora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że w pracy pod tytułem: *Zakrzewski, A., Gajewska, J., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2023). Effect of sous vide processing of fish on the virulence and antibiotic resistance of Listeria monocytogenes. NFS Journal, 31, 155–161* mój wkład merytorycznyw jej przygotowanie polegał na: *współudziale w opracowaniu koncepcji manuskryptu, opracowaniu metodyki, wykonaniu analiz, wizualizacji wyników oraz uczestniczeniu w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu.*

Zakrzewski Arkadiusz

(podpis kandydata)

Olsztyn, 18.03.2024
(miejscowość, data)

mgr inż. Joanna Gajewska
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
technologia żywności i żywienia
Prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem:

Zakrzewski, A., Gajewska, J., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2023). Effect of sous vide processing of fish on the virulence and antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes*. *NFS Journal*, 31, 155–161. https://doi.org/10.1016/J.NFS.2023.05.003

mój wkład merytorycznyw jej przygotowanie polegał na: *współudziale w analizach dotyczących zmian antybiotykooporności oraz przygotowaniu i edytowaniu manuskryptu.*

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez *mgr inż. Arkadiusza Zakrzewskiego* jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych. Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata *mgr inż. Arkadiusza Zakrzewskiego* polegający na współudziale w *opracowaniu koncepcji, analizach laboratoryjnych, wizualizacji wyników, pisaniu i edytowaniu manuskryptu*

Gajewska Joanna
.....
podpis

Olsztyn, 18.03.2024
(miejscowość, data)

dr inż. Wioleta Chajęcka-Wierzchowska
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
technologia żywności i żywienia
Prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem

Zakrzewski, A., Gajewska, J., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2023). Effect of sous vide processing of fish on the virulence and antibiotic resistance of Listeria monocytogenes. NFS Journal, 31, 155–161. https://doi.org/10.1016/J.NFS.2023.05.003

mój wkład merytorycznyw jej przygotowanie polegał na: *korekcie pierwotnej wersji manuskryptu oraz koordynowaniu prac laboratoryjnych.*

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez *mgr inż. Arkadiusza Zakrzewskiego* jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych. Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata *mgr inż. Arkadiusza Zakrzewskiego* polegający na współudziale w *opracowaniu koncepcji, analizach laboratoryjnych, wizualizacji wyników, pisaniu i edytowaniu manuskryptu.*

.....
podpis

Olsztyn, 18.03.2024
(miejscowość, data)

dr hab. inż. Anna Zadernowska, prof. UWM
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
technologia żywności i żywienia
Prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem

Zakrzewski, A., Gajewska, J., Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. (2023). Effect of sous vide processing of fish on the virulence and antibiotic resistance of Listeria monocytogenes. NFS Journal, 31, 155–161. https://doi.org/10.1016/J.NFS.2023.05.003

mój wkład merytorycznyw jej przygotowanie polegał na: *korekcie pierwotnej wersji manuskryptu, koordynowaniu prac laboratoryjnych oraz zdobyciu funduszy na realizację prac.*

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez *mgr inż. Arkadiusza Zakrzewskiego* jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata *mgr inż. Arkadiusza Zakrzewskiego* polegający na współudziale w *opracowaniu koncepcji, analizach laboratoryjnych, wizualizacji wyników, pisaniu i edytowaniu manuskryptu.*

Anna Zadernowska
podpis