WYDZIAŁ MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ

UNIWERSYTETU WARMIŃSKO – MAZURSKIEGO W OLSZTYNIE

Dziedzina: Weterynaria

Dyscyplina: Weterynaria

mgr Marta Maria Sołtysiuk

ROZPRAWA DOKTORSKA

Potencjał infekcyjny oraz wrażliwość na substancje przeciwdrobnoustrojowe szczepów *Listeria* spp. wyizolowanych z ryb

Infectious Potential and Antimicrobial Susceptibility of *Listeria* spp. Strains Isolated from Fish

Praca wykonana w Katedrze Weterynaryjnej Ochrony Zdrowia Publicznego

Wydziału Medycyny Weterynaryjnej

UWM Olsztyn

Olsztyn, 2026

Promotor rozprawy doktorskiej:

dr hab. Agnieszka Wiszniewska – Łaszczych prof. UWM

Katedra Weterynaryjnej Ochrony Zdrowia Publicznego

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Promotor pomocniczy rozprawy doktorskiej:

dr Paulina Przyborowska

Katedra Weterynaryjnej Ochrony Zdrowia Publicznego

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Składam serdeczne podziękowania Pani dr hab. Agnieszce Wiszniewskiej – Łaszczych, prof. UWM za poświęcony czas i cenne uwagi merytoryczne oraz za okazaną życzliwość.

Dziękuję Pani dr Paulinie Przyborowskiej za pomoc i wsparcie w przygotowaniu niniejszej rozprawy doktorskiej.

Dziękuję również wszystkim, którzy wspierali mnie w realizacji pracy doktorskiej, szczególnie współpracownikom i przełożonym.

Wykaz publikacji składających się na rozprawę doktorską pod wspólnym tytułem:

Potencjał infekcyjny oraz wrażliwość na substancje przeciwdrobnoustrojowe szczepów *Listeria* spp. wyizolowanych z ryb

Prace doświadczalne:

1) Sołtysiuk M., Przyborowska P., Wiszniewska – Łaszczych A., Tobolski D. Prevalence and antimicrobial resistance profile of *Listeria* spp. isolated from raw fish. BMC Veterinary Research. 2025. 21:333 - https://doi.org/10.1186/s12917-025-04792-y
2) Sołtysiuk M., Przyborowska P., Wiszniewska – Łaszczych A., Tobolski D. Virulence, cytotoxicity potential and biofilm production ability of *Listeria* spp. isolated from raw fish in Poland. BMC Veterinary Research. 2026. 22:220 - https://doi.org/10.1186/s12917-026-05323-z

Łącznie: punkty MEiN = 280; IF = 6,2

SPIS TREŚCI

1. Streszczenie
2. Summary
3. Wstęp
   - 3.1. Charakterystyka i klasyfikacja *Listeria* spp. i *L. monocytogenes*
   - 3.2. Występowanie *L. monocytogenes* w środowisku i w żywności pochodzenia zwierzęcego
   - 3.3. Listerioza jako zagrożenie zdrowia publicznego w krajach Unii Europejskiej
   - 3.4. Mechanizmy chorobotwórczości oraz czynniki determinujące wirulencję *Listeria* spp. i *L. monocytogenes*
   - 3.5. Wrażliwość *Listeria* spp. i *L. monocytogenes* na substancje przeciwdrobnoustrojowe
4. Cele i hipotezy badawcze
   - 4.1. Cele badawcze
   - 4.2. Hipotezy badawcze
5. Materiał i metody
   - 5.1. Izolacja *Listeria* spp. i *L. monocytogenes*
   - 5.2. Charakterystyka molekularna *Listeria* spp. i *L. monocytogenes*
   - 5.3. Oznaczanie wrażliwości *Listeria* spp. i *L. monocytogenes* na substancje przeciwdrobnoustrojowe
   - 5.4. Molekularna identyfikacja genów warunkujących oporność na substancje przeciwdrobnoustrojowe u *Listeria* spp. i *L. monocytogenes*
   - 5.5. Molekularna analiza genów wirulencji oraz przynależności do genoserogrupy wśród izolatów *Listeria* spp.
   - 5.6. Ocena potencjału produkcji biofilmu szczepów *Listeria* spp. wyizolowanych z ryb
   - 5.7. Charakterystyka cytotoksyczności szczepów *Listeria* spp. i *L. monocytogenes* wyizolowanych z ryb
   - 5.8. Analiza statystyczna
     - 5.8.1 Analiza statystyczna lekowrażliwości szczepów *Listeria* spp.
     - 5.8.2 Analiza statystyczna występowania genów wirulencji, produkcji biofilmu i cytotoksyczności szczepów *Listeria* spp.
6. Wyniki
   - 6.1. Prewalencja *Listeria* spp. oraz *L. monocytogenes* w surowych rybach
   - 6.2. Profil oporności na substancje przeciwdrobnoustrojowe szczepów *Listeria* spp. wyizolowanych z ryb

6.3. Profil lekowrażliwości na substancje przeciwdrobnoustrojowe *L. monocytogenes* wyizolowanych z ryb
6.4. Rozkład genów oporności na substancje przeciwdrobnoustrojowe wśród izolatów *Listeria* spp. oraz *L. monocytogenes*
6.5. Detekcja genów wirulencji oraz produkcji biofilmu w izolatach *Listeria* spp. pozyskanych z ryb
6.6. Profil produkcji biofilmu izolatów *Listeria* spp. pozyskanych z ryb
6.7. Profil cytotoksyczności izolatów *Listeria* spp.
7. Dyskusja
8. Wnioski
9. Piśmiennictwo
10. Spis tabel, rysunków i wykresów

Wykaz użytych skrótów w autoreferacie

$A_{experimental}$ – the absorbance of cells exposed to the bacterial supernatant;

$A_{negative}$ – the absorbance of the negative; control;

$A_{positive}$ – the absorbance of the positive control;

AMR – Antimicrobial Resistance;

BHI – Brain Heart Infusion medium;

Caco–2 – Human epithelial colorectal adenocarcinoma;

CD – Cell death;

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute;

CRA – Congo Red Agar;

EFSA – European Food Safety Authority;

EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing;

Hep–G2 – Human Caucasian hepatocyte carcinoma;

HT–29 – Caucasian colon adenocarcinoma grade II;

I – Intermediate biofilm-forming ability;

κ – Cohen's kappa coefficient;

L. innocua – *Listeria innocua*;

L. ivanovii – *Listeria ivanovii*;

L. monocytogenes – *Listeria monocytogenes*;

L. seeligeri – *Listeria seeligeri*;

L. welshimeri – *Listeria welshimeri*;

Listeria spp - *Listeria* species;

LLO – Listeriolysin O;

MEM – Eagle's Minimum Essential Medium;

N – Negative biofilm producers;

OD – Optical density;

ODc – Optical density cut-off value;

P – Positive biofilm producers;

PCR – Polymerase Chain Reaction;

RTE – Ready–to–Eat;

TSB – Tryptone Soy Broth;

Vero – African Green Monkey kidney.

1. Streszczenie

Zanieczyszczenie żywności bakteriami z rodzaju *Listeria* stanowi istotny problem w zakresie bezpieczeństwa żywności oraz zdrowia publicznego, szczególnie w kontekście produktów spożywczych nie poddawanych obróbce termicznej. Wśród *Listeria* spp. szczególne znaczenie przypisuje się *Listerii monocytogenes*, będącej czynnikiem etiologicznym listeriozy – choroby odzwierzęcej charakteryzującej się wysokim wskaźnikiem hospitalizacji i śmiertelności w grupach podwyższonego ryzyka. Ryby i produkty rybne mogą stanowić istotne ogniwo transmisji *Listeria* spp. w łańcuchu żywnościowym, ponieważ środowisko wodne sprzyja ich utrzymywaniu się i rozprzestrzenianiu. Jednocześnie, coraz większe obawy budzi zjawisko oporności na substancje przeciwdrobnoustrojowe obserwowane wśród bakterii, również *Listeria* spp., które może prowadzić do ograniczenia skuteczności terapii zakażeń oraz sprzyjać szerzeniu się genów oporności pomiędzy drobnoustrojami.

Dane dotyczące występowania oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe, potencjału wirulencji oraz właściwości cytotoksycznych bakterii *Listeria* spp. izolowanych z surowych ryb dostępnych na rynku polskim pozostają ograniczone. Celem przeprowadzonych badań była kompleksowa charakterystyka izolatów *Listeria* spp. pozyskanych z surowych ryb pochodzących z różnych środowisk wodnych na terenie północnej Polski, obejmujących ocenę prewalencji, profili oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe wraz z detekcją genów oporności, genów wirulencji, przynależności do serogrup, zdolności do tworzenia biofilmu oraz aktywności cytotoksycznej. Badania stanowiły próbę oceny zagrożeń związanych z obecnością bakterii *Listeria* w surowych rybach oraz określenia ich wrażliwości na substancje przeciwdrobnoustrojowe, cech mogących wpływać na ich przeżywalność oraz zdolność kolonizacji środowiska produkcji żywności.

Materiał badawczy stanowiło 750 próbek surowych ryb pochodzących z różnych środowisk wodnych północnej Polski, obejmujących zbiorniki słodkowodne z wodą zarówno przepływową jak i stojącą, oraz akwen Morza Bałtyckiego. Izolacje *Listeria* spp. przeprowadzono zgodnie z procedurą opisana w normie PN-EN ISO 11290-1:2017-07: Mikrobiologia łańcucha żywnościowego – Horyzontalna metoda wykrywania i oznaczania liczby *Listeria monocytogenes* i innych *Listeria* spp. – Część 1: Metoda wykrywania. Uzyskane izolaty poddano identyfikacji gatunkowej, a następnie szczegółowej analizie fenotypowej i molekularnej. Wrażliwość na środki przeciwdrobnoustrojowe oceniono metodą dyfuzyjno – krążkową z wykorzystaniem panelu substancji przeciwdrobnoustrojowych reprezentujących różne grupy terapeutyczne. Równocześnie przeprowadzono analizę występowania genów

związanych z opornością na środki przeciwdrobnoustrojowe z zastosowaniem łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). W celu określenia potencjału patogennego badanych szczepów wykonano analizę obecności genów wirulencji obejmujących kluczowe determinanty związane z inwazją, przeżywaniem wewnątrzkomórkowym oraz rozprzestrzenianiem się bakterii w organizmie gospodarza. W przypadku izolatów *L. monocytogenes* przeprowadzono również genoserotypowanie, umożliwiające określenie przynależności tych szczepów do serogrup mających znaczenie epidemiologiczne. Potencjał do kolonizacji środowiska produkcji żywności określono na podstawie zdolności do wytwarzania biofilmu wykorzystując metody jakościowe i ilościowe wraz z detekcją genu odpowiedzialnego za jego formowanie (*luxS*). Uzupełnieniem badań była ocena potencjału cytotoksycznego izolatów *Listeria* spp. *in vitro* z wykorzystaniem linii komórek eukariotycznych. Takie wielokierunkowe podejście badawcze pozwoliło na kompleksową charakterystykę badanej populacji *Listeria* spp.

W wyniku przeprowadzonych analiz *Listeria* spp. wyizolowano łącznie 104 izolaty, co stanowiło prewalencję na poziomie 13,9%. Wśród badanych szczepów najliczniej reprezentowane były *L. seeligeri* (34,6%) oraz *L. welshimeri* (28,8%), natomiast *L. monocytogenes* i *L. innocua* stanowiły odpowiednio 23,1% i 13,5% wszystkich izolatów. Fenotypowa ocena wrażliwości na środki przeciwdrobnoustrojowe wykazała powszechną oporność na oksacylinę, obserwowaną we wszystkich badanych izolatach. Bardzo wysoki poziom oporności stwierdzono również wobec cefotaksymu, klindamycyny, cefoksytyny, ryfampicyny oraz trimetoprimu z sulfametoksazolem. Szczególnie niepokojącym wynikiem było wykazanie oporności wielolekowej u niemal wszystkich badanych izolatów, przy czym wszystkie izolaty *L. monocytogenes* spełniały kryteria szczepów wielolekoopornych. Izolaty tego gatunku charakteryzowały się całkowitą opornością na meropenem, cefoksytynę, cefotaksym, ryfampicynę oraz trimetoprim-sulfametoksazol, a ponadto wykazywały wysokie poziomy oporności wobec cyprofloksacyny, klindamycyny, tetracykliny, erytromycyny, benzylopenicyliny i nitrofurantoiny. Analiza molekularna potwierdziła obecność genów związanych z opornością na środki przeciwdrobnoustrojowe, spośród których najczęściej identyfikowano *blaTEM*, a także *ampC* i *ereB*. Uzyskane wyniki wskazują na szerokie rozpowszechnienie cech oporności wśród bakterii *Listeria* związanych ze środowiskiem wodnym oraz produktami rybnymi. Jednocześnie wysoka częstość występowania szczepów wielolekoopornych sugeruje możliwość utrzymywania się presji selekcyjnej w środowisku wodnym oraz potencjalnego udziału tych ekosystemów w rozprzestrzenianiu determinant oporności. Przeprowadzone badania dostarczyły również danych dotyczących zróżnicowania gatunkowego populacji *Listeria* obecnych w surowych rybach, wskazując, że obok gatunku

patogennego istotny udział mają również gatunki tradycyjnie uznawane za niepatogenne lub oportunistyczne.

Analiza potencjału wirulencji wykazała wyraźne różnice pomiędzy badanymi gatunkami. Izolaty *L. monocytogenes* charakteryzowały się obecnością licznych determinant wirulencji związanych z patogenezą zakażeń. Większość szczepów posiadała kompletną Wyspę Patogenności Listerii 1 (LIPI-1), a wszystkie izolaty zaklasyfikowano do serogrupy 1/2a, 1/2c, 3a, 3c. Wśród szczepów *L. monocytogenes* powszechnie występowały geny *plcA*, *hlyA*, *mpl*, *inlA*, *inlC* oraz *inlJ*, a geny *prfA* i *actA* identyfikowano u zdecydowanej większości izolatów. Również gen *iap* występował z wysoką częstością. Pozostałe gatunki *Listeria* wykazywały obecność jedynie wybranych genów wirulencji, głównie *plcA* i *mpl*, nie posiadając pełnego zestawu determinant charakterystycznych dla *L. monocytogenes*. Potencjał wirulencji izolatów *L. monocytogenes* został dodatkowo potwierdzony na poziomie fenotypowym, ponieważ aktywność cytotoksyczną wobec czterech eukariotycznych linii komórkowych obserwowano wyłącznie u tego gatunku. Szczepy *L. innocua*, *L. seeligeri* oraz *L. welshimeri* nie wykazywały aktywności cytotoksycznej pomimo obecności pojedynczych genów związanych z wirulencją.

Zdolność do tworzenia biofilmu stanowiła cechę większości badanych izolatów. W badaniach ilościowych ponad dwie trzecie izolatów wykazało zdolność do formowania biofilmu, co wskazuje na szerokie rozpowszechnienie tej właściwości wśród bakterii *Listeria* obecnych w surowych rybach. Analiza genu *luxS* wykazała jego obecność jedynie u części izolatów, jednak nie stwierdzono istotnej zależności pomiędzy obecnością tego genu a zdolnością do tworzenia biofilmu.

Uzyskane wyniki wskazują, że surowe ryby mogą stanowić źródło szczepów *L. monocytogenes* posiadających jednocześnie liczne determinanty wirulencji, wysoki poziom oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe oraz zdolność do utrzymywania się w środowisku dzięki tworzeniu biofilmu. Jednocześnie obecność innych gatunków *Listeria* wyposażonych w wybrane geny związane z wirulencją i zdolnością adaptacji środowiskowej podkreśla potrzebę analizowania całego rodzaju *Listeria* w badaniach dotyczących bezpieczeństwa żywności. Wyniki badań własnych dostarczyły kompleksowej charakterystyki populacji *Listeria* spp. izolowanych z surowych ryb w północnej Polsce, obejmującej ocenę ich występowania, oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe, potencjału wirulencji, aktywności cytotoksycznej oraz zdolności do tworzenia biofilmu.

Słowa kluczowe: *Listeria spp.*, patogen żywności, lekowrażliwość, czynniki wirulencji, potencjał cytotoksyczny

2. Summary

Contamination of food with bacteria of the genus *Listeria* poses a significant problem in terms of food safety and public health, particularly in the context of unheated food products. Among *Listeria* spp., *Listeria monocytogenes* is of particular importance, as it is the causative agent of listeriosis – a zoonotic disease characterized by high rates of hospitalization and mortality in high-risk groups. Fish and fish products may constitute a significant link in the transmission of *Listeria* spp. within the food chain, as the aquatic environment is conducive to their survival and spread. At the same time, there is growing concern regarding the phenomenon of antimicrobial resistance observed in bacteria, including *Listeria* spp., which may lead to reduced effectiveness of infection treatment and facilitate the spread of resistance genes amongst microorganisms.

Data on the prevalence of antimicrobial resistance, virulence potential and cytotoxic properties of *Listeria* spp. bacteria isolated from raw fish available on the Polish market remain limited. The aim of this study was to comprehensively characterize *Listeria* spp. isolates obtained from raw fish sourced from various aquatic environments in northern Poland, including an assessment of prevalence, antimicrobial resistance profiles along with the detection of resistance genes, virulence genes, serogroup affiliation, biofilm-forming ability and cytotoxic activity. The study aimed to assess the risks associated with the presence of *Listeria* bacteria in raw fish and to determine their susceptibility to antimicrobial agents, as well as characteristics that may influence their survival and ability to colonies food production environments.

The study material consisted of 750 samples of raw fish sourced from various aquatic environments in northern Poland, including freshwater bodies with both flowing and standing water, as well as the Baltic Sea. Isolation of *Listeria* spp. was carried out in accordance with the procedure described in standard PN-EN ISO 11290-1:2017-07: Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. – Part 1: Detection method. The isolates obtained were subjected to species identification, followed by detailed phenotypic and molecular analysis. Antimicrobial susceptibility was assessed using the disc diffusion method with a panel of antimicrobial agents representing various therapeutic groups. Concurrently, an analysis of the presence of genes associated with antimicrobial resistance was carried out using polymerase chain reaction (PCR). To determine the pathogenic potential of the strains under investigation, an analysis was carried out to detect the presence of virulence genes, including key determinants associated

with invasion, intracellular survival and the spread of the bacteria within the host. For *L. monocytogenes* isolates, genotyping was also carried out to determine the serogroup affiliation of these strains, which is of epidemiological significance. The potential for colonizing the food production environment was assessed on the basis of biofilm-forming ability using qualitative and quantitative methods, together with the detection of the gene responsible for biofilm formation (*luxS*). The study was supplemented by an assessment of the cytotoxic potential of *Listeria* spp. isolates *in vitro* using eukaryotic cell lines. This multi-faceted research approach enabled a comprehensive characterization of the studied *Listeria* spp. population.

As a result of the analyses carried out, a total of 104 *Listeria* spp. isolates were identified, representing a prevalence of 13.9%. Among the strains examined, *L. seeligeri* (34.6%) and *L. welshimeri* (28.8%) were the most common, whilst *L. monocytogenes* and *L. innocua* accounted for 23.1% and 13.5% of all isolates, respectively. Phenotypic assessment of antimicrobial susceptibility revealed widespread resistance to oxacillin, observed in all isolates tested. Very high levels of resistance were also found against cefotaxime, clindamycin, cefoxitin, rifampicin and trimethoprim with sulfamethoxazole. A particularly worrying finding was the presence of multidrug resistance in almost all isolates tested, with all *L. monocytogenes* isolates meeting the criteria for multidrug-resistant strains. Isolates of this species were characterized by complete resistance to meropenem, cefoxitin, cefotaxime, rifampicin and trimethoprim-sulfamethoxazole, and also exhibited high levels of resistance to ciprofloxacin, clindamycin, tetracycline, erythromycin, benzylpenicillin and nitrofurantoin. Molecular analysis confirmed the presence of genes associated with antimicrobial resistance, the most frequently identified of which were *blaTEM*, as well as *ampC* and *ereB*. The results obtained indicate a widespread prevalence of resistance traits amongst *Listeria* bacteria associated with aquatic environments and fish products. At the same time, the high prevalence of multidrug-resistant strains suggests the possibility of ongoing selective pressure in the aquatic environment and the potential role of these ecosystems in the spread of resistance determinants. The study also provided data on the species diversity of *Listeria* populations present in raw fish, indicating that, alongside the pathogenic species, species traditionally considered non-pathogenic or opportunistic also play a significant role.

An analysis of virulence potential revealed marked differences between the species studied. *L. monocytogenes* isolates were characterized by the presence of numerous virulence determinants associated with the pathogenesis of infections. Most strains possessed the complete Listeria Pathogenicity Island 1 (LIPI-1), and all isolates were classified into serogroups 1/2a, 1/2c, 3a and 3c. Among *L. monocytogenes* strains, the *plcA*, *hlyA*, *mpl*, *inlA*,

inlC and *inlJ* genes were commonly present, whilst the *prfA* and *actA* genes were identified in the vast majority of isolates. The *iap* gene was also present with high frequency. The other *Listeria* species exhibited the presence of only selected virulence genes, mainly *plcA* and *mpl*, and did not possess the full set of determinants characteristic of *L. monocytogenes*. The virulence potential of *L. monocytogenes* isolates was further confirmed at the phenotypic level, as cytotoxic activity against four eukaryotic cell lines was observed exclusively in this species. Strains *of L. innocua*, *L. seeligeri* and *L. welshimeri* did not exhibit cytotoxic activity despite the presence of individual virulence-associated genes.

The ability to form biofilm was a characteristic of most of the isolates studied. In quantitative studies, more than two-thirds of the isolates demonstrated the ability to form biofilm, indicating that this property is widespread amongst *Listeria* bacteria present in raw fish. Analysis of *the luxS* gene revealed its presence in only some of the isolates; however, no significant correlation was found between the presence of this gene and the ability to form biofilm.

The results obtained indicate that raw fish may be a source of *L. monocytogenes* strains that possess, simultaneously, numerous virulence determinants, a high level of antimicrobial resistance, and the ability to persist in the environment through biofilm formation. At the same time, the presence of other *Listeria* species possessing selected genes associated with virulence and environmental adaptability highlights the need to analyze the entire genus *Listeria* in food safety research. The results of our own research have provided a comprehensive characterization of *Listeria* spp. populations isolated from raw fish in northern Poland, including an assessment of their prevalence, antimicrobial resistance, virulence potential, cytotoxic activity and ability to form biofilms.

Keywords: *Listeria* spp., food pathogen, antimicrobial susceptibility, virulence factors, potential cytotoxicity

3. Wstęp

Bakterie należące do rodzaju *Listeria* stanowią przedmiot rosnącego zainteresowania naukowego, co wynika zarówno z ich szerokiego rozprzestrzenienia się w środowisku naturalnym jak i z systematycznie wzrastającej liczby przypadków listeriozy rejestrowanych w krajach Unii Europejskiej i świata. Z raportu Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA), opublikowanego w 2025 roku wynika, że listerioza zajmuje czwarte miejsce wśród najczęściej odnotowywanych przypadków zoonoz w Europie.

Obecność licznych mechanizmów adaptacyjnych *Listeria* spp. umożliwia ich przeżywanie i namnażanie się w ekstremalnych warunkach. Zdolności te sprzyjają przetrwaniu *Listeria* spp. w środowisku produkcji i przetwarzania zarówno żywności jak i pasz, znacząco zwiększając ryzyko kontaminacji produktów spożywczych (1, 2, 3, 4, 5, 6). Producenci żywności coraz częściej zmagają się z problemem kolonizacji środowiska produkcyjnego przez *Listeria* spp. stanowiącej w nim istotny mikrobiologiczny czynnik ryzyka bezpieczeństwa żywności (7). Jednocześnie udowodniono, że główną drogę transmisji zakażeń u ludzi stanowi spożycie żywności zanieczyszczonej *Listeria* spp., w szczególności *Listerią monocytogenes*. Ze względu na wysoki odsetek przypadków śmiertelnych w przebiegu listeriozy, zoonoza ta uznawana jest za jedną z najgroźniejszych i najbardziej śmiertelną chorobę przenoszoną drogą pokarmową, wywołaną przez patogeny jelitowe (5, 6).

3.1 Charakterystyka i klasyfikacja *Listeria* spp. i *L. monocytogenes*

L. monocytogenes została po raz pierwszy wyizolowana w 1924 roku z próbek pobranych od świnek morskich i królików chorujących na posocznicę, a następnie opisana przez Murray'a w 1926 roku pod nazwą *Bacterium monocytogenes* (8). W 1940 roku Harvey Pirie zaproponował zmianę nazwy rodzaju na *Listeria*, upamiętniające w ten sposób Josepha Listera – pioniera nowoczesnej chirurgii antyseptycznej (9). Do roku 1961 *L. monocytogenes* była jedynym przedstawicielem rodzaju *Listeria*. Wraz z postępem badań nad występowaniem bakterii z rodzaju *Listeria* w kolejnych latach opisano i włączono nowe gatunki. Rozwój fenotypowych oraz genotypowych metod identyfikacji drobnoustrojów umożliwił dokładne różnicowanie gatunków w obrębie rodzaju *Listeria*.

W przeciągu dwóch ostatnich dekad, rodzaj *Listeria* uległ znacznemu poszerzeniu. Z sześciu klasycznych gatunków w roku 2010 do 28 gatunków opisanych obecnie (10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26). Efektem badań naukowych było podzielenie rodzaju *Listeria* na dwie charakterystyczne grupy: *sensu lato* i *sensu stricto*,

obejmujące zarówno gatunki patogenne jak i szeroko rozpowszechnione, niepatogenne szczepy środowiskowe (27).

Mikroorganizmy należące do rodzaju *Listeria* to Gram-dodatnie, nieprzetrwalnikujące pałeczki o wymiarach 0,5 x 0,5–2µm. Komórki te występują pojedynczo lub w postaci krótkich łańcuszków**,** nie wytwarzają spor ani otoczek. Pod względem fizjologicznym są katalazo-dodatnie oraz oksydazo-ujemne, a ich metabolizm ma charakter fakultatywnie beztlenowy (28, 29). Charakteryzują się one wysokim stopniem przystosowania do zmiennych warunków środowiskowych, co umożliwia im przeżywanie i namnażanie się w szerokim zakresie temperatur (od –2°C do +45°C) i pH (od 4,5 do 9,6) oraz przy znacznym zasoleniu. Całkowita inaktywacja komórek następuje dopiero przy temperaturze przekraczającej 75°C. Cechą diagnostycznie istotną gatunków bakterii należących do rodzaju *Listeria* jest obserwowana w temperaturze 25°C zdolność ruchu (3, 30, 31), jednak na przestrzeni ostatnich lat wyizolowano szczepy nie wykazujące tej cechy tj.: *L. immobilis*, *L. portnoyi*, *L. rustica* (25).

Poszczególne szczepy *Listeria* spp. w obrębie danego gatunku, różnią się obecnością oraz strukturą determinant antygenowych, zlokalizowanych na powierzchni komórki, do których należą kwasy lipotejchojowe oraz białka błonowe (32). Natomiast kombinacja antygenów obecnych w komórce bakteryjnej, ciepłostabilnego antygenu somatyczny O (grupy I-XV) oraz ciepłolabilnego antygenu rzęskowego H (warianty A-D) determinuje podział *Listeria* spp. na serotypy (33). Wśród szczepów *L. monocytogenes* wyróżniono 13 serotypów tj. 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7 (32, 34), 7 serotypów odnotowano u *L. seeligeri* tj. 1/2a, 1/2b, 3b, 4a, 4b, 4c, 6b, u *L. innocua*, *L. grayi*, *L. welshimeri* - 1/2b, 6a, 6b, natomiast u *L. ivanovii* określono tylko jeden serotyp (33, 35). Serotypy mogą być przyporządkowane do trzech genotypów genu *actA*, odpowiedzialnego za indukowanie polimeryzacji aktyny komórek gospodarza, co odzwierciedla trzy główne linie filogenetyczne w obrębie rodzaju *Listeria*. Klasyfikacja ta ma istotne znaczenie w analizie pokrewieństwa ewolucyjnego oraz zróżnicowania epidemiologicznego tych drobnoustrojów (36). Genotyp I obejmuje serotypy 1/2b, 3b, 4b, 4d oraz 4e. W skład II genotypu wchodzą serotypy 1/2a, 1/2c, 3a, 3c, zaś III genotyp zawiera serotypy 4a i 4c (37).

Z punktu widzenia zagrożenia dla zdrowia człowieka najistotniejszym gatunkiem należącym do rodzaju *Listeria* jest patogenna *L. monocytogenes*. Spośród trzynastu wyróżnionych w obrębie tego gatunku serotypów, za chorobotwórcze dla człowieka uznaje się serotypy 1/2a, 1/2b, które najczęściej izolowane są z żywności i serotyp 4b - charakterystyczny dla izolatów klinicznych (38). Wymienione serotypy odpowiadają za 95% zdiagnozowanych przypadków listeriozy u ludzi (16, 39), z czego przyczyną aż 50% zachorowań w skali

światowej jest serotyp 4b (40). Wśród zwierząt szczególnie podatne na listeriozę są przeżuwacze. W ich przypadku najczęściej chorobę wywołuje *L. monocytogenes,* ale jednocześnie obserwuje się coraz więcej przypadków zachorowań wywołanych przez *L. ivanovii* (41), która to niezwykle rzadko odpowiada za przypadki listeriozy u ludzi (42). Gatunki takie jak *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. innocua* są powszechnie klasyfikowane jako gatunki niepatogenne, jednak pojawiają się doniesienia o przypadkach zakażeń z ich udziałem (43). Najnowsze doniesienia naukowe sugerują konieczność prowadzenia badań nad potencjałem chorobotwórczym szczepów w obrębie rodzaju *Listeria* uważanych dotychczas za niepatogenne.

3.2 Występowanie *L. monocytogenes* w środowisku i w żywności pochodzenia zwierzęcego

L. monocytogenes jest szeroko rozpowszechniona w środowisku naturalnym i jest izolowana z licznych źródeł (44, 45). Jej obecność wykazano w próbkach gleby, wodach powierzchniowych, osadach morskich, ściekach oraz na powierzchniach roślin. Powszechne występowanie tego drobnoustroju sprzyja jego przenikaniu do środowiska produkcji i przetwórstwa żywności oraz pasz. Psychrotrofowy charakter *L. monocytogenes* sprawia, że drobnoustrój ten stanowi jedno z najistotniejszych zagrożeń mikrobiologicznych związanych z chłodniczym przechowywaniem żywności oraz kiszonek paszowych. Udowodniono, że długotrwałe przechowywanie produktów w warunkach chłodniczych zwiększa ryzyko kontaminacji żywności (2, 46, 47, 48, 49).

Rozprzestrzenienie się *L. monocytogenes* w środowisku produkcyjnym, kolonizacja jak i adaptacja do zmieniających się warunków bytowania możliwe jest również dzięki zdolności do tworzenia biofilmu (50). W konsekwencji *L. monocytogenes* może występować w szerokim spektrum produktów spożywczych. Badania z ostatnich lat potwierdzają obecność tego drobnoustroju między innymi w rybach surowych i wędzonych, owocach morza, surowym mięsie, niepasteryzowanym mleku, dojrzewających serach miejskich, śmietanie, warzywach czy owocach, a także w produktach mrożonych pochodzenia zwierzęcego i roślinnego (51, 52).

Bytowanie *L. monocytogenes* w środowisku i organizmach wodnych jest przyczyną kontaminacji produktów rybnych pochodzących ze środowiska naturalnego, przeznaczonych na cele spożywcze (53). Obecność patogenu stwierdzano szczególnie często w rybach wędzonych na zimno, gdzie odsetek zanieczyszczonych próbek wynosił od 34 do 60%, natomiast rzadziej w owocach morza poddanym obróbce termicznej, dla których notowano

kontaminację na poziomie od 4 do 12% (54). Jak wykazano, długotrwałe wędzenie na zimno w temp. 17.1 – 21.18°C eliminuje *L. monocytogenes*, zaś krótsze wędzenie w wyższych temperaturach (22.2 – 30°C) umożliwia jej przeżycie i w konsekwencji namnażanie w gotowym produkcie spożywczym (55). Jednocześnie, podczas magazynowania produktu gotowego, *L. monocytogenes* wykazuje umiarkowane tempo wzrostu w rybach wędzonych na zimno, natomiast szybsze namnażanie obserwuje się w rybach wędzonych na ciepło (54).

Mniej wiadomo na temat rozpowszechnienia *L. monocytogenes* w surowych rybach. Brakuje analiz prewalencji *Listerii* wśród ryb pochodzących z różnych środowisk wodnych stanowiących z jednej strony surowiec do produkcji żywności, z drugiej, wektor transmisji patogenu do środowiska zakładu przetwórczego. Dokładna dawka zakaźna *L. monocytogenes* nie została dotychczas jednoznacznie określona. Aktualna wiedza naukowa wskazuje jednak, że obecność tego patogenu w żywności na poziomie $\geq 10^3$ jtk/g może prowadzić do wystąpienia listeriozy przenoszonej droga pokarmową, szczególnie u osób należących do grup zwiększonego ryzyka. Natomiast niższe poziomy zanieczyszczenia są zazwyczaj związane z mniejszym prawdopodobieństwem zachorowania (54).

3.3 Listerioza jako zagrożenie zdrowia publicznego w krajach Unii Europejskiej

W krajach Unii Europejskiej listerioza jest chorobą podlegającą rejestracji, a dane dotyczące przypadków zachorowań oraz zanieczyszczenia *Listeria* spp. produktów spożywczych są przekazywane do Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności. W 2024 roku w krajach Unii Europejskiej potwierdzono 3041 przypadków zakażeń wywołanych przez *L. monocytogenes*, co odpowiadało wskaźnikowi zgłaszalności wynoszącemu 0,69 przypadków na 100 000 mieszkańców (56). Na przestrzeni ostatnich 10 lat obserwowany jest istotny wzrost potwierdzonych przypadków listeriozy ($p<0,01$) w krajach UE (z 2536 przypadków w 2016 roku do 3041 przypadków choroby w 2024 roku) (56, 57).

Listerioza u ludzi może mieć zróżnicowany obraz kliniczny. Miejscem intensywnego namnażania się bakterii i miejscem agregacji patogenu jest przede wszystkim wątroba i trzustka, jednak może bytować również w płynie mózgowo-rdzeniowym oraz we krwi, stąd choroba może mieć przebieg od niespecyficznego, grypopodobnego do zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych i ciężkiej posocznicy (58). Sporadycznie obserwuje się postać jelitową z bólem brzucha i biegunką. Osobami szczególnie narażonymi na zakażenie są osoby z grupy wysokiego ryzyka tzw. YOPI (ang. Young, Old, Pregnat, Immunocompromised) czyli dzieci,

kobiety w ciąży, osoby starsze oraz te z osłabionym układem odpornościowym (59) jak również alergicy, diabetycy, osoby po przeszczepach (60), noworodki i niemowlęta w wieku okołoporodowym (33). Analiza klinicznych przypadków listeriozy wskazuje na występowanie tropizmu *L. monocytogenes* w kierunku komórek centralnego układu nerwowego, zaś u kobiet ciężarnych w kierunku komórek łożyska i płodu (58, 61, 62). Jednakże nie możemy zapominać, że *L. monocytogenes* może wywołać objawy chorobowe również u ludzi bez deficytów immunologicznych (63).

Głównym źródłem zakażenia człowieka jest przede wszystkim zanieczyszczona *L. monocytogenes* żywność. Z opublikowanego przez EFSA (2025) raportu wynika, że *L. monocytogenes* była najczęściej izolowana z produktów mięsnych – kiełbas fermentowanych (6,6% prób przebadanych), ryb świeżych (2,9%.) oraz serów twardych (1,6%)(56).

Światowy wzrost spożycia ryb i owoców morza zwiększa znaczenie monitorowania zagrożeń mikrobiologicznych związanych z tym sektorem żywnościowym. W Polsce na przestrzeni ostatnich lat odnotowuje się wzrost spożycia ryb i owoców morza, co może zwiększać narażenie konsumentów na listeriozę. Brak jest jednak danych oceniających potencjał zoonotyczny *Listerii*, w tym *L. monocytogenes* w surowych rybach pochodzących z północno-wschodniej Polski, regionu obejmującego liczne zbiorniki śródlądowe oraz obszary związane z Morzem Bałtyckim.

3.4 Mechanizmy chorobotwórczości oraz czynniki determinujące wirulencję *Listeria* spp. i *L. monocytogenes*

Patogen dostaje się do organizmu głównie droga alimentarną, chociaż jak wykazano u zwierząt miejscem wniknięcia mogą być również spojówki, jama nosowa czy drogi rodne. Infekcja enterocytów jelita cienkiego zaczyna się od procesu indukowanej fagocytozy. Kluczową rolę w tym etapie odgrywa interakcja bakteryjnych białek powierzchniowych, takich jak InlA i InlB oraz białka Ami ze swoistymi receptorami powierzchniowymi komórek gospodarza, głównie kadheryną E. Etap ten jest początkiem wniknięcia patogenu do komórek i zamknięcie go w fagosomie. Następnie *L. monocytogenes*, produkując listeriolizynę O, fosfolipazę B oraz hemolizynę powoduje degradacje błony fagosomalnej i przejście bakterii do cytoplazmy gospodarza. W środowisku cytoplazmatycznym dochodzi do intensywnego namnażania drobnoustroju w procesie replikacji cytozolowej. W tym samym momencie dochodzi do poboru aktyny z cytoszkieletu komórki gospodarza, w czym uczestniczy bakteryjne białko ActA, powodując powstanie „komety listeryjnej” w jednym z biegunów

komórki. W błonie komórkowej tworzą się pseudopody (wypustki błony komórkowej ze znajdującym się wewnątrz patogenem), które następnie ulegają fagocytozie przez sąsiednie komórki. W wyniku tego procesu powstaje fagosom z podwójną membraną i *L. monocytogenes* w środku. Dzięki produkcji listeriolizyny O, fosfolipazy A i B patogen degraduje błony wtórnego fagosomu i uwalnia się do cytoplazmy zainfekowanej komórki, gdzie następuje reinicjacja cyklu zakażenia. Dzięki tym procesom *L. monocytogenes* namnaża się i rozprzestrzenia pomiędzy komórkami. Pokonując barierę jelitową, patogen wraz z krwioobiegiem i limfą, dociera do wątroby i śledziony. Infekcja tych narządów stanowi kluczowy etap rozwoju choroby. Po okresie 20 – 30 dni patogen jest „wyrzucany" do krwioobiegu i rozsiany po całym organizmie (58, 61, 62).

Patogenność *L. monocytogenes* jest determinowana przez liczne czynniki wirulencji, do których zalicza się głównie listeriolizynę O (LLO) i białko ActA, ale również fosfolipazę C, specyficzną dla fosfatydylocholiny (PlcB, lecytynaza), fosfolipazę C specyficzną dla fosfatydyloinozytolu (PI-PLC, PlcA) czy metaloproteazę. Geny kodujące wymienione czynniki patogenności zlokalizowane są w obrębie chromosomu bakteryjnego, w sąsiadujących ze sobą regionach, a ich ekspresja podlega regulacji przez aktywator transkrypcji PrfA (58). Ponadto w patogenezie listeriozy uczestniczą również inne determinanty wirulencji, takie jak internaliny (InlA i InlB), białko CwhA (ang. cell wall hydrolase A), białko LmaA , dysmutaza nadtlenków czy katalaza (64).

Główny klaster genów wirulencji tworzy w genomie *L. monocytogenes* tzw. wyspę patogenności LIPI-1.Zgodnie z aktualną wiedzą, LIPI-1 jest konserwatywnym regionem chromosomalnym o długości około 9kb złożoną z sześciu genów: *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* oraz *plcB*, których skoordynowana ekspresja warunkuje zdolność bakterii do inwazji komórek, przeżycia wewnątrz komórek oraz rozprzestrzeniania się w tkankach gospodarza (58). Gen *prfA* koduje główny regulator transkrypcyjny kontrolujący ekspresje pozostałych determinant wirulencji. Produkty genów *plcA* i *plcB* uczestniczą w degradacji błon komórkowych, znacząco ułatwiając uwalnianie bakterii z fagosomu oraz ich szerzenie się pomiędzy komórkami. Kluczową rolę w ucieczce do cytoplazmy komórek gospodarza jest listeriolizyna O, kodowana przez gen *hlyA*. Z kolei gen *mpl* koduje metaloproteazę, odpowiedzialna za aktywację fosfolipazy PlcB, natomiast *actA* warunkuje polimeryzacje aktyny gospodarza, umożliwiając tym samym wewnątrzkomórkowy ruch bakterii oraz ich transfer do komórek sąsiednich (58).

W kontekście patogenezy, istotnymi genami są również należące to tak zwanej rodziny genów internalin (*Internalin gene family*) *inlA*, *inlJ* i *inlC*, których ekspresja wiąże się głównie

z adhezją i inwazją komórek gospodarza (58) jak również gen *luxS*, którego ekspresja warunkuje formowanie biofilmu w środowisku (65).

Ze względu na fundamentalne znaczenie tych genów w patogenezie listeriozy, obecność kompletnego klastra LIPI-1 jest uznawana za jeden z najważniejszych molekularnych wskaźników potencjału chorobotwórczego *L. monocytogenes*. Analiza występowania tych determinant ma istotne znaczenie dla oceny ryzyka epidemiologicznego oraz bezpieczeństwa żywności, szczególnie w odniesieniu do produktów pochodzenia zwierzęcego, i pozwala odpowiedzieć na pytanie: czy i jaki potencjał chorobotwórczy niosą ze sobą szczepy *L. monocytogenes* izolowane z surowych ryb.

3.5 Wrażliwość *Listeria* spp. i *L. monocytogenes* na substancje przeciwdrobnoustrojowe

Wśród szczepów *Listeria* spp. w tym u *L. monocytogenes* oporność na substancje przeciwdrobnoustrojowe stwierdzana jest stosunkowo rzadko. Drobnoustrój ten uznany jest za naturalnie wrażliwy na wiele istotnych klinicznie grup antybiotyków między innymi na penicyliny, aminopenicyliny, karboksypenicyliny, karbapeny, ryfamycyny, tetracykliny i aminoglikozydy. Wrażliwość ta znajduje odzwierciedlenie w niskich wartościach minimalnego stężenia hamującego (MIC) dla wymienionych grup antybiotyków. Stwierdzono jednak, że *L. monocytogenes* wykazuje naturalną oporność na niektóre antybiotyki, w tym cefalosporyny, zwłaszcza o szerokim spektrum działania takie jak cefotaksym i ceftazydym a także na fosfomycynę oraz monobaktamy. Może to się wiązać z istotnym ograniczeniem terapeutycznym i utrudniać skuteczne leczenie listeriozy przy zastosowaniu tych grup leków (6, 66). Podczas ciężkich przypadków choroby za terapię pierwszego wyboru uznaje się ampicylinę (lub amoksycylinę) w skojarzeniu z gentamycyną, natomiast u chorych wykazujących nadwrażliwość na β-laktamy rekomendowaną alternatywę stanowi trimetoprim – sulfametoksazol (67).

Oporność na substancje przeciwdrobnoustrojowe (AMR, *antimicrobial resistance*) u *Listeria* spp. rozwija się na drodze różnych mechanizmów molekularnych, przede wszystkim poprzez nabywanie mobilnych elementów genetycznych, takich jak samotransferujące się plazmidy, plazmidy mobilizowane oraz transpozony koniugacyjne. Związane jest też często z obecnością genów oporności, a w przypadku bakterii z rodzaju *Listeria* szczególne znaczenie mają geny związane z opornością na β-laktamy, makrolidy, sulfonamidy czy glikopeptydy (68, 69).

Dodatkowo rozwój oporności może być związany z występowaniem mutacji punktowych w genach kodujących miejsca docelowego działania substancji przeciwdrobnoustrojowych (44).

Wielolekooporność (*multidrug resistance, MDR*) u bakterii z rodzaju *Listeria*, szczególnie *L. monocytogenes*, stanowi istotny problem w kontekście zdrowia publicznego. Szczepy diagnozowane jako MDR są oporne na kilka klas środków przeciwdrobnoustrojowych jednocześnie, co może ograniczać skuteczność leczenia zakażeń oraz sprzyjać utrzymywaniu się i rozprzestrzenianiu się opornych populacji w środowisku i łańcuchu żywnościowym. Szczególną uwagę należy poświęcić aspektowi występowania izolatów charakteryzujących się wielolekoopornością przy jednoczesnym występowaniu genów wirulencji. Monitorowanie MDR u *L. monocytogenes* powinno stanowić istotny element strategii kontroli zagrożeń biologicznych zgodnie z koncepcja One Health, uwzględniający wzajemne powiązania pomiędzy środowiskiem, zwierzętami i człowiekiem. (70).

4. Cele i hipotezy badawcze

4.1 Cele badawcze

Prezentowane w pracy badania podjęto w celu uzupełnienia istniejących luk poznawczych dotyczących epidemiologii, oporności przeciwdrobnoustrojowej, potencjału wirulencji oraz zdolności adaptacyjnych bakterii *Listeria* spp. występujących w surowych rybach. Kompleksowe badania izolatów *Listerii spp* pozwoliło na uzyskanie nowych danych istotnych zarówno z punktu widzenia zdrowia publicznego, jak i bezpieczeństwa żywności oraz wpisuje się w aktualne światowe kierunki badań nad zagrożeniami związanymi z *Listeria* spp. w produktach rybołówstwa.

Szczegółowym celem badań była charakterystyka bakterii z rodzaju *Listeria* izolowanych z wód słodkowodnych Warmii i Mazur oraz z wód Morza Bałtyckiego. Określenie częstość występowania *Listeria* spp. i *L. monocytogenes* w analizowanym materiale jak również identyfikacja grup serologicznych oraz ocena potencjału patogennego na podstawie obecności genów wirulencji, zdolności do tworzenia biofilmu i aktywności cytotoksycznej.

Ocena lekowrażliwości szczepów względem substancji przeciwdrobnoustrojowych stosowanych w terapii listeriozy w celu określenia znaczenia izolatów pod względem epidemiologicznym i potencjalnego zagrożenia dla zdrowia publicznego.

4.2 Hipotezy badawcze

Surowe ryby mogą stanowić istotny rezerwuar bakterii z rodzaju *Listeria*, w tym szczepów *Listeria monocytogenes*, charakteryzujących się dużym potencjałem patogennym, opornością na wiele grup substancji przeciwdrobnoustrojowych oraz zdolnością do tworzenia biofilmu, co może stanowić istotne zagrożenie zdrowia publicznego.

Hipotezy szczegółowe:

1. Ryby pochodzące z różnych środowisk wodnych stanowią istotne źródło bakterii z rodzaju *Listeria*, w tym gatunku *Listeria monocytogenes*.
2. Izolaty *Listeria* spp. pochodzące z ryb wykazują wysoki poziom oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe a wśród nich są szczepy wielolekooporne (MDR).
3. Fenotyp oporności przeciwdrobnoustrojowej izolatów *Listeria* spp. jest związany z obecnością określonych genów warunkujących tą oporność.
4. Szczepy *L. monocytogenes* wyizolowane z ryb posiadają kluczowe geny wirulencji determinujące ich patogenność wraz ze zdolnością do wywoływania efektu cytotoksycznego wobec komórek eukariotycznych.

5. Zdolność do tworzenia biofilmu jest powszechną cechą gatunków z rodzaju *Listeria* izolowanych z ryb i może sprzyjać ich przetrwaniu w łańcuchach produkcji żywności.
6. Gatunki uznawane za niepatogenne (*L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*) mogą pełnić funkcje środowiskowego rezerwuaru genów związanych z wirulencją i przetrwaniem bakterii w środowisku.

5. Materiał i metody

5.1 Izolacja *Listeria* spp. i *L. monocytogenes*

Badania prowadzono w okresie od stycznia 2020 roku do grudnia 2022 roku. Materiał badawczy obejmujący łącznie 750 próbek surowych ryb pozyskano z obszaru północnej Polski. Próby pobierano z trzech odmiennych środowisk wodnych, różniących się zarówno charakterystyką hydrologiczną, jak i stopniem zasolenia. Analizowane próbki ryb pochodziły ze zbiorników słodkowodnych o wodzie stojącej (n = 250), zbiorników słodkowodnych o wodzie przepływowej (n = 250) oraz z akwenu słonowodnego - Morza Bałtyckiego (n = 250). Cały materiał badawczy pozyskano z pięciu lokalnych targowisk rybnych zlokalizowanych na terenie północnej Polski oraz z gospodarstwa rybackiego w Swaderkach (Polska, Województwo Warmińsko – Mazurskie). Próbki pochodzące ze zbiorników słodkowodnych o wodzie stojącej obejmowały osobniki wyłącznie karasia pospolitego (*Carassius carassius*), natomiast materiał pobrany ze środowiska słodkowodnego z wodą przepływową obejmował 100 osobników karasia pospolitego, 75 osobników jesiotra (*Acipenseridae*) oraz 75 osobników pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*). Próbki pochodzące ze środowiska słonowodnego obejmowały natomiast 250 osobników śledzia atlantyckiego (*Clupea harengus*).

Każdą próbkę umieszczono indywidualnie w sterylnym worku plastikowym, a następnie transportowano do laboratorium w warunkach chłodniczych, co miało na celu zapewnienie właściwego zabezpieczenia materiału biologicznego oraz zachowania jego jakości i integralności do dalszych analiz mikrobiologicznych.

Izolacje bakterii *Listeria* spp. przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w normie PN-EN ISO 11290-1:2017-07: Mikrobiologia łańcucha żywnościowego – Horyzontalna metoda wykrywania i oznaczania liczby *Listeria monocytogenes* i innych *Listeria* spp. – Część 1: Metoda wykrywania (71). W pierwszym etapie analizy 25 gram każdej próbki homogenizowano z 225 ml podłoża namnażającego Half-Frazer (Oxoid, Basingstoke, Wielka Brytania), po czym hodowle inkubowano w warunkach tlenowych w temperaturze 30°C przez 24 ± 2 godziny. Następnie 0,1 ml uzyskanej hodowli przenoszono do 10ml podłoża Frazer (Oxoid, Basingstoke, Wielka Brytania) i poddawano dalszej inkubacji w temperaturze 37°C przez kolejne 24 ± 2 godziny. Po inkubacji przesiano hodowlę na selektywne podłoża stałe: Ottaviano Agosti ALOA (Oxoid, Basingstoke, Wielka Brytania) oraz PALCAM agar (Oxoid, Basingstoke, Wielka Brytania) w celu wzrostu charakterystycznych kolonii. Po inkubacji trwającej 24 – 48 godzin w temperaturze 37°C oceniono morfologię wyrosłych kolonii pod

kątem charakterystycznych fenotypowych cech charakterystycznych dla bakterii z rodzaju *Listeria*. Z każdej płytki wybierano trzy kolonie wykazujące typową morfologię *Listeria* (połyskujące kolonie o zabarwieniu niebiesko – zielonym), które traktowano jako oddzielne izolaty bakteryjne. Kolonie przesiewano na podłoże TSEYA (Oxoid, Basingstoke, Wielka Brytania) i inkubowano w temperaturze 37°C przez 18 ± 2 godziny. Uzyskane kolonie poddawano następnie wstępnej identyfikacji metodą barwienia Grama w celu potwierdzenia ich cech morfologicznych i przynależności do bakterii Gram-dodatnich. Wstępną identyfikacje gatunkową izolatów *Listeria* przeprowadzono z wykorzystaniem biochemicznego zastawu identyfikującego Microbact *Listeria* 12L (Oxoid, Basingstoke, Wielka Brytania), umożliwiającego ocenę zdolności do hydrolizy eskuliny, właściwości hemolitycznych oraz metabolizowania wybranych węglowodanów. Wszystkie etapy identyfikacji przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producenta testu.

Wyizolowane szczepy określone jako przynależne do rodzaju *Listeria* spp. przechowywano w temperaturze – 80°C w 20% roztworze glicerolu, co umożliwiło zachowanie ich żywotności oraz wykorzystanie do dalszych analiz.

5.2 Charakterystyka molekularna *Listeria* spp. i *L. monocytogenes*

Z uzyskanych izolatów *Listeria* spp. izolowano genomowe DNA z wykorzystaniem komercyjnego zastawu (A&A Biotechnology, Gdynia, Polska), stosując lizozym oraz mutanolizynę jako enzymy umożliwiające skuteczną lizę ściany komórkowej. 1 ml 12-18 godzinnej hodowli analizowanego szczepu poddawano wirowaniu, a uzyskany osad komórkowy zawieszano w buforze lizującym zawierającym lizozym (A&A Biotechnology, Gdynia, Polska), mutanolizynę (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) oraz proteinazę K (A&A Biotechnology, Gdynia, Polska). Przygotowana mieszaninę inkubowano w temperaturze 50°C przez 30 minut, a następnie intensywnie mieszano z wykorzystaniem wytrząsarki typu vortex oraz poddawano wirowaniu, w celu uzyskania oczyszczonego DNA.

Stężenie oraz czystość wyizolowanego DNA oceniono spektrofotometrycznie przy użyciu sprzętu BioSpectrometer (Eppendorf, Hamburg, Niemcy), wykonując pomiary absorbancji przy długości fali 260 nm. Do dalszych badań klasyfikowano próbki o stężeniu DNA mieszczącym się w zakresie od 80 ng/µl do 180 ng/µl. Wyizolowany materiał przechowywano w temperaturze – 20°C do momentu przeprowadzenia dalszych analiz.

W celu potwierdzenie przynależności gatunkowej uzyskanych szczepów bakteryjnych zastosowano reakcje łańcuchową polimerazy (PCR), ukierunkowaną na amplifikacje genu *prs*,

wykorzystywanego do identyfikacji bakterii z rodzaju *Listeria*, a także genów swoistych gatunkowo, takich jak *lmo1030* charakterystyczny dla *Listerii monocytogenes*, *namA* dla *Listerii ivanovii* oraz innych markerów specyficznych dla poszczególnych gatunków. Sekwencje zastosowanych starterów w korelacji do określonych gatunków rodzaju *Listeria* przedstawiono w Tabeli 1.

Reakcje PCR przeprowadzono w całkowitej objętości mieszaniny reakcyjnej równej 25 µl, zawierającej 2 µl matrycowego DNA, 12,5 µl mieszaniny MixPCR (A&A Biotechnology, Gdynia, Polska) zawierającej $MgCl_2$ w stężeniu 3 mM, dNTP w stężeniu 0,2 mM, startery w stężeniu 0,5 mM oraz 1,25 U polimerazy Taq DNA, a także sterylną wodę dejonizowaną do uzupełnienia objętości reakcji.

W każdej serii reakcji PCR uwzględniono kontrole dodatnie obejmujące referencyjne szczepy *Listeria* spp.: *L. monocytogenes* (ATCC 13932), *L. ivanovii* (ATCC 19119), *L. innocua* (ATCC 33090), *L. welshimeri* (ATCC 35897), *L. seeligeri* (ATCC 35967), jak również kontrole ujemne zawierające mieszaninę reakcyjną pozbawioną matrycowego DNA.

Program amplifikacji obejmował początkową denaturację prowadzoną w temperaturze 95°C przez 5 minut, po której następowało 30 cykli obejmujących denaturacje w temperaturze 94°C przez 30 sekund, etap przyłączania starterów trwający 30 sekund oraz etap elongacji w temperaturze 72°C przez 45 sekund. Reakcję PCR kończono etapem końcowej elongacji prowadzona w temperaturze 72°C przez 5 minut.

Uzyskane produkty amplifikacji analizowano metodą elektroforezy w 2.0% żelu agarozowym (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) barwionym preparatem SimplySafe (EURx, Gdańsk, Polska). Wizualizacje uzyskanych produktów PCR przeprowadzono przy użyciu systemu GelDocEZ System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), natomiast wielkość amplikonów określono poprzez porównanie z markerem masy cząsteczkowej PerfectPlus 1kb DNA Ladder (EURx, Gdańsk, Polska).

Gatunek	Gen	Starter	Sekwencja (5'-3')	Wielkość amplikonu (pz)	Temperatura przyłączania starterów	Odniesienie
Listeria spp.	*prs*	prs-F	GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG	370	58°	72
		prs-R	CAAAGAAACCTTGGATTTGCGG			
Listeria spp.	*spp*	spp-F	CTGGCACGGACTTCCACTTAC	116	55°	73
		spp-R	TTTGAGCACCGATGATGATTT			
L. monocytogenes	*Glycosyl hydrolase*	lm-F	GTTCGTCGGTCCGTGGTA	583	55°	74
		lm-R	TTGGCAAGCAAGCAGTTCA			
L. ivanovii	*namA*	iv-F	CGAATTCCTTATTCACTTGAGC	463	53°	75
		iv-R	GGTGCTGCGAACTTAACTCA			
L. innocua	*lin0464*	in-F	CGCATTTATCGCCAAAACTC	749	54°	76
		in-R	TCGTGACATAGACGCGATTG			
L. seeligeri	*lmo0333*	se-F	GTACCTGCTGGGAGTACATA	673	52°	77
		se-R	CTGTCTCCATATCCGTACAG			
L. welshimeri	*scrA*	we-F	CGTGGCACAATAGCAATCTG	281	52°	77
		we-R	GACATGCCTGCTGAACTAGA			
L. grayi	*Oxidoreductase*	gr-F	GCGGATAAAGGTGTTCGGGTCAA	201	61°	77
		gr-R	ATTTGCTATCGTCCGAGGCTAGG			

Tabela 1. Sekwencje par starterów wykorzystanych do identyfikacji bakterii *Listeria* spp. metodą PCR.

5.3 Oznaczanie wrażliwości *Listeria* spp. i *L. monocytogenes* na substancje przeciwdrobnoustrojowe

Profile oporności przeciwdrobnoustrojowej szczepów *Listeria* analizowano metodą dyfuzyjno – krążkową zgodnie z wytycznymi Europejskiego Komitetu ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST) (78) oraz Instytutu Norm Klinicznych i Laboratoryjnych (Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI) (79). Dla każdego analizowanego szczepu przygotowano zawiesinę bakteryjna w soli fizjologicznej (BioMaxima, Lublin, Polska) o gęstości odpowiadającej wzorcowi 0,5 w skali McFarlanda. Otrzymane zawiesiny równomiernie nanoszono na powierzchnię podłoża stałego Mueller – Hinton Agar (Oxoid, Basingstoke, Wielka Brytania) suplementowanego 5% odwłóknioną krwią końską (BioMaxima, Lublin, Polska) oraz β-NAD w stężeniu 20mg/L (MH-F) (Oxoid, Basingstoke, Wielka Brytania). Na tak przygotowane podłoża aplikowano łącznie 17 krążków nasączonych substancjami przeciwdrobnoustrojowymi reprezentującymi 13 klas związków: ampicylinę (2µg), oksacylinę (1µg), meropenem (10µg), benzylopenicylinę (1U), cefoksytynę (30 µg), cefotaksym (30 µg), gentamycynę (10 µg), erytromycynę (15µg), ryfampicynę (5µg), wankomycynę (30µg), trimetoprim/sulfametoksazol (1,25–23,75µg), tetracyklinę (30µg), chloramfenikol (30µg), cyprofloksacynę (5µg), enrofloksacynę (5µg), nitrofurantoinę (100µg) oraz klindamycynę (2µg). Przygotowane posiewy inkubowano w warunkach tlenowych w temperaturze 37°C przez 18–24 godziny. Po zakończeniu inkubacji mierzono średnice stref zahamowania wzrostu, a uzyskane wyniki interpretowano zgodnie z kryteriami EUCAST dla *L. monocytogenes* (ampicylina, benzylopenicylina, meropenem, erytromycyna oraz trimetoprim/sulfametoksazol), *Staphylococcus* spp. (cefoksytyna, chloramfenikol, cyprofloksacyna, klindamycyna, gentamycyna, oksacylina, ryfampicyna oraz tetracyklina) oraz *Enterococcus* spp. (wankomycyna) (78). Wytyczne CLSI dla *Staphylococcus* sp. (79) wykorzystano dodatkowo do interpretacji wyników dla cefotaksymu i enrofloksacyny. Szczepy wykazujące oporność na co najmniej jeden lek przeciwdrobnoustrojowy w obrębie trzech lub więcej klas antybiotyków klasyfikowano jako szczepy wielolekooporne (80).

Oznaczenie lekowrażliwości *Listeria* spp. przeprowadzono z kontrola jakości z wykorzystaniem szczepów referencyjnych: *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 (ATCC, Manassas, VA, USA), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (ATCC, Manassas, VA, USA) oraz *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (ATCC, Manassas, VA, USA). Wszystkie oznaczenie

wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach w celu zapewnienia powtarzalności i wiarygodności uzyskanych wyników.

5.4 Molekularna identyfikacja genów warunkujących oporność na substancje przeciwdrobnoustrojowe u *Listeria* spp. i *L. monocytogenes*

Geny oporności na antybiotyki identyfikowano metodą PCR ukierunkowaną na wykrywanie 11 genów związanych z opornością wobec czterech grup środków przeciwdrobnoustrojowych: β-laktamów, makrolidów, glikopeptydów oraz sulfonamidów. Wśród genów związanych z opornością na β-laktamy analizowano obecność genów *penA*, *ampC*, *blaTEM* oraz *blaZ*. Oporność na makrolidy oceniano na podstawie obecności genów *ermB*, *ermA* oraz *ereB.;* oporność na glikopeptydy została określona poprzez detekcję genów *vanA* oraz *vanB*, natomiast odporność na sulfonamidy oceniono poprzez detekcję genów *sulI* oraz *sulII.*

Procedura izolacji genomowego DNA, warunki reakcji PCR jak również wizualizację otrzymanych amplikonów przeprowadzono analogicznie do metody potwierdzenia przynależności gatunkowej wyizolowanych szczepów *Listeria* spp. Startery wykorzystane do detekcji genów oporności na antybiotyki oraz temperatura ich przyłączania przedstawiono w Tabeli 2.

Grupa substancji przeciwdrobnoustrojowych	GEN	STARTER	SEKWENCJA (5'-3')	Wielkość amplikonu (bp)	Temperatura przyłączania starterów	Źródło
β-LAKTAMY	*penA*	penA-F	ATCGAACAGGCGACGATGTC	500	52°	81
		penA-R	GATTAAGACGGTGTTTTACGG			
	ampC	ampC-F	TTCTATCAAMACTGGCARCC	550	50°	82
		ampC-R	CCYTTTTATGTACCCAYGA			
	bla$_{TEM}$	bla-F	TTTCGTGTCGCCCTTATTCC	690	60°	82
		bla-R	CCGGCTCCAGATTTATCAGC			
	blaZ	blaZ-F	ACTTCAACACCTGCTGCTTTC	490	60°	82
		blaZ-R	TGACCACTTTTATCAGCAACC			
SULFONAMIDY	*sulI*	sulI-F	GTGACGGTGTTCGGCATTCT	779	68°	83
		sulI-R	TCCGAGAAGGTGATTGCGCT			
	sulII	sulII-F	CGGCATCGTCAACATAACCT	721	66°	83
		sulII-R	TGTGCGGATGAAGTCAGCTC			
MACROLIDY	*ermB*	ermB-F	GAAAAGGTACTCAACCAAATA	639	52°	81
		ermB-R	AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC			
	ermA	ermA-F	AACACCCTGAACCCAAGGGACG	420	62°	81
		ermA-R	CTTCACATCCGGATTCGCTCGA			
	ereB	ereB-F	AGAAATGGAGGTTCATACTTACCA	546	53°	81
		ereB-R	CATATAATCATCACCAATGGCA			
GLIKOPEPTYDY	*vanA*	vanA-F	CATGACGTATCGGTAAAATC	885	52°	81
		vanA-R	ACCGGGCAGRGTATTGAC			
	vanB	vanB-F	CATGATGTGTCGGTAAAATC	882	52°	81
		vanB-R	ACCGGGCAGRGTATTGAC			

Tabela 2. Zestawienie par starterów wykorzystanych do amplifikacji genów warunkujących oporność na substancje przeciwdrobnoustrojowe w izolatach *Listeria* spp.

5.5 Molekularna analiza genów wirulencji oraz przynależności do genoserogrupy wśród izolatów *Listeria* spp.

Molekularne badanie przesiewowe izolatów przeprowadzono metodą konwencjonalnej reakcji PCR w celu wykrycia panelu specyficznych markerów genetycznych. Panel ten obejmował dziewięć genów związanych z wirulencją wyizolowanych szczepów *Listeria* spp. (*iap, plcA, hlyA, prfA, actA, inlJ, inlA, inlC, mpl*) oraz jeden gen związany z tworzeniem biofilmu (*luxS*). W przypadku szczepów *L. monocytogenes* zastosowano multipleksową reakcje PCR do genoserogrupowania poprzez amplifikację markerów lmo0737 oraz ORF2819. Wykorzystane do amplifikacji startery oligonukleotydowe zostały przedstawione w Tabeli 3.

Reakcje PCR przygotowano w końcowej objętości 25 µl. Każda mieszanina reakcyjna zawierała 12,5 µl PCR MixPlus Red (A&A Biotechnology, Gdynia, Polska), zawierającego polimerazę Taq, dNTP oraz $MgCl_2$, 10 pmol odpowiednich starterów forward i reverse oraz 10 ng oczyszczonego genomowego DNA, dodawanego w objętości 2 µl jako matryca reakcji.

Amplifikacje przeprowadzono w termocyklerze Mastercycler Vapo.protect pro. (Eppendorf, Hamburg, Niemcy). Program amplifikacji obejmował początkową denaturację prowadzoną w temperaturze 95°C przez 5 minut, po której następowało 30 cykli obejmujących denaturacje w temperaturze 94°C przez 30 sekund, etap przyłączania starterów trwający 30 sekund oraz etap elongacji w temperaturze 72°C przez 45 sekund. Reakcję PCR kończono etapem końcowej elongacji prowadzona w temperaturze 72°C przez 5 minut.

W celu walidacji wyników każda seria reakcji PCR obejmowała kontrole dodatnie zawierające DNA szczepów referencyjnych (*L. monocytogenes* ATCC 13932, *L. ivanovii* ATCC 19119, *L. innocua* ATCC 33090, *L. welshimeri* ATCC 35897 oraz *L. seeligeri* ATCC 35967; ATCC, Manassas, VA, USA), a także kontrolę ujemną niezawierającą matrycy DNA.

Uzyskane produkty amplifikacji analizowano metodą elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) przygotowanym w buforze 1×TAE oraz barwionym preparatem SimplySafe (EURx, Gdańsk, Polska). Rozdział elektroforetyczny prowadzono przy napięciu 70V przez 60 minut. Wielkość amplifikowanych fragmentów DNA określano poprzez porównanie z markerem masy cząsteczkowej DNA o zakresie 100–1000 pz (A&A Biotechnology, Gdynia, Polska), prowadzonym równolegle. Wizualizacje uzyskanych produktów PCR przeprowadzono przy użyciu systemu Gel-Doc-IT System (UVP, Warszawa, Polska).

Gen	Sekwencje starterów (5′→3′)	Wielkość amplikonu (pz)	Kodujące białko	Źródło
luxS	F:TGTTTTAGCGAAGACTTTAGCCGATGT	117	Produkcja biofilmu	84
	R:TCCGCAAGCTCTTTTGCGCCT			
iap	F: ACAAGCTGCACCTGTTGCAG	131	Białko związane z inwazją	85
	R: TGACAGCGTGTGTAGTAGCA			
plcA	F: CTCGGACCATTGTAGTCATCTT	326	Fosfolipaza C	85
	R: CACTTTCAGGCGTATTAGAAACGA			
hlyA	F: GCAGTTGCAAGCCTTGGAGTGTGAA	456	Listeriolizyna O	85
	R: GCAACGTATCCTTCCAGAGTGATCG			
prfA	F: ACCAATGGGATCCACAAGA	467	Centralny regulator wirulencji	85
	R: CAGCTGAGCTATGTGCGAT			
actA	F: CCAAGCGAGGTAAATACGGGA	650	Białko indukujące polimeryzację aktyny	85
	R: GTCCGAAGCATTTACCTCTTC			
inlJ	F:TGTAACCCCGCTTACACAGTT	238	Internalina J	86
	R:AGCGGCTTGGCAGTCTAATA			
inlA	F:CCTAGCAGGTCTAACCGCAC	255	Internalina A	86
	R:TCGCTAATTTGGTTATGCCC			
inlC	F: AATTCCCACAGGACACAACC	517	Internalina C	87
	R: CGGGAATGCAATTTTTCACTA			
mpl	F: GGCTCATTTCACTATGACGG	1473	Metaloproteaza	88
	R: GCTTCCCAAGCTTCAGCAACT			
lmo0737	F: AGGGCTTCAAGGACTTACCC	691	Marker serogroup (1/2a, 1/2c, 3a, 3c)	72
	R: ACGATTTCTGCTTGCCATTC			

ORF2819	F: AGCAAAATGCCAAAACTCGT R: CATCACTAAAGCCTCCCATTG	471	Marker serogroup (1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e)	72

Tabela. 3 Sekwencje starterów (5′→3′), rozmiary amplikonów dla genów wirulencji, genu produkcji biofilmu oraz markerów genoserogrupy u *Listeria monocytogenes.*

5.6. Ocena potencjału produkcji biofilmu szczepów *Listeria* spp. wyizolowanych z ryb

Zdolność do tworzenia biofilmu każdego wyizolowanego szczepu *Listeria* została oceniona przy użyciu dwóch metod diagnostycznych: jakościowego testu płytkowego oraz ilościowego testu spektrofotometrycznego.

Wstępna ocena potencjału produkcji biofilmu szczepów *Listeria* została przeprowadzona przy użyciu jakościowego testu na podłożu stałym Congo Red Agar (CRA) (Oxoid, Basingstoke, Wielka Brytania) zgodnie z metodologia opracowana na podstawie prac Freemana (1989), Atshan & Shamsudin (2011) oraz Arciola i wsp. (2002) (89, 90, 91). Wykorzystany test umożliwia ocenę produkcji zewnątrzkomórkowej macierzy polisacharydowej, stanowiącej podstawowy składnik biofilmu. Procedura badawcza polegała na naniesieniu jałową ezą czystego izolatu bakteryjnego na powierzchnię świeżo przygotowanej pożywki mikrobiologicznej CRA. Następnie inokulowane płytki poddawano dwuetapowej inkubacji: początkowo prowadzono inkubację tlenową w temperaturze 37°C przez 24 godziny, po czym następował dodatkowy etap inkubacji w ciemności przez 12 godzin w temperaturze pokojowej (około 21°C) mający na celu umożliwienie pełnego wykształcenia zabarwienia kolonii i podłoża.

Po zakończeniu inkubacji przeprowadzono wizualną ocenę kolonii pod kątem zdolności do wytwarzania macierzy zewnątrzkomórkowej. W celu zapewnienia obiektywnej i powtarzalnej klasyfikacji stopnia produkcji biofilmu zastosowano sześciostopniową skale barwną, według wzorcowej skali opisanej przez Arciola (91). Klasyfikując hodowle zgodnie z tą skalą, kolonie bardzo czarne i czarne klasyfikowano jako szczepy o dodatnim potencjale względem tworzenia biofilmu (P). Kolonie o ciemnym, niemal czarnym zabarwieniu oznaczono jako wykazujące pośredni potencjał produkcji biofilmu (I), natomiast kolonie które charakteryzowały się zabarwieniem od intensywnie czerwonego do bordowego określano jako niezdolne do produkcji biofilmu (N).

Następnie dokonano oceny ilościowej, zgodnie z protokołem opisanym przez Ebrahimi i wsp. (92), biomasy biofilmu wytwarzanego przez wyizolowane szczepy *Listeria* spp. Pierwszy etap badania polegał na przygotowaniu standaryzowanego inokulum bakteryjnego. Kultury wyizolowanych szczepów hodowano na podłożu bulionowym Tryptone Soy Broth (TSB) przez 16 godzin w temperaturze 37°C. Następnie hodowle bakteryjne poddano wirowaniu przy 6000 x g przez 10 minut (MiniSpin, Eppendorf, Hamburg, Niemcy), odlano supernatant, a powstały osad bakteryjny zawieszono w 5 ml świeżego bulionu TSB. Gęstość

optyczną zawiesiny bakteryjnej standaryzowano spektrofotometryczne do wartości 1,0 przy długości fali 595 nm. Celem tego etapu było zapewnienie jednakowego, początkowego stężenia startowego dla wszystkich analizowanych szczepów. Końcowy etap przygotowania inokulum polegał na rozcieńczeniu zawiesin w stosunku 1:40 w świeżym bulionie TSB. Następnie powstałe rozcieńczenia nanoszono na mikrotitracyjną płytkę 96-dołkową, po 200 µl inokulum w ośmiu powtórzeniach. W badaniu uwzględniono również kontrolę ujemną którą stanowiło 200 µl bulionu TSB bez kultur bakteryjnych. Kontrolę ujemną analizowano w ośmiu powtórzeniach. Następnie inokulowane płytki mikrotitracyjne inkubowano w warunkach statycznych bez wytrząsania przez 24 godziny w temperaturze 37°C, co umożliwiło rozpoczęcie tworzenia biofilmu. Po inkubacji, podłoże hodowlane usuwano z dołków i płukano trzykrotnie jałowym buforem fosforanowym PBS o pH 7,4 (Sigma-Aldrich). Kolejny etap analizy obejmował suszenie odwróconych płytek przez godzinę w temperaturze pokojowej, co miało na celu utrwalenie adherentnego biofilmu. W celu wybarwienia powstałego biofilmu do każdego dołka dodawano 200 µl 0,2% wodnego roztworu fioletu krystalicznego (CHEMPUR, Piekary Śląskie, Polska), po czym płytki inkubowano przez 15 minut. Po zakończeniu barwienia, nadmiar roztworu usuwano, a płytki ponownie płukano jałowym roztworem PBS w celu eliminacji niezwiązanego barwnika. Fiolet krystaliczny związany z biofilmem rozpuszczano poprzez dodanie do każdego dołka 200 µl mieszaniny alkoholu etylowego i acetonu w stosunku 80:20 (v/v), a absorbancję rozpuszczonego barwnika proporcjonalną do biomasy biofilmu mierzono przy długości fali 570 nm z wykorzystaniem czytnika mikropłytek ASYS UVM340 (Biogenet, Józefów, Polska). Dla zapewnienia wiarygodności wyników wszystkie testy dla pojedynczego izolatu wykonywano w trzech kolumnach, z ośmioma powtórzeniami dla każdego analizowanego szczepu.

Do analizy danych i klasyfikacji wyników zastosowano kryteria opracowane przez Stepanović i wsp. (93). Wartość graniczną gęstości optycznej (*optical density cut-off value* – ODc) wyznaczono poprzez obliczenie średniej absorbancji dla dołków kontroli ujemnej oraz dodanie trzykrotności odchylenia standardowego kontroli ujemnej. Potencjał tworzenia biofilmu przez każdy badany szczep klasyfikowano na podstawie zmierzonej wartości gęstości optycznej (*optical density* – OD) względem wartości ODc. Izolaty, które nie wytwarzały biofilmu, określono dla wartości mniejszej lub równej ODc ($OD \leq 0{,}188$). Izolat ze słabym potencjałem produkcji biofilmu określano wówczas, gdy jego wartość OD była większa od ODc, lecz mniejsza lub równa dwukrotności ODc ($0{,}188 < OD \leq 0{,}375$). Wartość OD większa niż dwukrotność ODc, lecz mniejsza lub równa czterokrotności ODc ($0{,}375 < OD \leq 0{,}752$) odpowiadała za umiarkowanej zdolności tworzenia biofilmu, natomiast izolaty wykazujące

wartość OD przekraczającą czterokrotność ODc (OD > 0,752) klasyfikowano jako szczepy o silnym potencjale produkcji biofilmu.

5.7 Charakterystyka cytotoksyczności szczepów *Listeria* spp. i *L. monocytogenes* wyizolowanych z ryb

W przeprowadzonych badaniach oceny cytotoksyczności wykorzystano cztery komercyjne linie komórkowe pochodzące z American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) :

a) Caco-2: ludzką linie komórek nabłonkowych gruczolakoraka jelita grubego (ATCC HTB-37),
b) Vero: linia komórek nabłonkowych nerek afrykańskiej małpy zielonej (ATCC CCL-81)
c) HT-29: ludzka linia komórek gruczolakoraka okrężnicy II stopnia pochodzenia kaukaskiego (ATCC HTB-38)
d) Hep-G2: ludzka linia komórkowa raka wątrobowokomórkowego pochodzenia kaukaskiego (ATCC HB-8065).

Wszystkie linie komórkowe hodowano w podłożu Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) (Hyclone, Logan, UT, USA), suplementowanym 20% płodową surowica bydlęcą (FBS; Hyclone, Logan, UT, USA) oraz 1% roztworem penicyliny i streptomycyny (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Hodowle linii komórkowych prowadzono w warunkach standardowych, to jest w temperaturze 37°C, w atmosferze z 5% CO_2, co zapewniało optymalne warunki do wzrostu i proliferacji komórek.

Potencjał cytotoksyczny każdego izolatu *Listeria* spp. oceniono metodą *in vitro,* gdzie procedurę eksperymentalną podzielono na dwa etapy badawcze. Pierwszy etap obejmował przygotowanie ekstraktów bakteryjnych, natomiast drugi polegał na ocenie żywotności komórek linii komórkowych po ekspozycji na uzyskane lizaty bakteryjne.

W celu przygotowania ekstraktów, badane szczepy *Listeria* spp. hodowano początkowo na podłożu Tryptone Soy Yeast Extract Agar (TSYEA) (BioMaxima, Lublin, Polska) w warunkach tlenowych, w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Następnie wyrosłe kolonie zawieszano w jałowym buforze fosforanowym PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Gęstość uzyskanej zawiesiny standaryzowano przy użyciu densytometru McFarlanda DEN-1 (BioSan, Ryga, Łotwa) do stężenia około 1 x 10^9 CFU/ml. W celu indukcji uwalniania zarówno widzialnych jak i związanych z komórką czynników cytotoksycznych do standaryzowanej zawiesiny bakteryjnej dodawano wankomycynę (Sigma-

Aldrich, St. Louis, MO, USA) do wartości końcowego stężenia 15% (w/v). Tak przygotowane mieszaniny inkubowano przez 30 minut w temperaturze 37°C a następnie wirowano przy 2500xg przez 20 minut. Uzyskany supernatant sterylizowano przy użyciu filtrów strzykawkowych o średnicy porów 0,45µm (Eppendorf, Hamburg, Niemcy), uzyskując bezkomórkowy ekstrakt wykorzystywany do dalszych analiz cytotoksyczności na świeżych hodowlach linii komórkowych.

Hodowane *in vitro* linie komórkowe trypsynizowano roztworem trypsyny-EDTA (0,05% w/v trypsyny, 0,02% w/v EDTA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), a agregaty komórkowe rozbijano za pomocą delikatnego pipetowania. Świeżo przygotowaną zawiesinę linii komórkowych wysiewano na jałowe 96-dołkowe płytki hodowlane z płaskim dnem (Eppendorf, Hamburg, Niemcy) w standardowej gęstości 2 x 10^5 komórek na dołek i hodowano w warunkach standardowych, w temperaturze 37°C, w atmosferze zawierającej 5% CO_2. Po uzyskaniu adhezji komórek sięgających 70% konfluencji na dołek, podłoże hodowlane usuwano i zastępowano przygotowanymi wcześniej ekstraktami bezkomórkowymi przygotowanymi z analizowanych szczepów.

Żywotność monowarstw linii komórkowych po ekspozycji na ekstrakty bakteryjne analizowano ilościowo przy użyciu kolorymetrycznego testu proliferacji komórek WST-1 (Roche, Bazylea, Szwajcaria). Do każdego dołka dodawano 10µl gotowego odczynnika WST-1, po czym płytki inkubowano w temperaturze 37°C, w atmosferze zawierającej 5% CO_2 przez okres od 0.5 do2 godzin. Absorbancję, będącą wskaźnikiem liczby żywych i metabolicznie aktywnych komórek, mierzono przy długości fali 450nm przy użyciu czytnika mikropłytek Sunrise (Tecan, Männedorf, Szwajcaria). W badaniu uwzględniono kontrolę ujemną obejmującą komórki inkubowane wyłącznie w jałowym podłożu hodowlanym, odpowiadającą 100% żywych komórek w układzie oraz kontrolę dodatnią obejmującą komórki poddane działaniu 1% roztworu Triton X-100 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), indukującemu całkowitą śmierć komórkową. Badania cytotoksyczności zostały przeprowadzone w trzech niezależnych powtórzeniach dla każdego analizowanego szczepu *Listeria* spp.

Odsetek śmierci komórek (*cell death*, CD) obliczano dla każdego izolatu zgodnie ze wzorem przedstawionym poniżej:

$$CD(\%) = \frac{(A\ experimental\ -\ A\ negative)}{(A\ positive\ -\ A\ negative)} \times 100\%$$

gdzie $A_{experimental}$ oznacza absorbancję komórek eksponowanych na ekstrakty bakteryjne, $A_{negative}$ odpowiada absorbancji kontroli ujemnej, natomiast $A_{positive}$ oznacza absorbancje kontroli dodatniej. Na podstawie obliczonego odsetka śmierci komórek w układzie *in vitro*, efekt cytotoksyczny klasyfikowano do jednej z czterech kategorii:

- brak efektu toksycznego (0% śmierci komórek),
- niski efekt cytotoksyczny (1 – 30% śmierci komórek),
- umiarkowany efekt cytotoksyczny (31 – 70% śmierci komórek)
- wysoki efekt cytotoksyczny (>71% śmierci komórek)

zgodnie z opisaną w literaturze metodologią (94).

5.8 Analiza statystyczna

5.8.1 Analiza statystyczna lekowrażliwości szczepów *Listeria* spp.

Profile lekowrażliwości oznaczono dla 17 substancji przeciwdrobnoustrojowych reprezentujących różne klasy związków, co pozwoliło na przeprowadzenie wielowymiarowej analizy zjawiska wrażliwości na badane grupy substancji. W celu zapewnienia wysokiej rzetelności analiz ocenę lekowrażliwości przeprowadzono dwuetapowo. W pierwszym etapie izolaty klasyfikowano do trzech kategorii fenotypowych: oporne (R), średnio-wrażliwe (I) oraz wrażliwe (S). Następnie, dla uproszczenia dalszych analiz statystycznych i interpretacji wyników, kategorię wyników średnio-wrażliwych zaklasyfikowano do kategorii opornej. Dzięki temu uzyskano binarny podział na izolaty wrażliwe (0) oraz niewrażliwe (1). Analogicznie obecność lub brak wybranych genów oporności kodowano jako zmienną binarną (0/1), co umożliwiło analizę zależności pomiędzy fenotypową opornością szczepów a obecnością jej determinant genetycznych.

Analizie poddano następujące substancje przeciwdrobnoustrojowe: ampicylinę, oksacylinę, meropenem, benzylopenicylinę, cefoksytynę, cefotaksym, gentamycynę, erytromycynę, ryfampicynę, wankomycynę, trimetoprim/sulfametoksazol, tetracyklinę, chloramfenikol, cyprofloksacynę, enrofloksacynę, nitrofurantoinę oraz klindamycynę. Przeprowadzona analiza zaklasyfikowała analizowane substancje przeciwdrobnoustrojowe do następujących grup strukturalnych: penicyliny (ampicylina, oksacylina, benzylopenicylina), karbapenemy (meropenem), cefalosporyny (cefoksytyna, cefotaksym), aminoglikozydy (gentamycyna), makrolidy (erytromycyna), ryfamycyny (ryfampicyna), glikopeptydy (wankomycyna), sulfonamidy (trimetoprim/sulfametoksazol), tetracykliny (tetracyklina),

fenikole (chloramfenikol), fluorochinolony (cyprofloksacyna, enrofloksacyna), nitrofurany (nitrofurantoina) oraz linkozamidy (klindamycyna). Zastosowane podejście analityczne umożliwiło przeprowadzenie opartej na danych klasyfikacji substancji przeciwdrobnoustrojowych według podobieństwa strukturalnego, tworząc precyzyjne ramy interpretacyjne dla analizy wzorców oporności oraz potencjalnych mechanizmów oporności krzyżowej występujących pomiędzy strukturalnie powiązanymi klasami badanych związków.

W analizach korelacyjnych obliczano współczynnik korelacji Phi, właściwy dla danych binarnych, w celu określenia zależności pomiędzy: profilami oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe oraz profilami oporności a obecnością ich determinant genetycznych. Uzyskane zależności przedstawiono w postaci map cieplnych (*heatmaps*), umożliwiających wizualizację zarówno dodatnich jak i ujemnych korelacji.

Do porównania występowania szczepów wielolekoopornych pomiędzy poszczególnymi gatunkami *Listeria* spp. zastosowano test niezależności chi-kwadrat. W przypadku uzyskania istotnych statystycznie wyników globalnych przeprowadzono dodatkowo analizę post-hoc z korelacją Bonferroniego. Sporządzono również tabele kontyngencji określające liczbę izolatów wykazującą oporność wobec określonej liczby klas antybiotyków, a uzyskane dane zwizualizowano za pomocą skumulowanych wykresów słupkowych oraz wykresów wzbogaconych o estymację gęstości jądrowej (KDE, *kernel density estimation*).

Ponadto dla każdego analizowanego środka przeciwdrobnoustrojowego skonstruowano odrębne modele regresji logistycznej, gdzie zmienną zależną stanowił fenotyp oporności (oporny *versus* wrażliwy), natomiast zmiennymi objaśniającymi były gatunki bakterii, zakodowane metodą *one-hot encoding*, jak również obecność genów oporności. Parametry modeli estymowano przy użyciu różnych algorytmów optymalizacji, w tym metod BFGS, Newtona oraz L-BFGS, co miało na celu zapewnienie stabilnej zbieżności modeli.

Dopasowanie modeli oraz ich zdolność predykcyjną oceniono na podstawie macierzy pomyłek, z których wyprowadzono wartości czułości, swoistości i dokładności klasyfikacji. Dodatkowo analizowano przebieg krzywych ROC (*receiver operating characteristic*) oraz wartości pola pod krzywą (AUC, *area under the curve*). Ogólną istotność statystyczną modeli określono za pomocą testu ilorazu wiarygodności w porównaniu z modelem zerowym, przyjmując wartości $p < 0,05$ za statystycznie istotne.

Wszystkie analizy statystyczne oraz wizualizacje danych przeprowadzono w programie Python wersja 3.9 z wykorzystaniem bibliotek pandas, numpy, SciPy, statsmodels oraz matplotlib.

5.8.2 Analiza statystyczna występowania genów wirulencji, produkcji biofilmu i cytotoksyczności szczepów *Listeria* spp.

Analiza statystyczna danych dotyczących genów wirulencji, produkcji biofilmu oraz efektu cytotoksycznego przeprowadzono z wykorzystaniem programu Python (wersja 3.9) oraz bibliotek pandas, SciPy, statsmodels i scikit-learn. Za poziom istotności statystycznej przyjęto wartość $p < 0,05$.

Częstość występowania genów wirulencji oceniono dla całej kolekcji izolatów oraz poszczególnych gatunków rodzaju *Listeria*. Zależność między obecnością genów a przynależnością gatunkową analizowano z wykorzystaniem testu niezależności χ^2. W sytuacji stwierdzenia statystycznie istotnych zależności i różnic wykonano porównania *post hoc* z zastosowaniem dokładnego testu Fishera, a wartości p skorygowano metodą Benjaminiego – Hochberga w celu kontroli odsetka fałszywie istotnych wyników (FBR). Siłę zależności oceniono na podstawie współczynnika V Craméra. Stopień zgodności tworzenia biofilmu pomiędzy danymi określonymi metodą ilościową i jakościową określono za pomocą współczynnika kappa Cohena (κ). Zależności pomiędzy obecnością badanych genów wirulencji a cechami fenotypowymi, obejmującymi produkcje biofilmu oraz efekt cytotoksyczny, analizowano przy użyciu współczynnika korelacji rang Spearmana.

6. Wyniki

6.1 Prewalencja *Listeria* spp. oraz *L. monocytogenes* w surowych rybach

Z 750 próbek wyizolowano łącznie 104 szczepy bakteryjne należące go rodzaju *Listeria* spp., co odpowiadało prewalencji na poziomie 13,9%. Wśród wyizolowanych szczepów bakteryjnych zidentyfikowano 4 gatunki *Listeria*: *L. seeligeri* (n=36), *L. welshimeri* (n=30), *L. monocytogenes* (n=24) oraz *L. innocua* (n=14). Obecność bakterii z rodzaju *Listeria* stwierdzono we wszystkich analizowanych grupach ryb, jednak ich częstość występowania różniła się w zależności od gatunku gospodarza. Najwyższy odsetek dodatnich wyników odnotowano w przypadku karasia (*Carassius* spp.), który stanowił 67,3% wszystkich uzyskanych izolatów (p<0,05). Niższy udział izolatów stwierdzono odpowiednio u śledzia (19,2%), jesiotra (10,6%) oraz pstrąga (2,9%) (95).

Wśród wyizolowanych szczepów dominowały *L. seeligeri* i *L. welshimeri*, które stanowiły odpowiednio 34,6% oraz 28,8% wszystkich izolatów; izolowano je głównie z karasia oraz śledzia. *Listeria monocytogenes* stanowiła 23,1% wszystkich izolatów. Szczepy tego gatunku izolowano jedynie z próbek pochodzących ze śledzi oraz hodowlanych jesiotrów. *Listeria innocua*, mino iż była izolowana we wszystkich badanych gatunkach ryb, stanowiła najrzadziej izolowany gatunek (13,5%) i najczęściej wykrywana była w próbkach karasia (95).

Przeprowadzona analiza rozmieszczenia środowiskowego izolatów *L. monocytogenes* wykazała, że ich większość (58,3%) pochodziła od dziko żyjących śledzi zasiedlających środowisko Morza Bałtyckiego, natomiast pozostałe 41,7 % izolatów uzyskano z hodowlanych jesiotrów utrzymywanych w przepływowych zbiornikach słodkowodnych.

6.2 Profil oporności na substancje przeciwdrobnoustrojowe szczepów *Listeria* spp. wyizolowanych z ryb

Badanie obejmujące 104 szczepy wykazało, że najwyższy odsetek oporności odnotowano wobec oksacyliny (100%), cefotaksymu (97,1%), klindamycyny (96,2%), cefoksytyny (92,3%), ryfampicyny (92,3%) oraz trimetoprimu z sulfametoksazolem (91,3%). Wysokie wskaźniki oporności zaobserwowano również wobec erytromycyny i meropenemu. Najniższy poziom oporności stwierdzono natomiast w przypadku wankomycyny (13,5%), chloramfenikolu (32,7%), ampicyliny (47,1%), gentamycyny (53,8%) oraz tetracykliny

(55,8%). Wszystkie analizowane szczepy wykazywały oporność na co najmniej jeden środek przeciwdrobnoustrojowy. Fenotyp średniej wrażliwości obserwowano głównie w odniesieniu do fluorochinolonów oraz cefalosporyn. Szczepy o statusie średnio–wrażliwym odnotowano u 22,1% analizowanych szczepów w przypadku enrofloksacynę oraz u , natomiast w przypadku cefotaksymu klasyfikowała się na poziomie 2,9%.

Wśród analizowanych szczepów *Listeria* spp. aż 98,1 % zaklasyfikowano do grupy szczepów MDR. Najczęściej obserwowany profil szczepów wielolekoopornych obejmował oporność na penicyliny, cefalosporyn, linkozamidy, fluorochinolony., ryfamycyny oraz sulfonamidy. Na poziomie substancji przeciwdrobnoustrojowych najwyższe wskaźniki oporności zanotowano dla cefalosporyn oraz penicylin (po 100,0%), a następnie dla linkozamidów (96,2%), ryfamycyn (92,3%) i fluorochinolonów (92,3%). Znaczny poziom oporności stwierdzono również dla sulfonamidów (91,3%), makrolidów (82,7%) czy karbapenemów (73,1%), kolejno niższe wartości określono dla nitrofuranów (64,4%), tetracyklin (55,8%) oraz aminoglikozydów (58,3%). W przeprowadzonych badaniach najniższy poziom oporności został stwierdzony dla fenikoli (32,7%) oraz glikopeptydów (13,5%).

Analiza rozkładu oporności wykazała znaczne różnice pomiędzy poszczególnymi gatunkami *Listeria* spp., przy czym najwyższy poziom oporności na wszystkie badane klasy substancji przeciwdrobnoustrojowych stwierdzono u *L. monocytogenes* ($p < 0,05$). Wśród szczepów tego gatunku odnotowano w 41,7% oporność na 10 grup związków przeciwdrobnoustrojowych, natomiast 37,5% spośród szczepów *L. monocytogenes* było opornych na 11 kategorii badanych związków.

Dla *L. seeligeri* również stwierdzono bardzo wysoki poziom oporności, który oscylował na poziomie 16,7% szczepów tego gatunku w odniesieniu do 8, 9 oraz 10 grup środków przeciwdrobnoustrojowych. W przypadku 36,11% szczepów wykazało oporność na 11 grup.
Analizowane szczepy *L. welshimeri* charakteryzowały się mniej skoncentrowanym i bardziej rozproszonym profilem oporności. W tej grupie 33,3% izolatów wykazało oporność na 10 grup związków, podczas gdy 16,7% wykazało oporność na 8 grup badanych związków przeciwdrobnoustrojowych.

L. innocua prezentowała względnie umiarkowany profil oporności, gdzie 7,2% szczepów wykazywało oporność na 4 do 6 klas substancji przeciwdrobnoustrojowych. Odnotowano również, że w tej grupie izolatów 21,3% było opornych na 11 analizowanych kategorii środków przeciwdrobnoustrojowych.

Analiza wielolekooporności w obrębie wyizolowanych szczepów *Listeria* spp. wykazała, że 87,5% wszystkich badanych izolatów charakteryzowało się opornością na co najmniej 8 kategorii środków przeciwdrobnoustrojowych, natomiast u 12,5% szczepów określono niższy poziom MDR, obejmujący zakres oporności na 2-7 grup badanych związków.

6.3 Profil lekowrażliwości na substancje przeciwdrobnoustrojowe *L. monocytogenes* wyizolowanych z ryb

Wyniki oceny lekowrażliwości 24 izolatów *L. monocytogenes* przeprowadzone testem dyfuzyjno – krążkowym wykazały, że wszystkie badane izolaty (100%) były oporne na oksacylinę, meropenem, cefotaksym, cefoksytynę, ryfampicynę i trimetoprim z sulfametoksazolem. Ponadto oporność na benzylopenicylinę stwierdzono u 70,8% badanych szczepów, natomiast 50 % izolatów wykazało oporność na gentamycynę.

Wysoki odsetek szczepów opornych odnotowano również w przypadku erytromycyny (75,0%), oraz tetracykliny (75,0%). Oporność na cyprofloksacynę wykazano u 97,1% wśród badanych szczepów *L. monocytogenes*. Dodatkowo oporność na enrofloksacynę stwierdzono u 58,3% izolatów. Wysoki odsetek opornych szczepów odnotowano również dla nitrofurantoiny (70,8%) oraz klindamycyny (83,3%).

Oporność na wankomycynę stwierdzono w przypadku 33,3% izolatów, podczas gdy na chloramfenikol było opornych 25,0% szczepów. 58,3% izolatów określono jako średnio – wrażliwe na enrofloksacynę.

6.4 Rozkład genów oporności na substancje przeciwdrobnoustrojowe wśród izolatów *Listeria* spp. oraz *L. monocytogenes*

Wśród izolatów *L. monocytogenes* opornych na penicyliny geny *penA*, *ampC*, *blaTEM*, *blaZ* wykryto odpowiednio u 16,7%, 37,5%, 100% oraz 16,7% izolatów.

Wśród izolatów opornych na makrolidy gen *ermB* wykryto u 4,2% szczepów, natomiast genu *ermA* nie wykryto w żadnym izolacie. Gen odpowiedzialny za oporność na erytromycynę (*ereB*) stwierdzono u 37,5% badanych szczepów *L. monocytogenes*.

Szczepy charakteryzujące się fenotypową opornością na glikopeptydy wykazały obecność genów warunkujących tą oporność (*vanA*, *vanB*) u 12,5% izolatów. W badanych izolatach nie stwierdzono obecności genu *sulI*, natomiast gen *sulII* został wykryty w 8,3% szczepów charakteryzujących się fenotypową opornością na tę grupę leków. Powyższe wyniki szczegółowo opisano w pracy Sołtysiuk i wsp. (Sołtysiuk 2025).

6.5 Detekcja genów wirulencji oraz produkcji biofilmu w izolatach *Listeria* spp. pozyskanych z ryb

Na podstawie analizy molekularnej 104 izolatów występowania dziesięciu genów (*inlA*, *iap*, *plcA*, *hlyA*, *prfA*, *actA*, *inlJ*, *inlC*, *mpl*, *luxS*) odpowiedzialnych za wirulencje *Listeria* spp. stwierdzono, iż częstość występowania tych genów była istotnie zależna od gatunku bakterii (test chi-kwadrat, $p < 0,001$), z wyjątkiem genu *luxS* związanego z produkcją biofilmu (test chi-kwadrat, $p = 0,745$). *L monocytogenes* charakteryzowała się najwyższą częstością występowania genów odpowiedzialnych za patogenność. Gen *iap* udokumentowano u 97,1% izolatów *L. monocytogenes*, co w odniesieniu do *L. seeligeri* (11,1 %) i *L. welshimeri* (3,3 %) stanowi częstość występowania statystycznie wyższą ($p < 0,001$) dla obu porównań. Genu tego nie wykryto w żadnym izolacie *L. innocua*. Gen *plcA* stwierdzono u 100% badanych szczepów *L. monocytogenes*, co było częstsze niż u innych gatunków: *L. innocua* (78,6%; $p = 0,043$), *L. welshimeri* (43,3%; $p < 0,001$), *L. seeligeri* (11,1%; $p < 0,001$). Podobny trend zaobserwowano w przypadku genu *mpl*, który stwierdzono u 100% izolatów *L. monocytogenes*, natomiast w znacznie niższej częstości został wykryty u *L. innocua* (28,6%), *L. welshimeri* (8,3%) i *L. seeligeri* (3,3%), gdzie wartości prawdopodobieństwa były mniejsze niż 0,001 dla wszystkich porównań parami. W omawianych analizach zaobserwowano wyraźny kontrast, w którym główne geny wirulencji *prfA*, *actA*, *hlyA* i internaliny (*inlA*, *inlC*, *inlJ*) zostały stwierdzone wyłącznie w izolatach *L. monocytogenes*, co w kontekście ich braku u innych gatunków *Listeria* stanowi wysoce istotną korelacje ($p < 0,001$).

Analizując 24 szczepy *L. monocytogenes* stwierdzono, że wszystkie izolaty należały do serogrupy 1/2a, 1/2c, 3a, 3c jak również obecność genów *plcA*, *hlyA*, *mpl*, *inlA*, *inlC* i *inlJ* została udokumentowana u 100% badanych szczepów. Z niższą częstością, na poziomie 95,8% (23/24) określono gen regulatorowy *prfA* oraz gen białka polimeryzującego aktynę *actA*, natomiast gen związany z inwazją bakterii *Listeria* spp. (*iap*) udokumentowano u 91,7% (22/24) izolatów. Podsumowując, wyspę patogenności LIPI-1, definiowaną przez obecność genów *hlyA*, *mpl*, *actA*, *plcA* i *prfA* stwierdzono w przypadku 23 izolatów *L. monocytogenes*, co stanowiło 95,8% badanych szczepów.

Gen *luxS* był jedynym genem, którego częstość występowania nie wykazała statystycznie istotnej różnicy pomiędzy analizowanymi szczepami ($p = 0,745$) i został on wykryty u łącznie 16,3% (17/104) izolatów. W obrębie analizowanych gatunków gen *luxS* został zidentyfikowany u 20,8% (5/24) izolatów *L. monocytogenes* i w 28,6% (4/14) izolatów

L. innocua. W przypadku *L. welshimeri* odsetek ten wyniósł 13,3 % (4/30), natomiast u *L. seeligeri* 11,1% (4/36).

6.6 Profil produkcji biofilmu izolatów *Listeria* spp. pozyskanych z ryb

W jakościowym teście płytkowym CRA 18 izolatów (17,3%) zdefiniowano jako szczepy produkujące biofilm. Najwyższy odsetek izolatów wykazujących zdolność do tworzenia biofilmu odnotowano wśród szczepów *L. seeligeri*, gdzie cechę tą stwierdzono u 25,0% (9/36) badanych szczepów. Zdolność do produkcji biofilmu została również odnotowana u *L. innocua* (21,4%; 3/14), *L. monocytogenes* (12,5%; 3/24) oraz u *L. welshimeri* (10,0%; 3/30). Spośród badanych izolatów, u 52 szczepów (50,0%) stwierdzono pośredni potencjał produkcji biofilmu, najbardziej rozpowszechniona u *L. seeligeri* (63,9%; 23/36) i *L. welshimeri* (60,0%; 18/30). W przypadku 34 badanych izolatów (32,7%) odnotowano ujemy potencjał do produkcji biofilmu. Ten fenotyp produkcji śluzu był najczęstszy u *L. monocytogenes* (54,2%; 13/24) i *L. innocua* (57,2%; 8/14).

Ilościowe badanie spektrofotometryczne dało obraz bardziej szczegółowy w kontekście produkcji biofilmu. Stwierdzono, że 11 izolatów *Listeria* spp. (10,6%) charakteryzowało się silną produkcją biofilmu, 15 szczepów zidentyfikowano jako produkujące biofilm w stopniu umiarkowanym (14,4%). W badanej populacji dominowały szczepy o umiarkowanej zdolności tworzenia biofilmu. Łącznie 47 izolatów (44,2%) sklasyfikowano jako słabo produkujące biofilm, podczas gdy 32 szczepy (30,8%) nie wykazywały zdolności do jego wytwarzania.

Wśród izolatów *L. monocytogenes* (n=24) trzy szczepy (12,5%) zaklasyfikowano jako silnie produkujące biofilm, dwa (8,3%) jako umiarkowanych producentów, dziesięć (41,7%) jako słabo produkujące biofilm, natomiast dziewięć izolatów (37,5%) nie wykazywało zdolności do jego tworzenia. W grupie *L. seeligeri* (n=36) cztery izolaty (11,1%) charakteryzowały się silną zdolnością tworzenia biofilmu, pięć (13,9%) wykazywało umiarkowaną produkcję, dwadzieścia (55,6%) zaklasyfikowano jako słabych producentów, a siedem (19,4%) nie tworzyło biofilmu. W przypadku *L. welshimeri* (n=30) dwa izolaty (6,7%) sklasyfikowano jako silnie produkujące biofilm, osiem (26,7%) jako umiarkowanych producentów, dziewięć (30,0%) jako słabo produkujące biofilm, natomiast u jedenastu szczepów (36,7%) nie stwierdzono zdolności jego wytwarzania. Wśród izolatów *L. innocua* (n=14) dwa szczepy (14,3%) charakteryzowały się silna zdolnością tworzenia biofilmu, żaden z izolatów nie został zaklasyfikowany do grupy umiarkowanych producentów natomiast

siedem (50,0%) wykazało słaba produkcje biofilmu. W przypadku pięciu izolatów (35,7%) nie odnotowano zdolności tworzenia biofilmu .

Analiza statystyczna wykazała, że rozkład fenotypów tworzenia biofilmu różnił się znacznie między gatunkami w jakościowym teście CRA (test chi-kwadrat, p = 0,014). Wykonanie analizy post-hoc pozwoliło stwierdzić, że było to spowodowane głównie izolatami *L. seeligeri*, gdzie wykazano istotnie niższą częstość występowania zjawiska produkcji biofilmu w porównaniu do szczepów *L. monocytogenes* (dokładny test Fishera, p = 0,002) jak i *L. welshimeri* (p = 0,011). W ilościowym teście spektrofotometrycznym nie stwierdzono istotnych różnic, zarówno w porównaniu kategorii biofilmu (test chi-kwadrat, p = 0,231) jak i mediany wartości biomasy (test Kruskala-Wallisa, p = 0,082).

W celu oceny zgodności wyników uzyskanych przy zastosowaniu obu metod oznaczania zdolności tworzenia biofilmu obliczono współczynnik κ Cohena. Przeprowadzona analiza wykazała umiarkowany poziom zgodności pomiędzy zastosowanymi metodami (κ = 0,51: p< 0,001). Dodatkowo, analizie poddano zależność pomiędzy obecnością genu *luxS*, związanego z regulacją procesów tworzenia biofilmu a obserwowanym fenotypem biofilmotwórczym. Nie stwierdzono istotnej statystycznie zależności pomiędzy obecnością genu *luxS* a kategoriami produkcji biofilmu określonymi metoda jakościową CRA (test χ^2; p = 0,583). Podobnie analiza biomasy biofilmu przeprowadzona metoda ilościową nie wykazała istotnych różnic w medianach wartości gęstości optycznej (OD) pomiędzy izolatami posiadającymi gen *luxS* a szczepami pozbawionymi tego genu (test U Manna–Whitneya; p = 0,814).

6.7 Profil cytotoksyczności izolatów *Listeria* spp.

Potencjał cytotoksyczny supernatantów bezkomórkowych pochodzących od 104 badanych szczepów *Listeria* spp. oceniono z wykorzystaniem czterech linii komórkowych, ujawniając wyraźne różnice zależne of gatunku. Nie stwierdzono mierzalnego efektu cytotoksycznego w przypadku żadnego z izolatów należących do gatunku *L. innocua*, *L. welshimeri* oraz *L. seeligeri* (łącznie 80 izolatów stanowiących 76,9% wszystkich badanych szczepów). Aktywność cytotoksyczna była wyłącznie związana z gatunkiem *L. monocytogenes*.

Wśród 24 izolatów *L. monocytogenes* aż 22 szczepy (91,7%) wykazały mierzalną cytotoksyczność wobec co najmniej jednej linii komórkowej, natomiast jedynie dwa izolaty (8,3%) nie wykazały aktywności cytotoksycznej. Nasilenie efektu cytotoksycznego różniło się znacznie między izolatami i zależało od rodzaju linii komórkowej.

Najsilniejsze efekty obserwowano w przypadku komórek Hep-G2, wobec których aktywność cytotoksyczna wykazało 79,2% izolatów, oraz komórek HT-29 (66,7%). Komórki Caco-2 były mniej podatne na działanie badanych szczepów (37,5%), natomiast komórki Vero wykazywały najmniejszą wrażliwość – jedynie jeden izolat (4,2%) indukował odpowiedź cytotoksyczną.

Szczegółowa analiza cytotoksyczności izolatów *L. monocytogenes* wykazała charakterystyczne wzorce cytotoksyczności dla poszczególnych linii komórkowych. W przypadku linii komórkowej Caco-2 aktywność wykazało 9 izolatów, co przełożyło się na średni odsetek śmierci komórek wynoszący 10,9% (± 3,8% SEM) dla całej grupy *L. monocytogenes*. W odniesieniu do komórek Vero aktywność była znacznie niższa, w przypadku jednego izolatu udokumentowano umiarkowana cytotoksyczność, gdzie średni odsetek śmierci komórek wyniósł 1,5% (± 1,5% SEM).

Wyższą aktywność cytotoksyczną zaobserwowano w przypadku linii komórkowej HT-29, dla której aktywność wykazało 16 izolatów, a średni odsetek śmierci komórek wyniósł 33,4% (± 6,1% SEM). Najbardziej nasilone efekty cytotoksyczne odnotowano w przypadku linii komórkowej Hep-G2, gdzie aktywność wykazało 19 szczepów. Odpowiadało to najwyższemu średniemu odsetkowi śmierci komórek, wynoszącym 50,5% (± 6,6% SEM).

Stwierdzono również istotny związek pomiędzy brakiem genów *iap*, *prfA* i *actA* a brakiem aktywności cytotoksycznej. W szczególności brak genu *iap* był istotnie związany z brakiem cytotoksyczności wobec linii komórkowych Caco-2, Hep-G2 oraz HT-29 (test U Manna–Whitneya, $p < 0,05$).

7. Dyskusja

Wśród organizmów o szczególnym znaczeniu epidemiologicznym istotną rolę odgrywają bakterie z rodzaju *Listeria*, zwłaszcza *L. monocytogenes*, stanowiąc poważne zagrożenie zdrowia publicznego. Zdolność tego patogenu do namnażania się w warunkach chłodniczych oraz przetrwania w produktach gotowych do spożycia. Prognozy globalne wskazują na istotny wzrost spożycia ryb oraz owoców morza. Według szacunków Naylora i wsp. (2021) konsumpcja produktów akwakultury do roku 2050 może zwiększyć się nawet o 80%. (96). Prowadzi to do wzrostu znaczenia zapewnienia bezpieczeństwa zdrowotnego żywności pochodzenia wodnego, jako potencjalnego źródła patogenów przenoszonych droga pokarmową, w tym *L.monocytogenes*.

Ze względu na możliwość wywoływania ciężkich postaci listeriozy, szczególnie u osób należących do grupy wysokiego ryzyka, identyfikacja oraz ograniczenie zagrożeń związanych z obecnością *Listeria* spp. w produktach rybnych mają kluczowe znaczenie dla zdrowia publicznego (97). Wymagania Komisji Europejskiej dotyczącymi kryteriów mikrobiologicznych dotyczących bezpieczeństwa żywności gotowej do spożycia (RTE – Ready-To-Eat), określonymi w Rozporządzeniu Komisji (WE) nr 2073/2005 oraz jego nowelizacji – rozporządzeniu Komisji (UE) 2024/2895, ściśle regulują dopuszczalne poziomy występowania *L. monocytogenes*. W żywności RTE dopuszczalny poziom *L. monocytogenes* w okresie przydatności do spożycia wynosi ≤ 100 jtk/g produktu, pod warunkiem że producent, na podstawie badań trwałości i testów obciążeniowych, wykaże brak możliwości przekroczenia tego limitu podczas przechowywania i dystrybucji. W innym przypadku zgodnie z przepisami prawa obowiązuje bardziej restrykcyjne kryterium bezpieczeństwa mikrobiologicznego – „nie wykryto w 25g produktu". Wymóg ten dotyczy również żywności przeznaczonej dla niemowląt, żywności specjalnego przeznaczenia medycznego oraz produktów RTE sprzyjających wzrostowi *L. monocytogenes* (98).

Przedstawione badania obrazują kompleksową charakterystykę 104 izolatów *Listeria* spp. wyizolowanych z surowych ryb, pochodzących z różnorodnych środowisk wodnych z terenu Polski, obejmującą ocenę prewalencji poszczególnych gatunków należących do rodzaju *Listeria*, poziom antybiotykoodporności wyizolowanych szczepów wraz z oceną występowania genów ją warunkujących. Ocenie poddano również występowanie genów wirulencji, zdolność produkcji biofilmu oraz poziom cytotoksyczności izolatów *Listeria* spp.

Badania pozwoliły określić prewalencję występowania *Listeria* spp. w próbkach surowych ryb na poziomie 13,9%, przy czym gatunek *L. monocytogenes* wykryto w 3,2% tych

próbek. Ten poziom prewalencji jest zgodny z danymi dostępnymi w literaturze. Udokumentowana w badaniach własnych prewalencja mieści się w zakresie obserwowanym u innych autorów, którzy wykazali, że częstość występowania *Listeria* spp. w rybach i produktach rybnych wynosi od 10,5% do 77,5%, natomiast w przypadku *L. monocytogenes* od 3,0 do 22,5% (99, 100, 101, 102). Z kolei w analizie przeprowadzonej przez Walsha (2001) w Irlandii obecność *Listeria* spp. stwierdzono w 28,6% próbek surowych ryb, przy czym najczęściej izolowanym gatunkiem była *L. innocua*, a następnie *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* oraz *L. welshimeri* (103). Znaczne różnice częstości występowania *Listeria* spp. obserwowane pomiędzy różnymi badaniami mają charakter wieloczynnikowy. Przyczyną tego mogą być między innymi różnice metodologiczne obejmujące strategie pobierania próbek, stosowane metody izolacji i identyfikacji drobnoustrojów jak również czynniki geograficzne, środowiskowe i sezonowe. Istotną rolę odgrywają stosowane dobre praktyki higieniczne oraz dobre praktyki produkcyjne związane z obróbką, transportem i przechowywaniem ryb (104, 105, 106).

Znaczną heterogeniczność danych dotyczących występowania *L. monocytogenes* w żywności pochodzącej ze środowisk wodnych wykazali w przeglądzie systematycznym i metaanalizie Zakrzewski i wsp. (2024). Autorzy oszacowali częstość występowania tego patogenu na poziomie 5,8% w surowych rybach, podczas gdy w produktach gotowych do spożycia, prewalencja kształtowała się na poziomie 14,5% (101). W analizie tej zwrócono uwagę na zależność, wskazującą na większe rozpowszechnienie *L. monocytogenes* w surowych rybach w krajach o wysokich dochodach (15,0%) w porównaniu do krajów o niskich i średnich dochodach (3,0%) (101). Podkreśla to złożony charakter czynników determinujących prewalencję bakterii z rodzaju *Listeria* w produktach rybnych.

W zakładach przemysłu spożywczego monitorowanie obecności bakterii z rodzaju *Listeria* jest wykorzystywane jako pośredni wskaźnik potencjalnego występowania *L. monocytogenes*. Pomimo szerokiego zastosowania tego podejścia, jego wartość predykcyjna zostaje przedmiotem dyskusji badaczy i kontrolerów jakości produkcji. Tompkin i wsp. (107) wykazali że obecność *Listeria* spp. w środowisku produkcyjnym stanowiła wiarygodny wskaźnik występowania *L. monocytogenes* w produktach mięsnych gotowych do spożycia (107). Odmienne wnioski, dotyczące zakładów przetwórstwa owoców morza, zawarli w swojej pracy Alali i wsp. (108), którzy na podstawie systematycznej analizy dostępnych danych stwierdzili, że wykrycie *Listeria* spp. nie pozwala na wiarygodne stwierdzenie obecności *L. monocytogenes* w surowych oraz gotowych produktach rybnych i owoców morza (108). Wyniki uzyskane w badaniach własnych są zgodne z obserwacjami Alali i wsp. (108),

gdzie *L. monocytogenes* wykryto jedynie w 3,2% analizowanych próbek dodatnich, podczas gdy dominującymi gatunkami były *L. seeligeri* oraz *l. welshimeri*. Stosunkowo niska częstość występowania *L. monocytogenes* wskazuje, że sama identyfikacja bakterii z rodzaju *Listeria* w surowych rybach może nie stanowić wystarczającego narzędzia do prognozowania obecności tego patogenu. Niezależnie od ograniczonej wartości predykcyjnej oznaczania *Listeria* spp., kryterium to powinno zostać, razem z kontrolą występowania *L. monocytogenes,* jednym z kluczowych elementów systemów kontroli jakości produkcji żywności w sektorze rybnym.

Istotna zdolność adaptacyjna do stresowych warunków środowiskowych sprzyja jej obecności w ekosystemach wodnych. W przeprowadzonych badaniach najwyższa częstość występowania *Listeria* spp. została udokumentowana u ryb pochodzących z wód słodkich płynących (19,2%), następnie ze stojących wód słodkich (14,1%), natomiast ryby morskie charakteryzowały się najniższym ogólnym poziomem zanieczyszczenia (8,0%), przy jednoczesnym najwyższym udziale *L. monocytogenes* (70,0%). Uzyskane wyniki są zgodne z wcześniejszymi obserwacjami wskazującymi na częstsze występowanie bakterii z rodzaju *Listeria* u ryb słodkowodnych niż morskich (109). Większe rozpowszechnienie tych drobnoustrojów w wodach śródlądowych może być związane z dopływem zanieczyszczeń pochodzenia rolniczego oraz zwiększona zawartością materii organicznej, sprzyjająca namnażaniu tego patogenu (104, 110). Jednocześnie literatura wskazuje, że częstość występowania *L. monocytogenes* w surowych rybach jest zazwyczaj niska i wynosi od 0,0% do 10.0%, a jej obecność jest częściej odnotowywana w środowiskach narażonych na intensywny spływ powierzchniowy (104, 111, 112). Ponadto, analizy epidemiologiczne udokumentowały wyższe wskaźniki zanieczyszczenia ryb z rodziny *Pleuronectidae* (flądrowate) i *Salmonidae* (łososiowate) oraz u gatunków takich jak *Mugil cephalus* (cefal pospolity), *Oncorhynchus mykiss* (pstrąg tęczowy) i *Salmo salar* (łosoś atlantycki) (101). Szczególne znaczenie w kolonizacji organizmów ryb przez *L. monocytogenes* przypisuje się skrzelom, które poprzez kontakt z dużą ilością filtrowanej wody stanowią główne miejsce osadzania się i namnażania bakterii (104). Wyniki te wskazują, że zarówno środowisko bytowania ryb jak i ich cechy gatunkowe mają znaczący wpływ na kontaminację *Listeria* spp. oraz ich wprowadzenie do łańcucha żywnościowego (101, 104).

Narastającym, globalnym problemem jest zjawisko szeroko rozpowszechnionej lekooporności obserwowanej wśród izolatów *Listeria* spp. pochodzących z żywności (44, 113, 114), co zostało potwierdzone również w wynikach uzyskanych w przedstawionych badaniach. Na przestrzeni ostatnich lat dokumentowane zostały liczne przypadki lekooporności na substancje stosowane zarówno w terapii listeriozy jak i w leczeniu innych zakażeń

bakteryjnych. Świadczy to o rozprzestrzenianiu się puli determinant oporności w obrębie rodzaju *Listeria* (115). Szczególne znaczenie kliniczne ma oporność na tetracykliny, makrolidy oraz wybrane antybiotyki β-laktamowe, które stanowią alternatywną terapię w przypadku przeciwwskazań do stosowania standardowego leczenia, szczególnie u kobiet w ciąży oraz u pacjentów z nadwrażliwością na penicyliny (96).

W badaniach własnych stwierdzono bardzo wysoki odsetek szczepów *L. monocytogenes* opornych na cyprofloksacynę (91,7%), erytromycynę (75,0%) oraz tetracyklinę (75,0%). Uzyskane wartości przewyższają wyniki wcześniejszych badań (37), jednak pozostają zgodne z doniesieniami pochodzącymi z późniejszych badań przeprowadzonych w innych regionach świata, gdzie również wykazywano wysokie poziomy oporności na wymienione grupy antybiotyków (106, 113, 116). Szczególnie niepokojący jest fakt, że wszystkie izolaty *L. monocytogenes* wykazały oporność na oksacylinę, meropenem, ryfampicynę, klindamycynę, cefoksytynę, cefotaksym oraz trimetoprim/sulfametoksazol, które należą do różnych klas substancji przeciwbakteryjnych, co może stanowić znaczący problem w terapii listeriozy. Część tych wyników jest związana z naturalną opornością charakterystyczną dla rodzaju *Listeria*, zwłaszcza wobec cefalosporyn (117), skala obserwowanego zjawiska wskazuje na szerokie rozpowszechnienie mechanizmów ograniczających skuteczność terapeutyczną tej grupy antybiotyków. Warto podkreślić, że Chen i wsp. (111) w swoich badaniach wykazali całkowitą wrażliwość izolowanych szczepów *Listeria* na ryfampicynę i trimetoprim/sulfametoksazol. Wiązać się to może z regionalnym zróżnicowaniem profili oporności oraz wpływie lokalnych uwarunkowań środowiskowych i produkcyjnych na kształtowanie się profili oporności wśród izolatów *Listeria* spp.

Szczególną uwagę należy zwrócić na wysoką częstość występowania szczepów wielolekoopornych. W przeprowadzonych w przedstawionej pracy analizach aż 98,1% izolatów *Listeria* spp. spełniało kryteria MDR. Najczęściej identyfikowany profil obejmował oporność na penicylinę, cefalosporyny, linkozamidy, ryfamycyny, sulfonamidy i fluorochinolony. Wartość ta znacznie przekracza doniesienia publikowane na przestrzeni ostatnich dekad. Walsh i wsp. (2001) wykazali oporność jedynie u 0,6% izolatów *L. monocytogenes* pochodzących ze sprzedaży detalicznej, przy czym nie stwierdzili obecności u *L. seeligeri* i *L. welshimeri* (103). Badania przeprowadzone z kolei przez Hailu i wsp. (118) wykazały, że wszystkie analizowane izolaty *Listeria* były oporne na co najmniej jedną grupę substancji przeciwdrobnoustrojowych. Badania tych naukowców udokumentowały różnice we wzorcach MDR dla ampicyliny i penicyliny (118). Zestawienie powyższych wyników wskazuje, że zarówno częstość występowania lekooporności jak i jej profile mogą znacznie

różnić się między regionami geograficznymi, jednak samo zjawisko ma charakter powszechny i stale narastający.

W kontekście bezpieczeństwa żywności oraz zdrowia publicznego szczególnie istotny jest fakt, iż badane izolaty *Listeria* pochodziły z ryb świeżych przeznaczonych do spożycia. Wzrost popularności produktów spożywanych bez obróbki termicznej, takich jak sushi, sashimi czy ryby marynowane, zwiększa prawdopodobieństwo ekspozycji konsumentów na szczepy *Listeria* wykazujące oporność na wiele grup substancji przeciwbakteryjnych (119). Warto zwrócić również uwagę na sytuację epidemiologiczną w Polsce, opisaną przez Żurawik i wsp.(2024). Autorzy udokumentowali pełną wrażliwość ośmiu izolatów klinicznych *L. monocytogenes* pochodzących od ludzi na wszystkie analizowane środki przeciwdrobnoustrojowe w tym ampicylinę, gentamycynę, erytromycynę, tetracyklinę, meropenem oraz trimetoprim/sulfametoksazol (120). Zestawienie tych danych z wynikami uzyskanymi w badaniach własnych wskazuje, że szczepy pochodzenia środowiskowego i żywnościowego mogą stanowić potencjalny rezerwuar oporności, która na chwilę obecną nie jest powszechnie obserwowana w przypadkach klinicznych listeriozy.

Rozwój technologii diagnostycznej pozwolił na analizę genetyczną podstaw lekooporności. Hanes i Huang (115) wykazali, że do najczęściej występujących genów AMR u *L. monocytogenes* należą *fosX*, *lin*, *abc-f* oraz *tet(M)* jak również geny związane z opornością na glikopeptydy *vanC*, *vanR*, *vanS*, *vanT* i *vanXY-C* (115). W badaniach własnych potwierdzono obecność genów związanych z opornością przeciwdrobnoustrojową izolatów *Listeria* spp., w tym genu *ampC*, który może brać udział w kształtowaniu oporności na ampicylinę. W kontekście klinicznym, ma to duże znaczenie, ponieważ ampicylina – sama lub w skojarzeniu z gentamycyną – pozostaje podstawowym lekiem rekomendowanym w leczeniu ciężkiej postaci listeriozy (117). Chociaż gen *ampC* wykryto jedynie w części izolatów, jego obecność może świadczyć o możliwości rozprzestrzeniania się determinant oporności w populacji środowiskowych szczepów *Listeria* spp. Analizując uzyskane wyniki zwrócono szczególna uwagę na stosunkowo niską zgodność pomiędzy wykrytymi genami AMR a obserwowanym fenotypowym profilem oporności. Część izolatów wykazywała wyraźną lekooporność, z jednoczesnym brakiem obecności determinant genetycznych. Natomiast obecność genów oporności nie zawsze determinowała oporność fenotypową. Zjawisko to sugeruje występowanie dodatkowych mechanizmów molekularnych, takich jak nadekspresja pomp efflux, mutacje genów docelowych czy też zmiany przepuszczalności ściany komórkowej. Nie można wykluczyć też obecności innych, do tej pory niescharakteryzowanych genów oporności. Ten obszar badawczy pozostaje luką, wymagającą dalszych badań.

Uzyskane wyniki wskazują , że wielolekooporne izolaty *Listeria* spp. pochodzące z ryb surowych mogą stanowić istotny rezerwuar genów oporności w środowisku żywnościowym. Konieczne jest zatem obserwowanie AMR korzystając z równoczesnego stosowania metod fenotypowych i molekularnych, aby monitorować i opracować strategie ograniczenia rozprzestrzeniania się zjawiska oporności bakterii w skali krajowej i globalnej.

Oznaczenie obecności genów wirulencji pozwoliło na charakterystykę molekularną izolatów *Listeria* spp. pozyskanych z ryb surowych . Interesującym aspektem przeprowadzonych analiz jest wykrycie genów wirulencji, takich jak *plcA*, *iap* oraz *mpl* u gatunków powszechnie uznawanych za niepatogenne, w tym u *L. innocua* i *L. welshimeri*. Gen *plcA* stwierdzono u 78,6% izolatów *L. innocua* oraz 43,3% *L. welshimeri*. Wyniki te są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami wskazującymi, że atypowe szczepy *L. innocua* mogą zawierać elementy wyspy patogenności LIPI-1 charakterystycznej dla *L. monocytogenes*, w tym geny *hlyA* i *plcA* (121, 122, 123) odpowiedzialne za perforacje i degradację błony fagosomu, co potencjalnie może dawać bakteriom zdolność do przeżycia i namnażania się wewnątrz komórek gospodarza oraz skutecznego wywoływania zakażenia. Obserwacje te, udokumentowane przez wielu badaczy na świecie (124, 125, 126) sugerują, że przedstawiciele rodzaju *Listeria* mogą stanowić rezerwuar genów wirulencji. Jednocześnie odnotowany w naszych badaniach *in vitro* całkowity brak cytotoksyczności tych gatunków wskazuje, że sama obecność genów wirulencji nie determinuje fenotypowej zdolności patogennej.

Jednocześnie doniesienia literaturowe podkreślają, iż genom *Listeria* spp. charakteryzuje się stosunkowo dużą stabilnością (127). Ewolucja cech związanych z wirulencja i adaptacja środowiskową zachodzi głównie w wyniku długotrwałego działania rekombinacji oraz presji selekcyjnej (128). Szacuje się, że około połowa genów rdzeniowych *L. monocytogenes* nosi ślady rekombinacji, co wskazuje na znaczną rolę poziomego transferu genów w kształtowaniu różnorodności genetycznej tego rodzaju bakterii (127, 128).

W przeciwieństwie do izolowanych gatunków niepatogennych, izolaty *L. monocytogenes* analizowane w badaniach własnych wykazały jednorodny i rozbudowany profil wirulencji. Geny *hlyA*, *plcA*, *mpl*, *inlA*, *inlJ* oraz *inlC* wykryto u wszystkich szczepów, natomiast geny *prfA* i *actA* występowały u 95,8%, a gen *iap* u 91,7% izolatów. Analizując powyższe dane, kompletną wyspę patogenności LIPI-1 stwierdzono niemal u wszystkich badanych izolatów *L.monocytogenes* (95,8%). Wyniki te są zgodne z doniesieniami badaczy z Iranu, Turcji i Egiptu, gdzie również udokumentowano pełna gamę genów wirulencji wyspy patogenności LIPI-1 w izolatach pochodzących z ryb (105, 130, 131). Uzyskane w badaniach własnych tak częste występowanie determinant wirulencji świadczy o tym, że szczepy krążące

w polskim łańcuchu dostaw surowych ryb zachowują pełny potencjał zakaźny. Znaczenie epidemiologiczne uzyskanych wyników wzmacnia również fakt, że wszystkie izolaty *L. monocytogenes* należały do serogrupy 1/2a–1/2c–3a–3c, w skład której wchodził serotyp 1/2a, który obok serotypów 1/2b oraz 4b jest odpowiedzialny za większość przypadków listeriozy diagnozowanej u ludzi (120, 132). Jednocześnie wyniki badań potwierdzają wcześniejsze doniesienia z Polski, gdzie serogrupa 1/2a–3a dominowała wśród izolatów pochodzących z ryb surowych (133). Zestawienie klinicznie istotnych serogrup z niemal powszechną obecnością kompletnego zestawu determinant wirulencji wskazuje na występowanie w rybach populacji bakterii *L. monocytogenes* o bardzo wysokim potencjale infekcyjnym.

W kontekście zagrożenia epidemiologicznego określono również zdolność tworzenia biofilmu. Większość (62,9%) izolatów *Listeria* spp., bez względu na gatunek, wykazywała zdolność do jego tworzenia w warunkach *in vitro*, . Dodatkowo, nie stwierdzono zależności pomiędzy występowaniem genu *luxS* a zdolnością do tworzenia biofilmu. Rezultaty te są zgodne z wcześniej publikowanymi danymi wskazującymi, że produkcja biofilmu jest zjawiskiem wieloczynnikowym, zależnym od wielu mechanizmów, nie zaś od obecności pojedynczych genów (134, 135). Pomimo dotychczasowych osiągnięć badawczych, kwestia ta zostaje niewystarczająco poznana i wymaga dalszych badań.

Metodą badawczą, potwierdzającą potencjał chorobotwórczy *Listeria* spp. jest również ocena cytotoksyczności izolatów wykonana w warunkach *in vitro*. Aktywność cytotoksyczną wobec co najmniej jednej linii komórkowej wykazano jedynie w przypadku szczepów *L. monocytogenes* – 91,7% izolatów, podczas gdy u innych gatunków stwierdzono całkowity brak cytotoksyczności. Uzyskane dane potwierdziły funkcjonalne znaczenie determinant wirulencji, co dodatkowo potwierdza analiza statystyczna. Wykazano istotny statystycznie związek między brakiem genów *iap*, *actA* i *prfA* i brakiem aktywności cytotoksycznej ($p < 0,05$).

Przeprowadzone badania, pomimo pewnych ograniczeń badawczych związanych z zakresem materiału badawczego oraz zastosowaną metodyką, dostarczyły nowych i istotnych danych dotyczących znaczenia epidemiologicznego bakterii z rodzaju *Listeria* występujących w rybach. Szczególną wartością przedstawionej pracy jest kompleksowa charakterystyka izolatów *Listeria* spp., dotychczas nie opisywana w tak szerokim zakresie badawczym. Uzyskane wyniki potwierdziły, iż surowe ryby mogą stanowić rezerwuar szczepów *L. monocytogenes* o wysokim potencjale patogennym i znacznym poziomie lekooporności.

Istotnym osiągnięciem badań było również wykazanie, że znaczenie epidemiologiczne rodzaju *Listeria* nie ogranicza się wyłącznie do *L. monocytogenes*. Gatunki takie jak *L. innocua*, *L. welshimeri* i *L. seeligeri*, wykazały zdolność do tworzenia biofilmu oraz posiadały niektóre determinanty wirulencji. Wyniki te sugerują, że gatunki te mogą pełnić funkcję środowiskowego rezerwuaru cech sprzyjających przeżyciu i rozprzestrzenianiu się bakterii z rodzaju *Listeria*.

Uzyskane dane mają praktyczne znaczenie dla ochrony zdrowia publicznego. Wskazują na zasadność rozszerzenia nadzoru nie tylko nad *L. monocytogenes* ale również na inne gatunki tego rodzaju, które mogą uczestniczyć w tworzeniu nisz ekologicznych sprzyjających przetrwaniu patogenów. Jednocześnie uzyskane dane wyznaczają kierunki dalszych badań, obejmujące zastosowanie sekwencjonowania całego genomu, analizę ekspresji genów wirulencji i oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe w różnych warunkach środowiska jak również ocenę roli niepatogennych gatunków *Listeria* w utrzymaniu i transmisji szczepów chorobotwórczych w łańcuchu żywnościowym.

Dostarczy to cennych danych do oceny ryzyka jak również informacji pozwalających opracować skuteczne strategie zarządzania ryzykiem w sektorze produkcji i dystrybucji produktów rybnych.

8. Wnioski

1. Ryby hodowlane pochodzące ze zbiorników słodkowodnych o wodzie stojącej są znacznym rezerwuarem bakterii z rodzaju *Listeria* innych niż *L. monocytogenes*, natomiast rezerwuarem *L. monocytogenes* w środowisku są głównie dziko żyjące ryby słonowodne.

2. Izolaty *Listeria* spp. oraz L. monocytogenes pochodzące z ryb wykazują wysoki poziom oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe, w tym również wielolekooporność

3. Analiza zależności pomiędzy opornością na środki przeciwdrobnoustrojowe oraz korelacja pomiędzy fenotypami oporności a obecnością genów warunkujących AMR wskazuje na molekularne podstawy oporności *Listeria* spp.

4. Zdolność wywołania efektu cytotoksycznego jest ściśle powiązana z występującym u *L. monocytogenes* pełnym klastrem genów wirulencji, zlokalizowanym na wyspie patogenności LIPI-1, w odróżnieniu od szczepów niepatogennych, charakteryzujących się brakiem działania cytotoksycznego, zawierających jedynie pojedyncze geny związane z wirulencją.

5. *Listeria* spp. i *L. monocytogenes* izolowane z ryb wykazują dużą zdolność do produkcji biofilmu, jednak brak zależności pomiędzy produkcją biofilmu a obecnością genu *luxS* wskazuje na inne molekularne podstawy zdolności biofilmotwórczych.

6. Analiza molekularna wyizolowanych szczepów uznawanych za niepatogenne dowodzą, że bakterie te stanowią środowiskowy rezerwuar genów wirulencji.

9. Piśmiennictwo

1. Bajard S, Rosso L, Fardel G, Flandrois JP. The particular behaviour of *Listeria monocytogenes* under sub-optimal conditions. Int J Food Microbiol. 1996. 29:201-211,

2. Hammon M, Bierne H, Cossart P. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. Nat Rev Microbiol. 2006. 4(6):423-434,

3. Liu D, Lawrence ML, Ainsworth AJ, Austin FW. Toward an improved laboratory definition of *Listeria monocytogenes* virulence. Int J Food Microbiol. 2007. 118:101-115,

4. Guerra MM, McLauchlin J, Bernardo FA. *Listeria* in ready-to-eat and unprocessed foods produced in Portugal. Food Microbiol. 2001. 18:423-429,

5. Liu D, Lawrence M, Austin FW, Ainsworth AJ. Comparative assessment of acid, alkali and salt tolerance in *Listeria monocytogenes* virulent and avirulent strains. FEMS Microbiol Lett. 2005. 243:373-378,

6. Sleator RD, Gahan CGM, Hill C. A postgenomic appraisal of osmotolerance in *Listeria monocytogenes*. Appl Environ Microbiol. 2003. 69:1-9,

7. Shantha SM, Gopal S. Incidence of *Listeria* species in food and food processing environment: a review. RRJMB. 2014. 3:e-ISSN:2320-3528,

8. Murray EGD, Webb RA, Swann MBR. A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). J Pathol Bacteriol. 1926. 29:407-439,

9. Harvey PJH. *Listeria*: change of name for a genus of bacteria. Nature. 1940. 145:264,

10. Rocourt J, Wehmeyer U, Stackebrandt E. Transfer of *Listeria denitrificans* to a new genus, *Jonesia* gen. nov., as *Jonesia denitrificans* comb. nov. Int J Syst Bacteriol. 1987. 37:266-270,

11. Rocourt J, Grimont PAD. *Listeria welshimeri* sp. nov. and *Listeria seeligeri* sp. nov. Int J Syst Bacteriol. 1983. 33(4):866-869,

12. Boerlin P, Rocourt J, Grimont F, Grimont PAD, Jacquet C, Piffaretti JC. *Listeria ivanovii* subsp. *londoniensis* subsp. nov. Int J Syst Evol Micr. 1992. 42:69-73,

13. Seeliger HP, Rocourt J, Schrettenbrunner A, Grimont PA, Jones D. *Listeria ivanovii* sp. nov. Int J Syst Bacteriol. 1984. 34(3):336-337,

14. Rocourt J, Boerlin P, Grimont F, Piffaretti JC. Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria grayi*, with a revised description of *Listeria grayi*. Int J Syst Bacteriol. 1992. 42:171-174,

15. Halter EL, Neuhaus K, Scherer S. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant Lemna trisulca taken from a freshwater pond. Int J Syst Evol Microbiol. 2013. 63:641-647,

16. Leclercq A, Clermont D, Bizet C, Grimont PAD, Le Fléche-Matéos A, Roche SM, Buchrieser C, Cadet-Daniel V, Le Monnier A, Lecuit M, Allerberger F. *Listeria rocourtiae* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2010. 60:2210-2214,

17. Bertsch D, Rau J, Eugster MR, Haug MC, Lawson PA, Lacroix C, Meile L. *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. Int J Syst Evol Microbiol. 2013. 63:526-532,

18. Bakker HC den, Clyde MS, Fortes ED, Wiedmann M, Nightingale KK. Genome sequencing identifies *Listeria fleischmannii* subsp. *coloradonensis* subsp. nov., isolated from a ranch. Int J Syst Evol Microbiol. 2013. 63:3257-3268,

19. Bakker HC den, Warchocki S, Wright EM, Allred AF, Ahlstrom C, Manuel CS, Stasiewicz MJ, Burrell A, Roof S, Strawn LK, Fortes E, Nightingale KK, Kephart D, Wiedmann M. *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov., and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. Int J Syst Evol Microbiol. 2014. 64:1882-1889,

20. Weller D, Andrus A, Wiedmann M, Bakker HC den. *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. Int J Syst Evol Microbiol. 2015. 65:286-292,

21. Doijad SP, Poharkar KV, Kale SB, Kerkar S, Kalorey DR, Kurkure NV, Rawool DB, Malik SV, Ahmad RY, Hudel M, Chaudhari SP, Abt B, Overmann J, Weigel M, Hain T, Barbuddhe SB, Chakraborty T. *Listeria goaensis* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2018. 68:3285-3291,

22. Núñez-Montero K, Leclercq A, Moura A, Vales G, Peraza J, Pizarro-Cerdá J, Lecuit M. *Listeria costaricensis* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2018. 68:844-850,

23. Leclercq A, Moura A, Vales G, Tessaud-Rita N, Christine Aguilhon C, Lecuit M. Listeria thailandensis sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2019. 69:74-81,

24. Quereda JJ, Leclercq A, Moura A, Vales G, Gómez-Martín A, García-Muñoz A, Thouvenot P, Tessaud-Rita N, Bracq-Dieye H, Lecuit M. *Listeria valentina* sp. nov., isolated from a water trough and the faeces of healthy sheep. Int J Syst Evol Microbiol. 2020. 70:5868-5879,

25. Carlin CR, Liao J, Weller D, Guo X, Orsi R, Wiedmann M. *Listeria cossartiae* sp. nov., *Listeria immobilis* sp. nov., *Listeria portnoyi* sp. nov. and *Listeria rustica* sp. nov., isolated from agricultural water and natural environments. Int J Syst Evol Microbiol. 2021. 71:004795,

26. Carlin CR, Liao J, Hudson LK, Peters TL, Denes TG, Orsi RH, Guo X, Wiedman M. Soil Collected in the Great Smoky Mountains National Park Yielded a Novel *Listeria* sensu stricto Species, *L. swaminathanii*. Microbiol Spectr. 2022. 10(3):e0044222,

27. Orsi RH, Wiedmann M. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. Food Microbiology. 2016. 57:147-165,

28. Bille J, Catimel B, Bannerman E, Jacquet C, Yersin MN, Caniaux I, Monget D, Rocourt J. API *Listeria*, a new and promising one-day system to identify *Listeria* isolates. Appl Environ Microbiol. 1992. 58:1857-1860,

29. Halter EL, Neuhaus K, Scherer S. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant Lemna trisulca taken from a freshwater pond. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2013. 63:641-647,

30. Bajard S, Rosso L, Fardel G, Flandrois JP. The particular behaviour of *Listeria monocytogenes* under sub-optimal conditions. Int. J. Food Microbiol. 1996. 29:20l-211,

31. Hammon M, Bierne H, Cossart P. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. Nat. Rev. Microbiol. 2006. 4(6):423-434,

32. Hodzic S, Hukic M. Presence and serological characteristics of *Listeria monocytogenes* in meat and meat products. Health Med. 2012. 6:2593-2599,

33. Jeyaletchumi P, Tunung R, Margaret SP, Son R, Farinazleen MG, Cheah YK. Detection of *Listeria monocytogenes* in foods. Int Food Res J. 2010. 17:1-11.

34. Liu D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. J Med Microbiol. 2006. 55:645-659,

35. Bubert A, Hein I, Rauch M, Lehner A, Yoon B, Goebel W, Wagner M. Detection and differentiation of *Listeria* spp. by a single reaction based on multiplex PCR. Appl Environ Microbiol. 1999. 65:4688-4692,

36. 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,

37. Zhang C, Zhang M, Ju J, Nietfeldt J, Wise J, Terry PM, Olson M, Kachman SD, Wiedmann M, Samadpour M, Benson AK. Genome diversification in phylogenetic lineages I and II of *Listeria monocytogenes*: identification of segments unique to lineage II populations. J Bacteriol. 2003. 185:5573-5584,

38. Kathariou S. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. J Food Prot. 2002. 65(11):1811-1829,

39. Swaminathan B, Gerner-Smidt P. The epidemiology of human listeriosis. Microbes Infect. 2007. 1236-1243,

40. Gilbreth SE, Call JE, Wallace FM, Scott VN, Chen Y, Luchansky JB. Relatedness of *Listeria monocytogenes* isolates recovered from selected ready-to-eat foods and listeriosis patients in the United States. Appl Environ Microbiol. 2005. 71:8115-8122,

41. Gliński Z, Kostro K. Listerioza współczesnym zagrożeniem. Życie Wet. 2012. 87:577-581,

42. Rossi F, Giaccone V, Colavita G, Amadoro C, Pomilio F, Catellani P. Virulence characteristics and distribution of the pathogen *Listeria ivanovii* in the environment and in food. Microorganisms. 2022. 10(8):1679,

43. Quereda JJ, Morón-García A, Palacios-Gorba C, Dessaux C, García-Del Portillo F, Pucciarelli MG, et al. Pathogenicity and virulence of Listeria monocytogenes: A trip from environmental to medical microbiology. Virulence. 2021. 12(1):2509-45,

44. Matle I, Mbatha KR, Madoroba E. A review of *Listeria monocytogenes* from meat and meat products: epidemiology, virulence factors, antimicrobial resistance and diagnosis. Onderstepoort J Vet Res. 2020. 87(1):e1-20,

45. Gómez-Laguna J, Cardoso-Toset F, Meza-Torres J, Pizarro-Cerdá J, Quereda JJ. Virulence potential of *Listeria monocytogenes* strains recovered from pigs in Spain. Vet Rec. 2020. 187(11):e101,

46. Kowalik J, Adamczewski K, Ziajka S. Szacowanie wzrostu liczby komórek *Listeria monocytogenes* w serze mozzarella z wykorzystaniem urządzenia impedymetrycznego. Żywn Nauk Technol Jak. 2014. 1(92):66-77,

47. Melo J, Andrew PW, Faleiro ML. *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: the role of stress responses. Food Res Int. 2015. 64:75-90,

48. Muhterem-Uyar M, Dalmasso M, Bolocan AS, Hernandez M, Kapetanakou AE, Kuchta T, Manios SG, Melero B, Minarovičová J, Nicolau AI, Rovira J, Skandamis PN, Jordan K, Rodríquez-Lázaro D, Stessl B, Wagner M. Environmental sampling for *Listeria monocytogenes* control in food processing facilities reveals three contamination scenarios. Food Control. 2015. 51:94-107,

49. Saludes M, Troncoso M, Figueroa G. Presence of *Listeria monocytogenes* in Chilean food matrices. Food Control. 2015. 50:331-335,

50. Lundén JM, Miettinen MK, Autio TJ, Korkeala HJ. Persistent *Listeria monocytogenes* strains show enhanced adherence to food contact surface after short contact times. J Food Prot. 2000. 63:1204-1207.

51. Farber JM, Peterkin PI. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiol Mol Biol Rev. 1991. 55:476-511,

52. Jemmi T, Stephan R. *Listeria monocytogenes* food-borne pathogen and hygiene indicator. Rev Sci Tech Off Int Epiz. 2006. 25:571-580,

53. Huss HH, Jørgensen LV, Fonnesbech Vogel B. Control options for *Listeria monocytogenes* in seafoods. Int J Food Microbiol. 2000. 62:267-274,

54. Jørgensen LV, Huss HH. Prevalence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated seafood. Int J Food Microbiol. 1998. 42:127-131,

55. Rørvik LM. *Listeria monocytogenes* in the smoked salmon industry. Int J Food Microbiol. 2000. 62:183-190,

56. EFSA (European Food Safety Authority): The European Union One Health 2024 Zoonoses Report. EFSA Journal. 2025;23:e9759. DOI: 10.2903/j.efsa.2025.9759,

57. EFSA (European Food Safety Authority). The European Union Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. EFSA Journal. 2017. 15(12):5077,

58. Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Dominquez-Bernal G, Goebel W, González-Zorn B, Wehland J, Kreft J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. Clin Microbiol Rev. 2001. 14:584-640,

59. Molinos AC, Abriouel H, Omar NB, Valdivia E, Lopez RL, Maqueda M, Cañamero MM, Gálvez A. Effect of immersion solutions containing enterocin AS-48 on *Listeria monocytogenes* in vegetable foods. Appl Environ Microbiol. 2005. 71:7781-7787,

60. Walczycka M. Metody inaktywacji i hamowania wzrostu *Listeria monocytogenes* w przetworach mięsnych. Żywn Nauk Technol Jakość. 2005. 43:61-72,

61. Milohanic E, Jonqieres R, Cossart P, Berche P, Gaillard JL. The autolysin Ami contributes to the adhesion of *Listeria monocytogenes* to eucariotic cells via its cell wall anchor. Mol Microbiol. 2001. 39:1212-1224,

62. Rocourt J, Jacquet C, Reilly A. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. Int J Food Microbiol. 2000. 62:197-209,

63. Todd ECD, Notermans S. Surviellance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. Food Control. 2011. 22:1484-1490,

64. Popowska M, Markiewicz Z. Murein-Hydrolyzing Activity of Flagellin FlaA of *Listeria monocytogenes*. Pol J Microbiol. 2004. 53:237-241,

65. Bonsaglia ECR, Silva NCC, Fernades Júnior A, Araújo Júnior JP, Tsunemi MH, Rall VLM. Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. Food Control. 2014. 35(1):386-91,

66. Hof H. Listeriosis: therapeutic option. FEMS Immunol Med Microbiol. 2003. 35:203-205,

67. Koopmans MM, Brouwer MC, Vázquez-Boland JA, van de Beek D. Human listeriosis. Clin Microbiol Rev. 2023. 36(1):e00060-19,

68. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. Microbiology Spectrum. 2016. 4(2),

69. Morvan A, Moubareck C, Leclercq A, Hervé-Bazin M, Bremont S, Lecuit M, Courvalin P, Le Monnier A. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* strains isolated from humans in France. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2010. 54(6):2728-2731,

70. Baquero F, Lanza VF, Duval M, Coque TM. Ecogenetics of antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. Molecular Microbiology. 2020. 113(3):570-579,

71. International Standard ISO. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. — Part 1: Detection method. International Standard ISO; 2017,

72. Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by Multiplex PCR. Journal Of Clinical Microbiology. 2004. 3819-3822,

73. Tao T, Chen Q, Bie X, Lu F, Lu Z. Investigation on prevalence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in animal-derived foods by multiplex PCR assay targeting novel genes. Food Control. 2017. 73:704–11,

74. Tao T, Chen Q, Bie X, Lu F, Lu Z. Mining of novel species-specific primers for PCR detection of Listeria monocytogenes based on genomic approach. World J Microbiol Biotechnol. 2015. 31(12):1955–66,

75. Liu D, Ainsworth AJ, Austin FW, Lawrence ML. PCR detection of a putative N-acetylmuramidase gene from *Listeria ivanovii* facilitates its rapid identifica tion. Vet Microbiol. 2004. 101(2):83–9,

76. Liu D, Ainsworth AJ, Austin FW, Lawrence ML. Identification of *Listeria innocua* by PCR targeting a putative transcriptional regulator gene. FEMS Microbiol Lett. 2003. 223(2):205–10,

77. Ryu J, Park SH, Yeom YS, Shrivastav A, Lee SH, Kim YR, et al. Simultaneous detection of *Listeria* species isolated from meat processed foods using multi plex PCR. Food Control. 2013. 32(2):659–64,

78. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 15.0, [Internet]. EUCAST. 2025,

79. CLSI. Performence Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibil ity Tests for Bacteria Isolated From Animals. In: CLSI supplement VET08. 4th edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018,

80. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect. 2012. 18(3):268-81,

81. Srinivasan V, Nam HM, Nguyen LT, Tamilselvam B, Murinda SE, Oliver SP. Preva lence of antimicrobial resistance genes in *Listeria monocytogenes* isolated from dairy farms. Foodborne Pathog Dis. 2005. 2(3):201–11,

82. Titilawo Y, Obi L, Okoh A. Antimicrobial resistance determinants of *Escherichia coli* isolates recovered from some rivers in Osun State, South-Western Nigeria: implications for public health. Sci Total Environ. 2015. 523:82–94,

83. Lanz R, Kuhnert P, Boerlin P. Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. Vet Microbiol. 2003. 91(1):73–84,

84. Bonsaglia ECR, Silva NCC, Fernades Júnior A, Araújo Júnior JP, Tsunemi MH, Rall VLM. Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. Food Control. 2014. 35(1):386–91

85. Kaur S, Malik SVS, Bhilegaonkar KN, Vaidya VM, Barbuddhe SB. Use of a phospholipase-C assay, in vivo pathogenicity assays and PCR in assessing the virulence of *Listeria* spp. Vet J. 2010. 184(3), 366-370.

86. Liu D, Lawrence ML, Austin FW, Ainsworth AJ. A multiplex PCR for species- and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. J Microbiol Methods. 2007. 71(2):133–40,

87. Lomonaco S, Patti R, Knabel SJ, Civera T. Detection of virulence-associated genes and epidemic clone markers in *Listeria monocytogenes* isolates from PDO Gorgonzola cheese. Int J Food Microbiol. 2012. 160(1):76–9,

88. Nishibori T, Cooray1 K, Xiong1 H, Kawamura1 I, Fujita1 M, Mitsuyama1 M. Correlation between the presence of virulence-associated genes as determined by PCR and actual virulence to mice in various strains of *Listeria* spp. Microbiol Immunol. 1995. 39(5):343–9,

89. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. J Clin Pathol. 1989. 42(8):872–4,

90. Atshan SS, Shamsudin MN. Evaluation of phenotypic and genotypic detection methods for biofilm-forming methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. Ann Microbiol. 2011. 61(4):825–31,

91. Arciola CR, Campoccia D, Speziale P, Montanaro L, Costerton JW. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. Biomaterials. 2012. 33(26):5967–82,

92. Ebrahimi A, Moatamedi A, Lotfalian S, Mirshokraei P. Biofilm formation, hemolysin production and antimicrobial susceptibilities of *Streptococcus agalactiae* isolated from the mastitis milk of dairy cows in Shahrekord district, Iran. Vet Res Forum. 2013. 4(4):269–72,

93. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Ćirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. APMIS. 2007. 115(8):891–9,

94. Ngamwongsatit P, Banada PP, Panbangred W, Bhunia AK. WST-1-based cell cytotoxicity assay as a substitute for MTT-based assay for rapid detec tion of toxigenic *Bacillus* species using CHO cell line. J Microbiol Methods. 2008. 73(3):211–5,

95. Sołtysiuk M, Przyborowska P, Wiszniewska – Łaszczych A, Tobolski D. Prevalence and antimicrobial resistance profile of *Listeria* spp. isolated from raw fish. BMC Veterinary Research. 2025. 21:333,

96. Naylor RL, Kishore A, Sumaila UR, Issifu I, Hunter BP, Belton B, et al. Blue food demand across geographic and Temporal scales. Nat Commun. 2021. 12(1):5413,

97. Lambrechts K, Gouws P, Rip D. Genetic diversity of *Listeria monocytogenes* from seafood products, its processing environment, and clinical origin in the Western cape, South Africa using whole genome sequencing. AIMS Micro biol. 2024. 10(3):608–43,

98. Rozporządzenie Komisji (UE) 2024/2895 z dnia 20 listopada 2024 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 2073/2005 w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych w odniesieniu do *Listeria monocytogenes* w żywności gotowej do spożycia (Tekst mający znaczenie dla EOG). Dz.U. L. 2024. 2895,

99. Arslan S, Özdemir F. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* species and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail ready-to-eat foods. FEMS Microbiol Lett. 2020. 367(4):fnaa006,

100. Momtaz H, Yadollahi S. Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh seafood samples in Iran. Diagn Pathol. 2013. 8(1):149,

101. Zakrzewski AJ, Gajewska J, Chajęcka-Wierzchowska W, Załuski D, Zader nowska A. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in fish, fish products and fish processing environment: A systematic review and meta-analysis. Sci Total Environ. 2024. 907:167912,

102. Tarazi Y, Sukhon S, Rahbi A, Ismail Z. Molecular characterization and *in vivo* pathogenicity study of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh and frozen local and imported fish in Jordan. Open Vet J. 2021. 11(4):517,

103. Walsh D, Duffy G, Sheridan JJ, Blair IS, McDowell DA. Antibiotic resistance among *Listeria*, including *Listeria monocytogenes*, in retail foods. J Appl Microbiol. 2001. 90(4):517–22,

104. Miettinen H, Wirtanen G. Prevalence and location of *Listeria monocytogenes* in farmed rainbow trout. Int J Food Microbiol. 2005. 104(2):135–43,

105. Jamali H, Paydar M, Ismail S, Looi CY, Wong WF, Radmehr B, et al. Prevalence, antimicrobial susceptibility and virulotyping of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* isolated from open-air fish markets. BMC Microbiol. 2015. 15(1):144,

106. Rezai R, Ahmadi E, Salimi B. Prevalence and antimicrobial resistance profile of *Listeria* species isolated from farmed and On-Sale rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Western Iran. J Food Prot. 2018. 81(6):886–91,

107. Tompkin RB. Control of *Listeria monocytogenes* in the Food-Processing environment. J Food Prot. 2002. 65(4):709–25,

108. Alali WQ, Schaffner DW. Relationship between *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp. In seafood processing plants. J Food Prot. 2013. 76(7):1279–82,

109. Tarazi Y, Sukhon S, Rahbi A, Ismail Z. Molecular characterization and *in vivo* pathogenicity study of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh and frozen local and imported fish in Jordan. Open Vet J. 2021. 11(4):517,

110. Fagerlund A, Idland L, Heir E, Møretrø T, Aspholm M, Lindbäck T et al. Whole Genome Sequencing Analysis of *Listeria monocytogenes* from Rural, Urban, and Farm Environments in Norway: Genetic Diversity, Persistence, and Rela tion to Clinical and Food Isolates. Dudley EG, editor. Appl Environ Microbiol. 2022. 88(6):e02136-21,

111. Chen BY, Wang CY, Wang CL, Fan YC, Weng IT, Chou CH. Prevalence and persistence of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Tilapia Sashimi pro cessing plants. J Food Prot. 2016. 79(11):1898–903,

112. Fonnesbech Vogel B, Huss HH, Ojeniyi B, Ahrens P, Gram L. Elucidation of *Listeria monocytogenes* contamination routes in Cold-Smoked salmon processing plants detected by DNA-Based typing methods. Appl Environ Microbiol. 2001;67(6):2586–95,

113. Bouymajane A, Rhazi Filali F, Oulghazi S, Lafkih N, Ed-Dra A, Aboulkacem A, et al. Occurrence, antimicrobial resistance, serotyping and virulence genes of *Listeria monocytogenes* isolated from foods. Heliyon. 2021. 7(2):e06169,

114. Caruso M, Fraccalvieri R, Pasquali F, Santagada G, Latorre LM, Difato LM, et al. Antimicrobial susceptibility and multilocus sequence typing of *Listeria monocytogenes* isolated over 11 years from food, humans, and the environment in Italy. Foodborne Pathog Dis. 2020. 17(4):284-94,

115. Hanes RM, Huang Z. Investigation of antimicrobial resistance genes in *Listeria monocytogenes* from 2010 through to 2021. Int J Environ Res Public Health. 2022. 19(9):5506,

116. Zhang H, Luo X, Aspridou Z, Misiou O, Dong P, Zhang Y. 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. 2023. 12(4):769,

117. Krawczyk-Balska A, Markiewicz Z. The intrinsic cephalosporin resistome of *Listeria monocytogenes* in the context of stress response, gene regulation, pathogenesis and therapeutics. J Appl Microbiol. 2016. 120(2):251-65,

118. Hailu W, Helmy YA, Carney-Knisely G, Kauffman M, Fraga D, Rajashekara G. Prevalence and antimicrobial resistance profiles of foodborne pathogens isolated from dairy cattle and poultry manure amended farms in Northeastern Ohio, the united States. Antibiotics. 2021. 10(12):1450,

119. Costa JCCP, Bolívar A, Alberte TM, Zurera G, Pérez-Rodríguez F. *Listeria monocytogenes* in aquatic food products: spotlight on epidemiological information, bio-based mitigation strategies and predictive approaches. Microb Pathog. 2024. 197:106981,

120. Żurawik A, Kasperski T, Olechowska-Jarząb A, Szczesiul-Paszkiewicz P, Żak I, Wójcicki M, et al. Genetic diversity, virulence factors and antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* from food and clinical samples in Southern Poland. Pathogens. 2024. 13(9):725,

121. Johnson J, Jinneman K, Stelma G, Smith BG, Lye D, Messer J, et al. Natural atypical *Listeria innocua* strains with *Listeria monocytogenes* pathogenicity island 1 genes. Appl Environ Microbiol. 2004. 70(7):4256-66,

122. Moreno LZ, Paixão R, Gobbi DD, Raimundo DC, Ferreira TP, Hofer E, et al. Characterization of atypical *Listeria innocua* isolated from swine slaughterhouses and meat markets. Res Microbiol. 2012. 163(4):268-71,

123. Moreno LZ, Paixão R, Sena De Gobbi DD, Raimundo DC, Porfida Ferreira TS, Micke Moreno A, et al. Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* isolated from swine slaughter houses and meat markets. Biomed Res Int. 2014. 2014:742032,

124. Ramadan H, Al-Ashmawy M, Soliman AM, Elbediwi M, Sabeq I, Yousef M, et al. Whole-genome sequencing of *Listeria innocua* recovered from retail milk and dairy products in Egypt. Front Microbiol. 2023. 14:1160244,

125. Zawiasa A, Schmidt M, Olejnik-Schmidt A. Phage-Based Control of *Listeria innocua* in the Food Industry: A Strategy for Preventing *Listeria monocytogenes* Persistence in Biofilms. Viruses. 2025. 17(4):482,

126. Manqele A, Gcebe N, Pierneef RE, Moerane R, Adesiyun AA. Identification of *Listeria* species and Multilocus Variable-Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) Typing of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* Isolates from Cattle Farms and Beef and Beef-Based Products from Retail Outlets in Mpumalanga and North West Provinces, South Africa. Pathogens. 2023. 12(1):147,

127. Kuenne C, Billion A, Mraheil MA, Strittmatter A, Daniel R, Goesmann A, et al. Reassessment of the *Listeria monocytogenes* pan-genome reveals dynamic integration hotspots and mobile genetic elements as major components of the accessory genome. BMC Genomics. 2013. 14(1):47,

128. Lomonaco S, Nucera D, Filipello V. The evolution and epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Europe and the united States. Infect Genet Evol. 2015. 35:172-83,

130. Karakaya E, Aydin F, Gümüşsoy KS, Kayman T, Güran Ö, Güran C, et al. *Listeria monocytogenes* from different sources: the serotyping, genotyping, virulotyping, and antibiotic susceptibilities of the recovered isolates. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2025. 118:102314,

131. Basha KA, Kumar NR, Das V, Reshmi K, Rao BM, Lalitha KV, et al. Prevalence, molecular characterization, genetic heterogeneity and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* associated with fish and fishery environment in Kerala, India. Lett Appl Microbiol. 2019. 69(4):286-93,

132. Osek J, Wieczorek K. Why does *Listeria monocytogenes* survive in food and food-production environments? J Veterinary Res (Poland). 2023. 67(4):537-44,

133. 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,

134. Zhang B, Ren H, Wang X, Han C, Jin Y, Hu X, et al. Comparative genomics analysis to explore the biodiversity and mining novel target genes of *Listeria monocytogenes* strains from different regions. Front Microbiol. 2024. 15,

135. Ramires T, Kleinubing NR, Iglesias MA, Vitola HRS, Núncio ASP, Kroning IS, et al. Genetic diversity, biofilm and virulence characteristics of *Listeria monocytogenes* in salmon sushi. Food Res Int. 2021. 140:109871,

10. Spis tabel, rysunków i wykresów

Tabela 1. Sekwencje par starterów wykorzystanych do identyfikacji bakterii *Listeria* spp. metodą PCR. 26

Tabela 2. Zestawienie par starterów wykorzystanych do amplifikacji genów warunkujących oporność na substancje przeciwdrobnoustrojowe w izolatach *Listeria* spp. 28

Tabela. 3 Sekwencje starterów (5′→3′), rozmiary amplikonów dla genów wirulencji, genu produkcji biofilmu oraz markerów genoserogrupy u *L. monocytogenes* 31